

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E**  
**BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**LEVEDURAS ASSOCIADAS A MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA**  
**DO ESTUÁRIO DO RIO SUBAÉ, SÃO FRANCISCO DO CONDE,**  
**BA**

**JULIANA MOTA DE OLIVEIRA**

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

JULHO- 2016

**LEVEDURAS ASSOCIADAS A MOLUSCOS BIVALVES E ÁGUA  
DO ESTUÁRIO DO RIO SUBAÉ, SÃO FRANCISCO DO CONDE,  
BA**

**JULIANA MOTA DE OLIVEIRA**

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marcia Luciana Cazetta

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Amélia Alves Duarte

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA**

**JULHO - 2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JULIANA  
MOTA DE OLIVEIRA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Amélia Alves Duarte

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Co-orientadora

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Lobo Machado

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Norma Suely Barreto-Evangelista

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em  
Microbiologia Agrícola em

\_\_\_\_\_ conferindo o grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola em

\_\_\_\_\_.

**Mãe, por ter sido exemplo de coragem, força, determinação e fé para mim, te dedico essa dissertação. Ao meu pai, Antonio, e irmão, Thiago, vocês são flores no meu jardim.**

## **Agradecimentos**

Agradecer a Deus e aos amigos de luz, por permitir que mais uma etapa da formação seja desempenhada com louvor em meio a todas as dificuldades.

A minha orientadora, Marcia Luciana Cazetta que me acompanha desde a graduação! Obrigada por todo conhecimento compartilhado, por toda dedicação e disposição em ajudar.

A minha co-orientadora, Elizabeth Amélia Alves Duarte, por ser um divisor de águas em minha vida com relação ao aprendizado dentro da biologia molecular. E por todo apoio dentro e fora do laboratório, aprendi muito com você!

As amigas do Laboratório de Genética Microbiana: Cely, Malu, Lica e Carol. Nós crescemos muito juntas!

As minhas amigas e colegas de laboratório: Pati, Lili, Carine, Thiara, Elina e Camila, pelo bom convívio desenvolvido e momentos de descontração e risadas.

Às técnicas do Bloco L, Lene e Carol. Obrigada por toda ajuda e colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

Às amigas de sempre, Mara, Angélica e Jay. Vocês são muito importantes para mim. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial.

Ao meu amor e companheiro, obrigada pela compreensão e paciência durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB pela oportunidade. A todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e ajuda.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho. **MUITO OBRIGADA!!!**

## **Lista de Tabelas**

### **Capítulo 1**

Tabela 1: Identificação molecular das leveduras isoladas de água, sururu do mangue e ostra da Bacia do rio Subaé, Bahia, Brasil.....	30
--	----

### **Capítulo 2**

Tabela 1: Isolados obtidos a partir de amostras de ostra e sururu e suas respectivas espécies.....	45
--	----

## Lista de Figuras

### Revisão Bibliográfica

Figura 1: <i>Mytella guyanensis</i> .....	5
Figura 2: <i>Crassostrea rhizophorae</i> .....	5
Figura 3: Mapa mostrando em destaque a subunidade menor 18S (SSU) e a subunidade maior 25-28S (LSU) do gene rRNA de fungos.....	9

### Capítulo 1

Figura 1: Área de coleta indicando os pontos amostrais. Os círculos no mapa destacam os três pontos de coleta para água. ....	27
Figura 2: Diagrama de Venn mostrando o número de espécies comuns às diferentes amostras.....	31
Figura 3: Curva de contorno evidenciando o efeito da temperatura e salinidade na contagem de unidades formadoras de colônias de leveduras em sururu ( <i>Mytella guyanensis</i> ).....	32
Figura 4: Curva de contorno evidenciando o efeito da temperatura e salinidade na contagem de unidades formadoras de colônias de leveduras em ostra ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ).....	33

### Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie <i>Cryptococcus victoriae</i> foi utilizada como grupamento externo.....	46
---	----

**Figura 2.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parameter (Kimura 1980), com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.....47

**Figure 3.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.....48

**Figure 4.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Tamura 3-parameter (Tamura 1992) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.....49

**Figura 5.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.....50



# ÍNDICE

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Revisão Bibliográfica.....	3
1.1 Rio Subaé.....	3
1.2 Moluscos Bivalves.....	4
1.3 Leveduras.....	6
1.4 Abordagem molecular na taxonomia de leveduras.....	8
Referências.....	12

## Capítulo 1

Leveduras associadas aos moluscos bivalves <i>Mytella guyanensis</i> e <i>Crassostrea rhizophorae</i> e água no estuário do Rio Subaé, São Francisco do Conde, BA.....	22
Resumo.....	23
1. Introdução.....	23
2. Material e métodos.....	26
2.1 Amostragem.....	26
2.2 Isolamento de leveduras da água, sururu do mangue e ostras.....	27
2.3 Identificação molecular das leveduras.....	28
2.4 Avaliação e Análises estatísticas.....	29
3. Resultados .....	29
4. Discussão.....	33
REFERÊNCIAS.....	35

## CAPITULO 2

Primeiro relato de cinco espécies de leveduras isoladas em tecido intervalvar de moluscos bivalves da Bacia do Rio Subaé, BA, Brasil.....	41
---	----

Resumo.....	42
1. Introdução.....	42
2. Material e métodos .....	43
2.1 Área de coleta.....	43
2.2 Manutenção das linhagens.....	43
2.3 Reativação.....	44
2.4 Identificação molecular das leveduras.....	44
2.5 Análises Filogenéticas.....	44
3 Resultados e discussão .....	45
4 Considerações finais.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>56</b>

## Resumo

### **Oliveira, J. M. Leveduras associadas a moluscos bivalves e água do estuário do Rio Subaé, São Francisco do Conde, BA**

O presente estudo reporta ao isolamento e identificação molecular de leveduras isoladas de amostras de água e de moluscos bivalves (*Mytella guyanensis* e *Crassostrea rhizophorae*) comumente coletados no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde-BA. Além do tema central de isolamento e identificação de leveduras de água e dos dois moluscos bivalves supramencionados, são discutidas às implicações a saúde e meio ambiente, uma vez que a Bacia do Rio Subaé sofre ação antrópica, em alguns pontos, contemplando o ambiente estuarino, tornando-se um fator relevante para o monitoramento ambiental. Os isolados foram identificados pelo estudo dos domínios D1/D2 do gene do RNA ribossômico (rRNA) 26S e, para algumas amostras foi realizado o estudo adicional da região do gene da RNA polimerase II elucidando a identificação a nível de espécie. Adicionalmente foram realizadas análises filogenética de 5 espécies, que não haviam sido relatadas anteriormente em moluscos bivalves. Foram identificados 70 isolados de leveduras, distribuídos em nove gêneros, sendo *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp. os gêneros prevalentes. As análises também revelaram predominância do Filo Ascomycota com 48 representantes, frente ao Basidiomycota com 17 isolados. *Candida haemulonii*, *Candida maris*, *Candida infanticola*, *Candida natalensis*, *Hanseniaspora opuntiae* tiveram sua presença relatada pela primeira vez em moluscos bivalves. Este é o primeiro relato relacionado às análises moleculares da comunidade de leveduras em moluscos bivalves no Nordeste brasileiro. O presente trabalho amplia o conhecimento da diversidade de leveduras associada a bivalves que são amplamente consumidos de forma in natura ou levemente cozidos, podendo agir como mais um indicador da qualidade desses pescados.

**Palavras-chave:** leveduras marinhas, sequenciamento, estuário.

## ABSTRACT

**Oliveira, J. M. Yeasts associated with bivalve molluscs and water estuary Subaé, São Francisco do Conde, BA**

This study reports the isolation and molecular identification of yeasts isolated from water samples and bivalve molluscs (*Mytella guyanensis* and *Crassostrea rhizophorae*) commonly collected in the estuary of the river Subaé, São Francisco do Conde, Bahia. In addition to the central theme of isolation and identification of water yeast and the two above bivalve molluscs are discussed the implications to health and the environment, since the basin Subaé Rio suffers anthropic action, at some points, contemplating the estuarine environment, becoming an important factor for environmental monitoring. The isolates were identified in the study of the domains D1 / D2 gene ribosomal RNA (rRNA) 26S and, for some samples was conducted further study of RNA polymerase II gene region elucidating the identification to the species level. Additionally phylogenetic analysis of five species were carried out, which had not been previously reported in bivalve molluscs. 70 isolates were identified in yeast, distributed in nine genera, and *Candida* spp. and *Rhodotorula* spp. the prevalent genres. The study also revealed predominance of Filo Ascomycota with 48 representatives across the Basidiomycota with 17 isolates. *Candida haemulonii*, *Candida maris*, *Candida infanticola*, *Candida natalensis*, *Hanseniaspora opuntiae* had their first reported presence bivalve mollusks. This is the first report related to the molecular analysis of the yeast community in bivalve molluscs in northeastern Brazil. This study extends the knowledge of the diversity of bivalves associated with yeasts that are widely consumed form of raw or lightly cooked, can act as a further indicator of the quality of these fish.

**Keywords:** marine yeasts, sequencing, estuary.

# INTRODUÇÃO

Leveduras são micro-organismos unicelulares que habitam diferentes tipos de ambientes naturais, sejam aquáticos, terrestre ou até extremos, como a Antártida (BUTINAR et al., 2005; CONNELL et al., 2008; DUARTE et al., 2013). Para estes ambientes os estudos voltados a prospecção de leveduras e outros micro-organismos tem sido intensificados nos últimos anos devido à rápida degradação de ambientes naturais no mundo inteiro (FELL et al., 2000; BRITO et al., 2010; MINILLO et al., 2013; SOTERO-MARTINS, VIANA e CARVAJAL, 2014). Contudo, a maior parte dos trabalhos reportam as leveduras de ambientes terrestres e aquáticos, com alguns relatos sobre leveduras marinhas e estuarinas no mundo, sendo excipientes na costa do Brasil (ARAUJO; HAGLER, 2010; COELHO et al., 2010; KANDASAMY et al., 2012).

O ambiente aquático mostra-se promissor com relação à diversidade de leveduras que ainda podem ser descobertas e suas diversas aplicações biotecnológicas. Estudos já realizados com a utilização de leveduras desses ambientes demonstraram que elas podem ser superiores na produção de algumas biomoléculas quando comparadas a leveduras isoladas de ambientes terrestres (SARAVANAKUMAR et al., 2013; DUARTE et al., 2013). Tendo apenas 5% da sua diversidade estimada conhecida, estudos que objetivam esse conhecimento, apresentam grande relevância, principalmente quando realizados em ambientes aquáticos tropicais, onde muito pouco tem sido feito em relação à diversidade microbiana, se comparado a ambientes temperados (ARAUJO; HAGLER, 2010).

Além do potencial biotecnológico, as leveduras podem ser utilizadas como bioindicadores da condição ambiental em que se encontram, seja como indicador de poluição como a *Candida tropicalis* e *C. krusei* associadas a animais de sangue quente ou indicadores de áreas preservadas como a espécie *Kluyveromyces aestuarii* que é uma espécie encontrada apenas em regiões de mangue que estejam livres de impactos antropogênicos (SOARES et al., 1997; FELL et al., 2010; de ARAUJO et al., 2011). Neste aspecto, a identificação de leveduras do ambiente estuarino da bacia do rio subaé, BA contemplam o estudo da diversidade e de impactos ambientais desta área que é utilizada para lazer,

obtenção de água e alimentos por moradores ribeirinhos e alguns crustáceos e moluscos, particularmente ostras e sururus que são consumidos in natura e podem representar risco alimentar.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Rio Subaé

A bacia hidrográfica do rio Subaé está localizada no Recôncavo da Bahia e apresenta 651 km<sup>2</sup> de extensão. Tem sua ocupação datada da época do Brasil Colônia, intensificada nos últimos 50 anos com as atividades humanas, ocasionando problemas ambientais de modo pontual ou generalizado entre o alto e o baixo curso da bacia (BORGES et al., 2014). O sistema estuarino deste rio compreende os últimos 10 Km do seu baixo curso e é cercado por manguezais (VEIGA, 2003).

Um mapeamento da bacia hidrográfica do rio Subaé, identificou que a maior transformação da paisagem ocorreu devido a atividades artificializadas destinadas a agricultura, pastagens e urbanização que corresponde às cidades, vilas, povoados e indústrias (BORGES et al., 2014). Tal panorama corresponde aos sérios impactos ambientais nos seus principais cursos d'água, decorrentes do despejo de efluentes domésticos e industriais, atividades agropecuária e extrativista que ocorrem desde as suas nascentes em Feira de Santana à sua foz na Baía de Todos os Santos (SANTOS; JESUS; NOLASCO, 2014). O que implica uma grande pressão pela utilização de suas águas superficiais para uma diversidade de usos e ocupações, justificando a necessidade do monitoramento da qualidade das águas (ADORNO; SANTOS; JESUS, 2013).

Estudos recentes demonstraram que as águas do rio Subaé sofrem com elevada contaminação fecal, apresentando diversos micro-organismos do grupo dos coliformes, bem como a presença de bolores e leveduras, apresentando elevada contagem desses micro-organismos (OLIVEIRA et al., 2011; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2013). Neste mesmo local, também foi confirmada a presença de *Salmonella* spp. servindo de alerta quanto à poluição do ambiente principalmente no que diz respeito ao despejo de esgotos (SILVA et al., 2011). Além da contaminação microbiológica, podemos destacar também a presença de metais pesados em concentração excessiva (SANTOS; JESUS; NOLASCO, 2014), principalmente chumbo, sobre o qual diversos estudos já foram realizados (CARVALHO, 1992; ARAGÃO e ALONZO, 2005; ANDRADE e

MORAES, 2013) e que foi encontrado acima do limite máximo indicado na legislação para água potável (MACHADO et al., 2004).

### **Moluscos Bivalves**

No Brasil, dados de 2011 indicaram que a pesca extrativa marinha é a principal fonte de produção do pescado nacional, sendo registrado a maior produção de pescado na região Nordeste (BRASIL, 2011). Na Bahia, a pesca extrativa é especificamente artesanal, sendo também responsável pela maior parte do quantitativo de produção pesqueira do estado (RIOS e GERMANI, 2013).

A pesca artesanal (ou de pequena escala) contempla tanto as capturas com o objetivo doméstico, associado à obtenção de alimento para as famílias de pescadores, como a pesca com objetivo essencialmente comercial (GEOBRASIL, 2002). Estando tradicionalmente ligada a comunidades costeiras que, devido à sua baixa especialização e elevados níveis de pobreza, fazem dela a principal fonte de renda e, portanto, uma ocupação importante no contexto socioeconômico (RODRIGUES e GIUDICE, 2011).

Diversas espécies de moluscos são capturadas durante a pesca e entre elas podemos destacar duas: *Mytella guyanensis* (Figura 1), também conhecido como sururu do mangue, sendo uma espécie que vive em águas salobras, ocorrendo em estuários e mangues desde o Amapá até Santa Catarina (MARQUES, 1998), vivendo enterrado no solo a profundidade máxima de 1,0 cm (NISHIDA e LEONEL, 1995) e *Crassostrea rhizophorae* (Figura 2), conhecido popularmente como ostra, espécie típica de zonas tropicais que ocorre principalmente fixada às raízes aéreas de mangue vermelho, *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) ou sobre zonas entremarés e costões rochosos (NASCIMENTO, 1983), cujo hábito alimentar é filtrador com capacidade de filtrar até 10 litros de água por hora e cerca de 200 litros por dia (WARD, 1996).





**Figura 1.** *Mytella guyanenses* (foto do autor)



**Figura 2.** *Crassostrea rhizophorae* (foto do autor)

Os moluscos bivalves alimentam-se de matéria orgânica e inorgânica, fitoplâncton e partículas em suspensão presentes na água por meio de filtração branquial (PEREIRA et al., 2006). Portanto, o local de produção e/o extrativismo de diferentes espécies de moluscos bivalves destinados ao consumo humano, emerge como um fator fundamental para que estes possam ser comercializados com total segurança e isentos de quaisquer microrganismos patogênicos para o consumidor (LEAL e FRANCO, 2008).

A ocorrência de diferentes micro-organismos patogênicos ao homem, presentes em moluscos bivalves, vem sendo relatado em estudos que visam monitorar a qualidade da água e de pescados (PEREIRA et al., 2006; MOREIRA

et al., 2011; DALTRO et al., 2012; MIGNANI et al., 2013). Dessa forma, torna-se importante o monitoramento das águas e do pescado capturado nos estuários, devido a níveis de poluição elevados, a fim de evitar recorrentes surtos alimentares, principalmente porque alguns moluscos são consumidos *in natura* sem nenhum tipo de cocção prévia (DALTRO et al., 2012).

Por serem filtradores, os moluscos bivalves apresentam alto potencial de bioacumulação, refletindo diretamente nas condições do ambiente em que vivem (EVANGELISTA-BARRETO; SOUSA; VIEIRA, 2008). Nestes organismos são reportados com maior frequência os coliformes totais e termotolerantes (DALTRO et al., 2012; DOI; OLIVEIRA; BARBIERI, 2015), *Salmonella* sp. (NASCIMENTO et al., 2011), *Vibrio* spp. (JAKŠIĆ et al., 2002; PARVATHI; KUMAR; KARUNASAGAR, 2004; CANIGRAL et al., 2010).

Quanto as leveduras existem relatos em invertebrados marinhos como o camarão branco (*Penaeus schmitti*) (PAGNOCCA; MENDOÇA-HAGLER; HAGLER, 1989), diferentes espécies de moluscos bivalves como ostras (*Crassostrea virginica*), amêijoas (*Mercenaria mercenaria*), mexilhões (*Mytilus edulis*) (BUCK et al., 1977) e chumbinho (*Anomalocardia brasiliana*) (ARAUJO et al., 1995). Também foram relatadas em diferentes espécies de caranguejo como *Aratus pisonii*, *Goniopsis cruentata*, *Sesarma rectum* e *Uca* sp. (ARAUJO et al., 1995). O levantamento sobre leveduras nas espécies *Mytella guyanensis* e *Crassostrea rhizophorae* são excipiente, sendo que estes moluscos são abundantes na costa da Bahia e mais consumidos no nordeste brasileiro (EVANGELISTA-BARRETO, SOUSA e VIEIRA, 2008).

## **Leveduras**

Embora tradicionalmente estudada como grupo único, as leveduras são divididas entre os filos Ascomycota e Basidiomycota (ALMEIDA, 2005). São filogeneticamente heterogêneas, caracterizadas pela reprodução por brotamento e cissiparidade, produção de formas isoladas, simples, raramente formando um micélio rudimentar, nunca um micélio bem desenvolvido e, formação de colônia butirosa com certo brilho (PUTZKE e PUTZKE, 2004).

As leveduras podem ser encontradas em diferentes substratos e em diferentes condições, seja no ambiente terrestre ou aquático, sendo frequentemente isoladas de mares (GADANHO, SAMPAIO e SPENCER-MARTINS, 2003), rios e lagos (BOGUSLAWSKA-WAS e DABROWSKI, 2001), associadas à pele e intestino de animais, assim como em ambientes extremos, como os hipersalinos (BUTINAR et al., 2005).

Um dos primeiros relatos de leveduras isoladas de ambientes aquáticos foi realizado no mar da Índia (BHAT e KACHWALLA, 1955) e no mar da Florida (FELL et al., 1960). Já nos habitats estuarinos, os primeiros relatos ocorreram a partir da década de 70 em todo o mundo. Para estes ambientes é recorrente a associação entre a diversidade de leveduras encontradas com a disponibilidade de matéria orgânica e a temperatura, sobretudo devido ação antrópica (LAZARUS e KOBURGER, 1974; ROSA et al., 1990; MORAIS et al., 1996; PEÇANHA et al., 1996).

Em ambientes naturais, ocorre um aumento no número de espécies de leveduras como resposta ao aumento nos níveis de poluição (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981). O gênero *Candida* sp. foi considerado predominante em estuários poluídos, com sua ocorrência relatada em sedimentos de mangues no Rio de Janeiro (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981; SOARES et al., 1997; ARAUJO e HAGLER, 2010), sedimentos de mangue na China (CHI et al., 2012), assim como também foi o gênero predominante em estudos com invertebrados como o sururu do mangue (*M. guyanensis*) (ARAUJO et al., 2006). Nesses estudos *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. Krusei* foram as espécies mais encontradas e embora com menor frequência, outros gêneros também foram descritos como *Rhodotorula* spp., *Debaryomyces* spp, *Pichia* spp. e *Torulopsis* spp (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER 1981; SOARES et al., 1997; ARAUJO et al., 2006; ARAUJO e HAGLER 2010).

Estudos realizados com moluscos e água são considerados importantes, pois a presença de leveduras e bactérias nesses ambientes remete a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos (BUCK, BUBUCIS e COMBS, 1977). Sobretudo quando são encontradas diferentes espécies em ambientes que recebem efluentes domésticos, indicando contaminação recente e, geralmente, associadas com animais de sangue quente e o homem (WOOLLETT e HENDRICK, 1970).

Embora muitas espécies de leveduras estejam associadas a poluição, alguns autores correlacionam a presença de determinadas espécies, como *Kluyveromyces aestuarii*, sendo prevalentes em sedimento onde há vegetação típica de manguezal e associada aos invertebrados detritívoros que possuem estreita relação com esses sedimentos (ARAUJO et al., 1995; SOARES et al, 1997), indicando que estes ambientes encontram-se livres de contaminação. No estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro, a presença desta espécie foi relatada em locais preservados, sem impacto antrópico visível, com vegetação do mangue preservada (ARAUJO e HAGLER 2010).

São vários os estudos realizados com leveduras, porém a grande maioria se concentra no hemisfério Norte do planeta, com poucos relatos no Brasil, sendo que nenhum foi encontrado para a Bahia. Quando comparado com os estudos sobre as bactérias, muito pouco tem sido publicado em revistas indexadas sobre fungos presentes nos sedimentos de mangue globalmente, especialmente no Brasil (GHIZELINI, MENDONÇA-HAGLER e MACRAE, 2012).

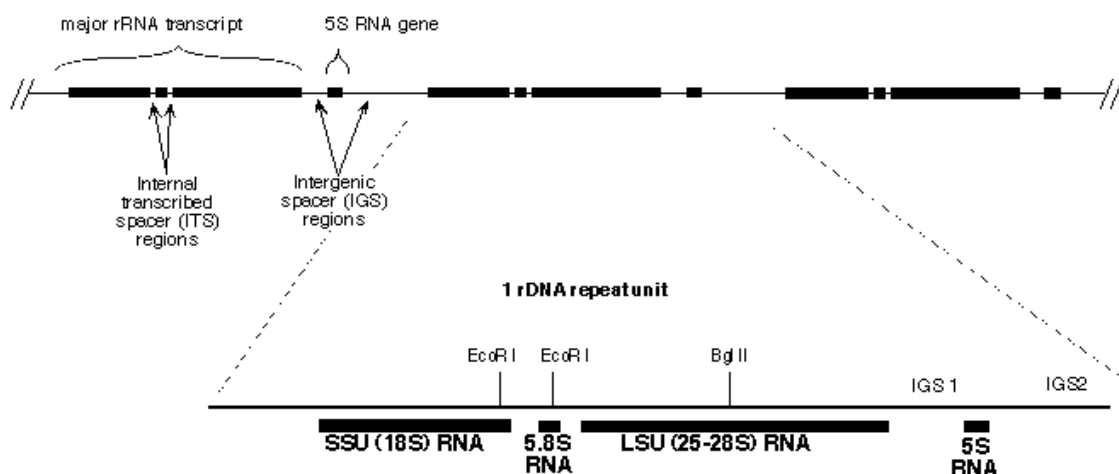
### **Abordagem molecular na taxonomia de leveduras**

Os estudos taxonômicos na identificação de leveduras tem sido intensificado, e com o passar dos anos, sendo a taxonomia convencional baseada principalmente na comparação de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos (KURTZMAN, FELL e BOEKHOUT, 2011). Contudo, os estudos moleculares estão agrupando muitas espécies e até gêneros antes diferenciados por características bioquímicas (KURTZMAN, 2014). Isto porque cepas que possuem características morfológicas e metabólicas diferentes podem pertencer a uma única espécie. Estas dúvidas levaram taxonomistas de leveduras a utilizarem métodos baseados em biologia molecular para a delimitação das espécies (SUH et al., 2006). Neste contexto, a caracterização molecular tornou-se uma ferramenta indispensável na identificação taxonômica de leveduras, agrupando organismos filogeneticamente relacionados dentro de um mesmo táxon, utilizando caracteres informativos no nível genético em conjunto com os testes convencionais (KURTZMAN e ROBNETT, 1998).

As diferentes técnicas que fazem abordagem da biologia molecular passaram a prevalecer na identificação de leveduras como a determinação da

porcentagem guanina + citosina (BOUNDY-MILLIS, 2006), aplicação de enzimas de restrição ao DNA (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (GUILLAMÓN et al., 1998; GRANCHI et al., 1999), análise de polimorfismos de DNA arbitrariamente amplificado (RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*) (CADEZ et al., 2003) e outros estudos que utilizam *primers* específicos ou regiões mini- e microssatélites – MSP-PCR, que é baseado na amplificação de regiões repetitivas em tandem para a identificação de leveduras (FELL, 1995; GADANHO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2001; ALMEIDA, 2005).

Dentre os métodos utilizados na identificação de leveduras, o sequenciamento de regiões do DNA ribossômico passou a ser amplamente aplicado, por ser de fácil reprodutibilidade e alta confiança. Em leveduras, assim como em outros eucariontes, os genes do RNA ribossômico (rRNA) estão codificados numa unidade de rDNA que se repete sequencialmente e, são normalmente utilizados para determinar a relação filogenética entre eles (TORTORA, 2005). Os genes ribossomais estão organizados em *clusters* possuindo os seguimentos 5,8S, 18S e 26S (Figura 3) que estão presentes em várias cópias no genoma. Os espaços internos transcritos (ITS) se intercalam entre esses genes e são denominados ITS1 e ITS2 (BARNETT, PAYNE e YARROW, 1990). Nesses genes existem regiões altamente conservadas, como os domínios 1 e 2 localizados na subunidade maior, que sofreram poucas mudanças ao longo do tempo.



**Figura 3.** Mapa mostrando em destaque a subunidade menor 18S (SSU) e a subunidade maior 25-28S (LSU) do gene rRNA de fungos.

Os primeiros autores a realizar o sequenciamento e comparação das sequências do domínio D2 da subunidade maior do gene do rRNA para identificação de leveduras foi Peterson e Kurtzman (1991), que compararam espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, e *Issatchenkia*. A partir do trabalho de Peterson e Kurtzman (1991), todas as leveduras ascomicéticas conhecidas tiveram as sequências do domínio D1 e D2 determinadas por Kurtzman e Robnett (1998). Já a sequência dos basidiomicetos foram estudadas por Fell et al. (2000).

A partir de então o método molecular de uso mais generalizado em estudos de taxonomia e para identificação de leveduras passou a se basear na comparação de sequências da região D1/D2 do gene do rRNA 26S e/ou do gene do rRNA 18S (GARNER et al., 2010; GROENEWALD, ROBERT e SMITH, 2011; HESHAM et al., 2014), mostrando-se eficiente para identificar leveduras de origem ambiental, como leveduras de mangue, sendo o sequenciamento da região D1/ D2 utilizado por diversos autores para identificar os seus isolados (ARAUJO e HAGLER 2010; CHI et al., 2012; MEDEIROS et al., 2012).

A investigação intensiva que foi desenvolvida nas últimas décadas evidenciou que a região D1/D2 exibe diferenças suficientes entre leveduras para que se possa avaliar relações intra- e interespecíficas (KURTZMAN e ROBNETT, 1998; FELL et al., 2000). A análise da sequência do domínio D1/D2 é um método rápido e fiável para identificação de espécies de leveduras e também foi demonstrado ser uma ferramenta valiosa para a descoberta de novas espécies (HERZBERG et al., 2002).

Segundo Kurtzman (2014), a aplicação da análise de sequência de genes e o desenvolvimento de um banco de dados *Barcode* de sequências facilmente determinadas como os domínios D1 / D2 da subunidade maior do rRNA e do espaçador interno transcrito (ITS) permitiram que muitos laboratórios identificassem as espécies com precisão e isso levou a uma duplicação do número de espécies conhecidas de leveduras ao longo da última década.

A maioria das espécies de leveduras podem ser diretamente identificadas por análise da sequência de D1/D2, alinhamento de dados obtidos no GenBank e colocação dentro de adequadas árvores filogenéticas. Alternativamente, as espécies podem ser identificadas através da região ITS, embora uma completa base de dados para a região ITS não tenha sido desenvolvida e avaliada (FELL et al., 2000). A importância de um sistema de diagnóstico a partir de único gene é

que à medida que novas espécies são descobertas, o banco de dados em contínua expansão fornece a documentação das espécies descritas bem como, evidências de espécies não descritas através ausência das suas sequências (KURTZMAN, 2014).

Entretanto, o estudo de apenas uma região pode não se mostrar tão eficiente para identificar espécies próximas, sobremaneira as que fazem parte de complexos de espécies como aquelas do gênero *Candida* (PETERSON e KURTZMAN 1991; DANIEL, SORRELL e MEYER, 2001; KURTZMAN, 2014). Faz-se necessário o uso de outras regiões que também encontram-se igualmente preservadas, como o gene que codifica a RNA polimerase II, subunidade 1 (RPB1) e 2 (RPB2), juntamente com a subunidade maior do rRNA principalmente em estudos que envolvem o sequenciamento de mais de uma região (KURTZMAN e ROBNETT, 2013).

O uso dessa região torna-se possível, uma vez que a maioria dos genes que codificam para subunidades de RNA polimerase II são essenciais para sobrevivência do micro-organismo (ARCHAMBAULT e FRIESEN, 1993), sendo que as RNA polimerase de levedura foram as mais amplamente investigadas e pode-se observar que a transcrição nuclear em *Saccharomyces cerevisiae* é realizada por três polimerases de RNA nucleares de múltiplas subunidades (RNAPs) que são conservadas em todos os eucariotos (SENTENAC, 1985).

## REFERÊNCIAS

ADORNO, E. V; SANTOS, E.S.; JESUS, T.B. Sig e regressão linear para avaliação ambiental das nascentes do rio Subaé em feira de Santana (BA) **Boletim Goiano de Geografia**, v. 33, n. 2, p. 221-238, 2013.

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

ANDRADE, M.F.; MORAES, L.R.S. Contaminação por chumbo em Santo Amaro desafia décadas de pesquisas e a morosidade do poder público. **Ambiente e Sociedade**. v.16, n.2, 2013.

ARAGÃO, L.G.T.; ALONZO, H.G.A. Representações sociais de saúde e doença: o caso de Santo Amaro da Purificação, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n.4, p. 973-990, 2005.

ARCHAMBAULT, J.; FRIESEN, J.D. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. **Microbiological Reviews** v. 57, n. 3, p. 703-724, 1993.

ARAUJO, E.V.; SOARES, C.A.G.; HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, p. 91-99, 1995.

ARAUJO, F.V.; MIGUEL, M.A.L.; HAGLER, A.N. Yeasts, including opportunistic pathogenic, associates of the *Mytella guyanensis*, in manguezal Coroa Grande, Baía de Sepetiba, RJ. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 143, p. 92-95, ago. 2006

ARAUJO, F.V.; HAGLER, A.N. Yeasts Associated with Mangrove sediments in Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Integrated Coastal Zone Management**, Número Especial 2, Manguezais do Brasil, 2010.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast Characteristics and Identification**. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge: University Press, Cambridge. 1990, 1200 p.



BHAT, J.V.; KACHWALLA, N. Marine yeasts off the indian coast. **Proceedings of the Indian Academy of Science**, v. 41, n. 1, p. 9-15, 1955.

BORGES, L.F.M.B.; DE ARAÚJO, N.S.; DOS SANTOS, P.S.; NASCIMENTO, D.M.C. Estudo de uso e ocupação da terra da bacia hidrográfica do rio Subaé – estado da Bahia XXVI Congresso Brasileiro de Cartografia V Congresso Brasileiro de Geoprocessamento XXV Expositocarta, 2014.

BOUNDY-MILLS, K. Methods for investigating yeast biodiversity. In: ROSA, C. A.; PETER, G. eds., **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**, Springer-Verlag, Berlin, p. 67-100, 2006.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura: 2011. Brasília: MPA, 2011. Disponível em: <[http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes\\_e\\_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf](http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011FINAL.pdf)>.

BOGUSLAWSKA-WAS, E.; DABROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, p. 451-458, 2001.

BUCK, J.D.; BUBUCIS, P.M.; COMBS, T.J. Occurrence of Human-Associated Yeasts in Bivalve Shellfish from Long Island Sound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 370-378, 1977.

BUTINAR, L.; SANTOS, S.; SPENCER-MARTINS, I.; OREN, A.; GUNDE-CIMERMAN, N. Yeast diversity in hypersaline habitats. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 229–234, 2005.

CADEZ, N.; POOT, G.A.; RASPOR, P.; SMITH, M.T. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov., *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov., *Hanseniaspora lachancei* sp. nov. and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov., novel apiculate yeast species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p 1671–1680, 2003.

CANIGRAL, I.; MORENO, Y.; ALONSO, J.L.; GONZALEZ, A.; FERRUS, M.A.

Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. **Microbiological Research**, v. 165, n. 8, p. 657-664, 2010.

CARVALHO, F.M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do recôncavo baiano. **Química Nova**, v.15, n.2, p.147- 54, 1992.

CHI, Z.; LIU, T.; CHI, Z.; LIU, G.; WANG Z. Occurrence and diversity of yeasts in the Mangrove ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan Provinces of China Indian. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p 346-353, 2012.

CONNELL, L. B.; REDMAN, R.; CRAIG, S.; SCORZETTI, G.; ISZARD, M.; RODRIGUEZ, R. Diversity of soil yeasts isolated from South Victoria Land, Antarctica. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 448–459, 2008.

DALTRO, A.C.S.; SILVA, I.P.; SOUZA, J.S.; SARAIVA, M.A.F.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S. *Enterococcus faecalis* isolated from bivalve molluscs in natura harvested from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. In: Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 11. Buenos Aires. Livro de resumos, p.209. 2012.

DANIEL, H.M., SORRELL, T.C., MEYER, W. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.1593-1606, 2001

DOI, S.A.; DE OLIVEIRA, A.J.F.C.; BARBIERI, E. Determination of coliforms in the water and soft tissue of oysters extracted in Cananéia, São Paulo, Brazil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 20, n.1, 2015.

DUARTE, A.W.F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F.S.; PAGNOCCA, F.C.; CHAUD, L.C.S.; PESSOA, A.; FELIPE, M.G.A.; SETTE, L.D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, p. 1023–1035, 2013.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; de SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 2, n. 2, p. 17 - 29, 2008.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SILVEIRA, C. S; PAIM, I. S.; SARAIVA, M. A. F. Avaliação do impacto ambiental no rio Subaé, São Francisco do Conde-BA, através de bioindicadores de contaminação fecal. **Magistra**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2013.

FELL, J.W.; AHEARN, D.G.; MEYERS, S.P.; ROTH, F.J.Jr. Isolation of yeast from Biscayne Bay, Florida and adjacent benthic areas. **Limnology Oceanography**, v. 5, p. 366-371, 1960.

FELL, J.W. rDNA target oligonucleotide primers for the identification of pathogenic yeasts in a polymerase chain reaction. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, p. 475-477, 1995.

FELL, J.W.; BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SCORZETTI, G.; STATZELL-TALLMAN, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, 1351–1371, 2000.

FELL J.W., STATZELL-TALLMAN A., SCORZETTI G., MARCELO H., GUTIÉRREZ M.H. Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 533-49. 2010.

GADANHO, M.; SAMPAIO, J.P.; SPENCER-MARTINS, I. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *R. azoricum* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, p. 213-221, 2001.

GARNER, C.D.; STARR, J.K.; MCDONOUGH, P.L; ALTIER, C. Molecular Identification of Veterinary Yeast Isolates by Use of Sequence-Based Analysis of the D1/D2 Region of the Large Ribosomal Subunit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 2140–2146, 2010.

GEOBRASIL (2002) - Perspectivas do Meio Ambiente no Brasil. Brasília. Edições IBAMA, 447p.

GHIZELINI, A.M.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.S.; MACRAE, A. Microbial diversity in Brazilian mangrove sediments – a mini review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1242–1254, 2012.

GRANCHI, L.; BOSCO, M.; MESSINI, A.; VINCENZINI, M. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiolog**, v. 87, p. 949-956, 1999.

GROENEWALD, M.; ROBERT, V.; SMITH, M.T. The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. **Persoonia**, v. 26, p. 40 – 46, 2011.

GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J.; QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Archives of Microbiology**, v.169, p. 387-392, 1998.

HAGLER, A.N.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. Yeasts from Marine and Estuarine Waters with Different Levels of Pollution in the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Appued and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 173-178, 1981.

HERZBERG, M.; FISCHER, R.; TITZE, A. Conflicting results obtained by RAPD-PCR and large-subunit rDNA sequences in determining and comparing yeast strains isolated from flowers: a comparison of two methods. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 52, p. 1423–1433, 2002.

HESHAM, A.E.; WAMBUI, V.; OGOLA, J.O.H.; MAINA, J.M. Phylogenetic analysis of isolated biofuel yeasts based on 5.8S-ITS rDNA and D1/D2 26S rDNA sequences. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, p. 37–43, 2014.

JAKŠIĆ, S.; UHITIL, S.; T PETRAK, T.; BAŽULIĆ, D.; KAROLYI, G, L; Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, v. 13, n. 8, p. 491–493, 2002.

KANDASAMY, K.; ALIKUNHI, N.M.; SUBRAMANIAN, M. Yeasts in marine and estuarine environments. **Journal of Yeast and Fungal Research**. v. 3, n. 6, p. 74 – 82, 2012.

KURTZMAN, C.P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 325–332, 2014.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Relationships among genera of the Saccharomycotina (Ascomycota) from multigene phylogenetic analysis of type species. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p. 23–33, 2013.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a taxonomic study**. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 2, 1062 p., 2011.

LAZARUS, C.R.; KOBURGER, J.A. Identification of Yeasts From the Suwannee River Florida Estuary. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1108-1111, 1974.

LEAL, D.A.G.; FRANCO, R.M.B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 10, p. 48-57, 2008.

MACHADO, S.L.; RIBEIRO, L.D.; KIPERSTOK, A.; BOTELHO, M.A.B.; CARVALHO, M.F. Diagnóstico da contaminação por metais pesados em Santo Amaro-BA. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 9, n. 2, p. 140-155, 2004.

MARQUES, H.L.A. **Criação Comercial de Mexilhões**. Editora Nobel, 1998.

MEDEIROS, A.O.; MISSAGIA, B.S.; BRANDÃO, L.R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, F.A.R.; ROSA, C.A. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the rio doce basin in southeastern brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1582-1594, 2012.

MIGNANI, L.; BARBIERI, E.; MARQUES, H.L.A.; OLIVEIRA, A.J.F.C. Coliform density in oyster culture waters and its relationship with environmental factors. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 833-840, 2013.

MORAIS, P.B.; RESENDE, M.A.; ROSA, C.A.; BARBOSA, F.A.R. Occurrence and dial distribution of yeast in a Paleo-karstic lake of Sotheastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 182-188, 1996.

MOREIRA, A.S.; LEÃO, M.V.P.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C.; SILVA, C.R.G. Qualidade sanitária da água e de bivalves *Iphigenia brasiliensis* (Lamarck, 1818) na praia do Jabaquara, Paraty, RJ. **Revista Biociências**, UNITAU, v. 17, n. 1, p. 66-71, 2011.

NAKANO, V.M. Teoria da fermentação e maturação. In: WORKSHOP ADEGAS, Brasília. Anais. Brasília: AMBEV, 2000, 96 p.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, v. 35, p. 871-76, 1983.

NASCIMENTO, V.A.; MITTARAQUIS, A.S.P.; TRAVÁLIA, B.M.; SANTOS, R.C.A.; NUNES, M.L.; DE AQUINO, L.C.L. Qualidade Microbiológica de Moluscos Bivalves - Sururu e Ostras submetidos a tratamento térmico e estocagem congelada. **Scientia Plena**, v 7, n. 4, 2011.

NISHIDA, A.K.; LEONEL, R.M.V. Occurrence, population dynamics and habitat characterization of *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Mollusca, Bivalvia) in the Paraíba do Norte river estuary. **Boletim do Instituto Oceanográfico** v.43, n.1, 1995.

OLIVEIRA, J.M.; SILVEIRA, C.S; SILVA, I.P.; BARRETO, N.S.E.; CAZETTA, M.L. Bolors e leveduras em moluscos bivalves e água como bioindicadores de

poluição hídrica da Bacia do Rio Subaé. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 1413-1415, 2011.

PAGNOCCA, F.G.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. **Yeast**, p. 479-83, 1989

PARVATHI, A.; KUMAR, H.S.; KARUNASAGAR, I. Detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* in oysters from two estuaries along the southwest coast of India, using molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 6909-13, 2004.

PEÇANHA, M.P.; PAGNOCCA, F.C.; RUGANI, C.A.; NEVES, F.A. Yeast and other parameters of pollution of Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 177-181, 1996.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis - Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 159-163, 2006.

PETERSON, S.W.; KURTZMAN, C.P. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 124–129, 1991.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Glossário Ilustrado de Micologia**. 1ª edição. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 152 p.

RIOS, K. A. N.; GERMANI, G. I. Espacialização da atividade pesqueira no estado da bahia: um olhar sobre a organização dos pescadores(as) artesanais. **IIº Seminário Nacional Espaços Costeiros**, 2013.

RODRIGUES, J.A.; GIUDICE, D.S. A pesca marítima artesanal como principal atividade socioeconômica: o caso de Conceição de Vera Cruz, BA. **Cadernos de Logepa**, v.6, n.2, p.115-139, 2011.

ROSA, C.A.; REZENDE, M.A.; FRANZOT, S.P.; MORAIS, P.B.; BARBOSA, F.A.R. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do Karst do planalto de Lagoa Santa, MG, Brasil. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 19-24, 1990.

SAMPAIO, J.P., GADANHO, M., SANTOS, S., DUARTE, F.L., PAIS, C., FONSECA, Á., FELL, J.W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodospordium*: *Rhodospordium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** p. 687-697, 2001.

SANTOS, L.T.S.O.; DE JESUS, T.B.; NOLASCO, M.C. Influência do uso e ocupação do solo na qualidade das águas superficiais do rio Subaé, Bahia. **Geographia Opportuno Tempore**, v.1, n. 1, p. 68-79, 2014.

SARAVANAKUMAR, K.; SENTHILRAJA, P.; KATHIRESAN, K. Bioethanol production by mangrove-derived marine yeast, *Sacchromyces cerevisiae*. **Journal of King Saud University – Science**, v. 25, p. 121-127, 2013

SENTENAC, A. Eukaryotic RNA polymerases. **CRC Critical Review in Biochemistry**. v. 18, n. 1, p. 31-90, 1985

SILVA, I.P.; PEREIRA, A.F.; SILVEIRA, C.S.; EVANGELISTA-BARRETO, N.S. Presença de *Salmonella* spp em um ambiente natural de extração de ostras. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 742-743, 2011.

SOARES, C.A.; MAURY, M.; PAGNOCCA, F.C.; ARAUJO, F.V.; MENDONCA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 43, p. 265-272, 1997.

SUH, S.; BLACKWELL, M.; KURTZMAN, C.P.; LACHANCE, M. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, p. 1006–1017, 2006.

TORTORA, G.R. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

VEIGA, I. G. Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos, Bahia. Universidade



Estadual do Norte Fluminense, Dissertação de Mestrado em Engenharia e Exploração de Petróleo, 2003. 205p.

WARD, J.E. Biodynamics of suspension-feeding in adult bivalve molluscs: particle capture, processing and fate. **Invertebrate Biology**, v.115, n.3, p. 218-231, 1996.

WOOLLETT, L.L., HEDRICK, L.R., TARVER, M.G. A statistical evaluation of the ecology of yeasts in polluted water. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, p. 437-444, 1970.

## **CAPÍTULO 1**

**Leveduras associadas aos moluscos bivalves *Mytella guyanensis* e *Crassostrea rhizophorae* e água no estuário do Rio Subaé, São Francisco do Conde, BA**

Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Anais da Academia Brasileira de Ciências*

## **Leveduras associadas aos moluscos bivalves, *Mytella guyanensi* e *Crassostrea rhizophorae* e água no estuário do Rio Subaé, Baía de Todos os Santos, BA**

### **Resumo**

O presente trabalho teve como objetivo identificar as leveduras isoladas da Bacia do rio Subaé isoladas de água, em 3 pontos do Rio Subaé, e de duas espécies de moluscos bivalves: sururu (*Mytella guyanensis*) e ostra (*Crassostrea rhizophorae*) que são os mais consumidos na costa do nordeste brasileiro. A identificação ocorreu a partir do sequenciamento dos domínios D1/D2 do DNA ribossomal e do gene que codifica a RNA polimerase II. No total foram obtidos 70 isolados de leveduras, ocorrendo predominância do Filo Ascomycota, com 48 representantes, frente ao Basidiomycota, com 17 isolados. Os isolados encontram-se distribuídos em dez gêneros, sendo eles *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Rhodosporidium*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Torulaspora*. Dentre os gêneros encontrados, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Debaryomyces* spp. e *Pichia* spp. foram os mais abundantes. Este é o primeiro relato relacionando identificação por métodos moleculares da comunidade de leveduras em moluscos bivalves na costa litorânea da Bahia. Além disso, o presente trabalho amplia o conhecimento da diversidade de leveduras associada a bivalves que são amplamente consumidos, podendo agir como mais um indicador da qualidade desses pescados, indicando também, o nível de poluição do rio Subaé.

Palavras-chave: leveduras aquáticas, diversidade de levedura, identificação, 26S, RPB2.

### **1. Introdução**

As áreas estuarinas são importantes do ponto de vista ecológico pela alta diversidade de espécies que habitam permanente ou provisoriamente este habitat, caracterizando elevada produtividade biológica (Lapointe e Clark 1992). Desse modo, desempenham funções biológicas que ressaltam a interesses econômicos e sociais como moradia, turismo e extrativismo, as quais geram impactos ambientais importantes. A maioria dos estuários brasileiros recebem diferentes tipos de efluentes como esgotos domésticos e industriais (Almeida 2001). Adicionalmente, ocorre o influxo de contaminantes físicos, químicos e microbiológicos, inclusive de patógenos oportunistas que, podem mudar a dinâmica populacional deste ambiente, sobretudo dos pescados que são

consumidos e comercializados in natura (Barbieri e Doi 2011; Barros e Barbieri 2012; Doi et al. 2012).

O estuário da Bacia do rio Subaé apresenta-se como importante local de pesca extrativista no Recôncavo da Bahia, compreendendo os últimos 10 Km do seu baixo curso, cercado por manguezais (Veiga 2003) e apresenta sérios sinais de impactos ambientais nos seus principais cursos d'água, decorrentes do despejo de efluentes domésticos e industriais, atividades agropecuárias e extrativistas que ocorrem desde as suas nascentes no município de Feira de Santana até sua foz na Baía de Todos os Santos (Santos et al. 2014).

Estudos recentes demonstraram que as águas do rio Subaé sofrem com elevada contaminação fecal apresentando diversos micro-organismos do grupo dos coliformes com elevada contagem desses micro-organismos (OLIVEIRA et al. 2011; EVANGELISTA-BARRETO et al. 2013), bem como de bolores e leveduras. Neste mesmo local também foi confirmada a presença de *Salmonella* spp., servindo de alerta quanto à poluição do ambiente principalmente no que diz respeito ao despejo de esgotos (SILVA et al. 2011).

O sururu do mangue (*Mytella guyanensis*) (Lamarck 1819) (Mollusca, Bivalvia) é uma espécie que vive em águas salobras, enterrados no leito a cerca de 1,0 cm de profundidade, ocorrendo em estuários e mangues do Brasil desde o Amapá até Santa Catarina (Nishida e Leonel 1995; Marques 1997). A ostra *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) é uma espécie típica de zonas tropicais e ocorre principalmente fixada às raízes aéreas de mangue vermelho, *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) ou sobre zonas entremarés e costões rochosos (Nascimento 1983). Esta é uma das principais espécies de bivalves consumidas no nordeste brasileiro (Evangelista-Barreto et al. 2008).

A ocorrência de leveduras em estuários e seus sedimentos tem sido relatados em estudos que visam monitorar a qualidade da água, sendo utilizadas como bioindicadores da condição ambiental (Hagler e Medonça-Hagler 1981; Araujo et al. 1995; Araújo e Hagler 2010; Chi et al. 2012). Algumas espécies de leveduras, como *Candida tropicalis* e *C. krusei* são reportadas e utilizadas como indicadores de poluição quando associadas à presença de animais de sangue quente. Já as espécies de *Kluyveromyces aestuarii* são reportadas como bioindicadoras de áreas preservadas ou livres de impactos antropogênicos (SOARES et al. 1997).

Estudos que visam à identificação de leveduras por meio do sequenciamento de regiões *barcode* do DNA ainda são incipientes no Brasil, sobretudo na costa do Nordeste, principalmente quando envolvem leveduras isoladas de moluscos bivalves, os quais são organismos filtradores e bioacumuladores (Pereira et al. 2006; Zanette et al. 2006), que podem servir de indicativo de controle ambiental. Outra preocupação são os surtos alimentares que são frequentes pelo consumo in natura de alguns moluscos bivalves extraídos de ambientes estuarinos (Evangelista-Barreto et al. 2008).

Considerando a importância, influência social e econômica do Rio Subaé para o Nordeste brasileiro, principalmente para a Bahia, e ressaltando a região estuarina, onde são coletados os pescados, foi realizado o presente estudo de identificação de leveduras de água, ostra e sururu. Os dados obtidos podem contribuir com o monitoramento ambiental, evitar surtos alimentares e disponibilizar informações sobre leveduras com aplicação biotecnológica, sobremaneira por ser o primeiro relato de leveduras de estuários na costa do litoral da Bahia.

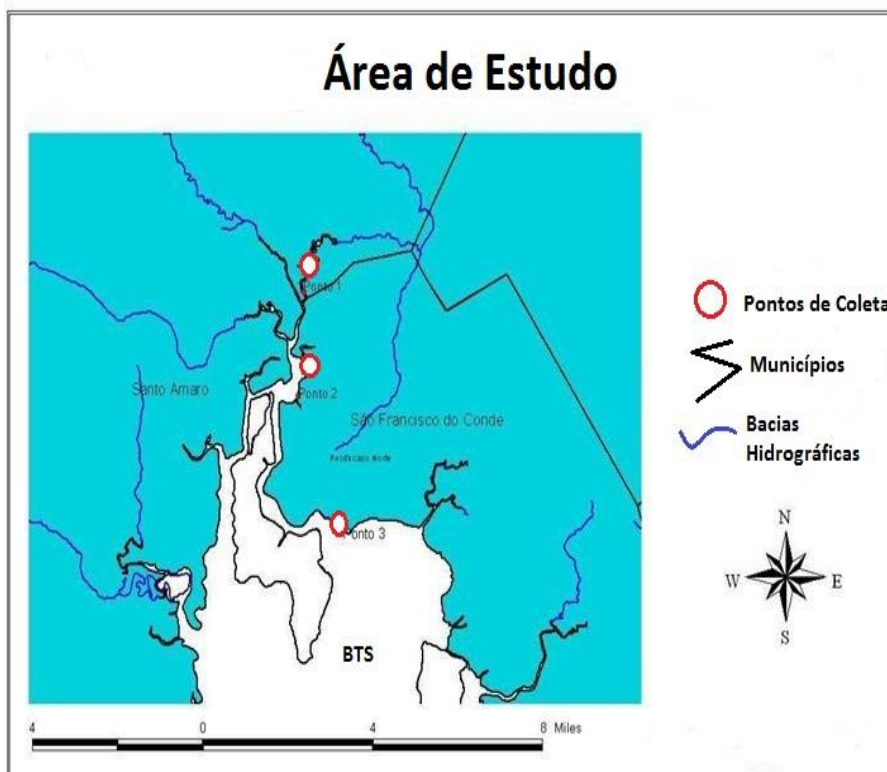
## 2. Material e Métodos

### 2.1 Amostragem

No período de novembro de 2010 a novembro de 2011 foram realizadas coletas de água, ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e sururu do mangue (*Mytella guyanensis*) da bacia do rio Subaé no município de São Francisco do Conde.

As coletas de água aconteceram em três pontos amostrais que foram designados de P1: 12° 33' 52.4" S 038° 41' 40.5"W; P2: 12° 35' 35.8" S 038° 41' 47.7"W e P3: 12° 37' 52.9" S 038° 40' 55.0"W (Figura 1). As amostras de água foram armazenadas em garrafas de vidro âmbar esterilizadas com capacidade de 1000 mL e os moluscos foram colocados em sacos plásticos, acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo e transportados para os Laboratórios de Qualidade de Água e Microbiologia no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura e Laboratório de Bioquímica na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. As amostras de sururu e ostras foram obtidas do extrativismo local, totalizando 60 unidades de ostras e 80 de sururu do mangue.

Em todas as coletas os parâmetros hidrológicos como pH, temperatura e salinidade foram obtidos por sonda multiparâmetros (Hanna H1®).



**Figura 1:** Área de coleta indicando os pontos amostrais. Os círculos no mapa destacam os três pontos de coleta para água.

## 2.2 Isolamento de leveduras da água, sururu do mangue e ostras

Para as análises, 25 g de cada molusco e 25 ml da amostra de água dos três pontos coletados foram diluídas em 225 ml de solução salina 0,85% e, após sucessivas diluições das amostras até  $10^{-4}$ , inóculos de 1 mL de todas as diluições foram transferidos para em placas de Petri com o meio ágar Sabouraud Dextrose contendo cloranfenicol. As placas foram incubadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  durante cinco dias quando então foi realizada a leitura dos resultados. Nas placas com crescimento de colônias compatíveis com leveduras, realizou-se a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Ao observar o crescimento de colônias de leveduras, as mesmas foram purificadas através da técnica de esgotamento e armazenadas em freezer  $-80^\circ\text{C}$  no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do CCAAB.

### 2.3. Identificação molecular das leveduras

A extração de DNA dos isolados foi realizada com o Kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo a recomendações do fabricante. As reações de PCR foram feitas para amplificar a região D1/D2 do gene codificador da subunidade maior do ribossomo (LSU) do rDNA utilizando os *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'DONNELL, 1993). Para algumas amostras foram feitas análises complementares utilizando os *primers* RPB2-5f e RPB2-7cr que amplificam parte do gene da RNA polimerase II (Liu et al. 1999; Reeb et al. 2004). Para ambas as ampliações foram utilizados os seguintes reagentes e concentrações: 30 ng DNA, 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase, 3,7 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 pmol/μL de dNTPs, 0,4 pmol/μL de cada primer, 5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μL com água ultra pura estéril. Foram incluídos nos experimentos 30 ng de DNA de *Saccharomyces cerevisiae*, como controle positivo. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 0,8%, corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. Os fragmentos obtidos foram purificados com o kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit" (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida os *amplicons* foram sequenciados pelo sequenciador automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA (Porto Alegre-RS). A edição e montagem das sequências foi realizada com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). A identidade taxonômica dos isolados foi estudada a partir do banco de dados GenBank, utilizando o BLASTn "basic local alignment search tool" (BLAST) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



## 2.4 Análises dos dados

Para avaliar a influência da temperatura e salinidade no isolamento de leveduras das amostras de água, sururu e ostra foram utilizados os dados obtidos através da sonda multiparâmetros (Hanna H1®). As médias de cada parâmetro analisado foram submetidas à análise de regressão linear, não-linear e múltipla, para selecionar os modelos com os melhores ajustes com base no coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e no quadrado médio do resíduo (QMR), enquanto a significância das regressões foi verificada pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises de regressão foram efetuadas com o programa SigmaPlot® Versão 11.0.

## 3. Resultados

Foram obtidos 70 isolados de leveduras, sendo sete das amostras de água, 15 de ostras e 48 de sururu do mangue.

A maioria das espécies identificadas pertence ao filo Ascomycota, distribuídas em sete gêneros, e três gêneros do filo Basidiomycota (Tabela 1). Os gêneros mais representativos foram *Candida* sp. (14 isolados), *Rhodotorula* sp. (13 isolados), *Debaryomyces* sp. (12 isolados) e *Pichia* sp. (11 isolados). Para isolados que apresentaram sequenciamento com *amplicon* menor que 450 pares de base, assim como espécies que fazem parte de espécies, ou existem relatos na literatura, que são patogênicas, foi realizado o sequenciamento da segunda região para maior confiabilidade na identificação realizada.

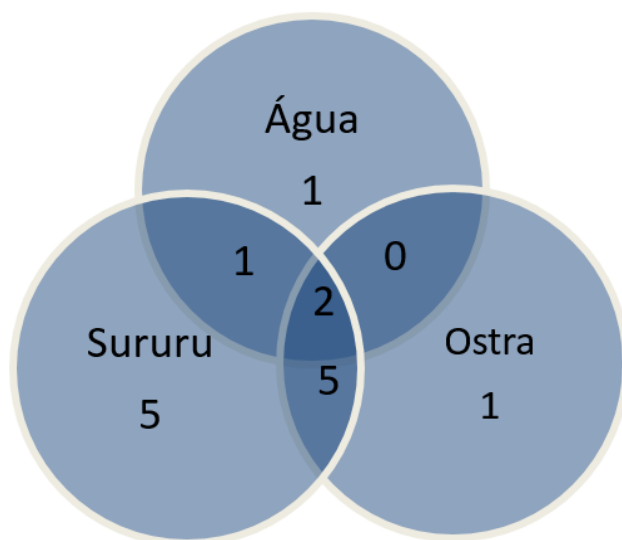
**Tabela 1.** Identificação molecular das leveduras isoladas de água, sururu do mangue e ostra da Bacia do rio Subaé, Bahia, Brasil.

Filo	Amplicon (bp) <sup>1,2,3</sup>	taxa	Número de acesso GenBank		Amostra		
			D1/D2 <sup>4</sup>	RBPII <sup>4</sup>	A	O	S
Ascomycota	616	<i>Candida cylindracea</i>	EU011644.1		-	-	P <sup>5</sup>
	516	<i>Candida orthopsilosis</i>	KJ817161.1	XM_003868133.1	P	-	P
		<i>Candida sp.</i>				P	P
	473	<i>Candida stellata</i>	EF452199.1		-	P	-
	538	<i>Candida tropicalis</i>	EU543686.1	JN993582.1	-	-	
	650	<i>Debaryomyces hansenii</i>	KT304211.1	JQ 698984.1	-	P	P
	486	<i>Hanseniaspora sp.</i>	FM180537.1		-	P	P
	395	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KJ491106.1	AY497623.1	-	-	P
	563	<i>Pichia guilliermondii</i>	JQ686899.1		-	P	P
	594	<i>Pichia kudriavzevii</i>	KC454395.1	AF 107788.1	P	P	P
	572	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KP768108.1		-	P	P
	571	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	KT933340.1	JQ698956.1	-	-	P
	350	<i>Torulaspora pretoriensis</i>	KF300887.1		-	-	P
	Basidiomycota	485	<i>Cryptococcus curvatus</i>	AF189834.1	AB919798.1	-	-
601		<i>Cryptococcus laurentii</i>	AF459662.1		-	-	P
577		<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	FJ515238		-	-	P
530		<i>Rhodotorula minuta</i>	KF811422.1		P	-	-
541		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KJ004455.1		P	P	P

<sup>1</sup>Todos os fragmentos amplificados foram sequenciados em ambas as direções (F-Forward e R-reverse), os amplicons correspondem aos contigs gerados no Sequencer 4.1.4; <sup>2</sup>'e-values' foram iguais a zero para todos os isolados; <sup>3</sup>Identidade (pb) e cobertura (%) foram  $\geq 98$  para todos os isolados; <sup>4</sup>Números de acesso correspondem às sequências descritivas dos taxa indicados. P-presença de levedura na amostra; A=água; O=ostra e S=sururu.

A maioria das espécies identificadas foi isolada apenas em amostras de sururu, como *Candida cylindracea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus laurentii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Torulaspora delbrueckii*. Por outro lado, *Rhodotorula minuta* foi identificada apenas em amostras de água e *Candida stelatta* apenas em ostras (Tabela 1). As outras espécies identificadas

ficaram distribuídas nos três tipos de amostras. De acordo com o diagrama de Venn (Figura 2) é possível observar que o número de espécies em comum para os três tipos de amostras é relativamente baixo frente ao número total de espécies descritas.



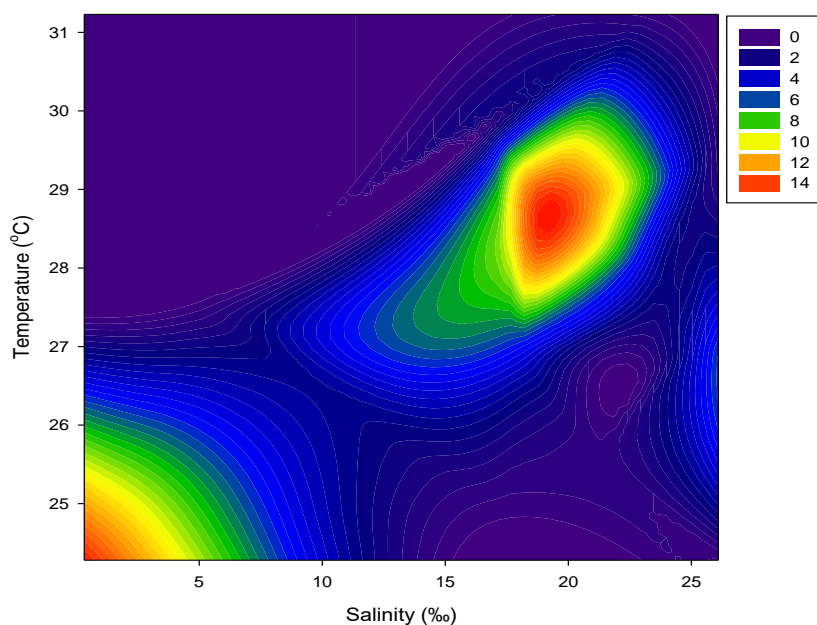
**Figura 2-** Diagrama de Venn mostrando o número de espécies comuns às três diferentes amostras analisadas.

No estuário do Rio Subaé são coletados, por extrativismo, alguns dos moluscos bivalves mais consumidos e comercializados do Nordeste do Brasil. Portanto, a presença de espécies patogênicas pode representar riscos à saúde não somente de consumidores locais, mas para o contingente de turistas que comumente visitam a região.

De acordo com as análises estatísticas, não houve interação significativa entre os parâmetros de temperatura e salinidade para o isolamento de leveduras em amostras de água. Entretanto, para sururu do mangue e ostra foi possível encontrar uma relação entre o número de isolados encontrados e os parâmetros hidrológicos. O modelo Gaussiano 3D proporcionou ajuste no número de isolados de leveduras em função da temperatura e salinidade com coeficientes de

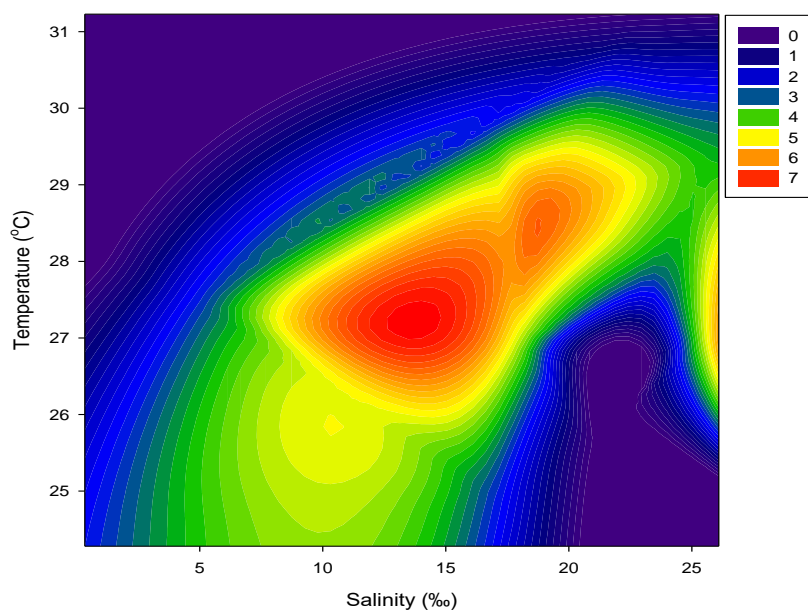
determinação ( $R^2$ ) variando entre 95% para o sururu (Figura 3) e 96,7% para a ostra (Figura 4).

As curvas de contorno indicam que houve interação entre os parâmetros temperatura e salinidade e a contagem de unidades formadoras de colônias de leveduras em sururu ( $10^2$  UFC/g) (Figura 3). Este modelo permitiu estimar temperaturas ótimas na faixa de 27 °C a 28 °C para a maior contagem de leveduras ( $1,0 \times 10^3 - 1,4 \times 10^3$  UFC/g) e salinidade entre 18 ‰ e 23 ‰, embora também tenha sido observada a mesma contagem para temperatura e salinidade bem inferiores a estas (>25 °C e >5‰).



**Figura 3-** Curva de contorno evidenciando o efeito da temperatura e salinidade no isolamento de leveduras em amostras de sururu do mangue (*Mytella guyanensis*).

Resultados similares foram observados nas contagens obtidas de amostras de ostra (Figura 4). Entretanto, em comparação com o sururu do mangue, o número de isolados obtidos foi menor nas ostras ( $7 \times 10^2 - 5 \times 10^2$ ) para a mesma média de temperatura entre  $27 \pm 1$  °C e menor salinidade (15 e 17‰).



**Figura 4-** Curva de contorno evidenciando o efeito da temperatura e salinidade na contagem de unidades formadoras de colônias de leveduras em ostra (*Crassostrea rhizophorae*).

#### 4. Discussão

O número de leveduras isoladas neste estudo (n=70; 16 espécies), revela que o ambiente estuarino é propício para o crescimento destes fungos e reflete a importância de isolar e identificar leveduras de ambientes marinhos, especialmente de locais com impacto antropogênico utilizados para atividades de extrativismo.

Há predominância do filo Ascomycota (n=48) quando comparado com o filo Basidiomycota (n=17), o que também ocorre em outros ambientes aquáticos do Brasil (Araujo et al. 1995; Araujo e Hagler 2010; Medeiros et al. 2012). Foi observado que a maioria das espécies identificadas pertence aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* e *Pichia*, os quais já foram descritos em estuários do Brasil (Soares et al. 1997; Coelho et al. 2010; Araujo e Hagler 2010),

China (Chi et al. 2012) e Europa (Richard et al. 2015), incluindo Portugal (Gadanhó 2003).

As espécies *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus laurentii*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram-se com frequência nos estudos em ambientes aquáticos e, principalmente, estuarino (Combs et al. 1971; Hagler e Mendonça-Hagler 1981; Roth et al. 2003; Soares et al. 1997; Butinar et al. 2005; Araujo e Hagler 2010; Coelho et al. 2010; Loureiro et al. 2011; Chi et al. 2012; Medeiros et al. 2012; Richard et al. 2015), podendo indicar que crescem e persistem dentro do habitat, sendo consideradas autóctones de sistemas aquáticos (Botha 2011). Adicionalmente, muitas espécies encontradas com grande frequência podem ser consideradas também alóctones, provavelmente oriundas de contaminação fecal, demonstrando o comprometimento dos ecossistemas estuarinos devido à poluição (Araujo e Hagler 2010) e, em função disto, a microbiota dos moluscos recém-capturados reflete a qualidade da água onde se encontram.

Já para as espécies *Candida cylindracea*, *C. orthopsilosis*, *C. stellata*, *Cryptococcus curvatus*, *Kluyveromyces marxianus* e *Torulaspora delbrueckii* existem pouquíssimos relatos na literatura de seu isolamento de ambientes aquáticos (Buck et al. 1976; Araujo e Hagler 2010; Chi et al. 2012; Medeiros et al. 2012) podendo ser consideradas alóctones e, provavelmente, provenientes de fora do sistema, carregadas pelo vento e chuva (Botha 2011).

Para a ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e o sururu do mangue (*Mytella guyanensis*) a influência da salinidade e temperatura no isolamento de leveduras pode ser explicada pelo hábito alimentar semelhante, por filtração branquial

(Pereira et al. 2006; Galvão et al. 2009). Já o modo de vida diferente destes moluscos pode ter influenciado no número de isolados de leveduras obtidos, uma vez que o sururu do mangue vive enterrado no sedimento (Nishida e Leonel 1995; Pereira 2007) e as ostras fixas às raízes aéreas de mangue (Nascimento 1983; Rios 1994; Lazoski 2011).

Espécies potencialmente patogênicas como *Candida orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *Rhodotorula sp.* e *Cryptococcus sp.* estão associadas a fezes de animais e poluição antropogênica, servindo como bioindicadoras de qualidade ambiental (Hagler 2006), além de serem espécies capazes de colonizar pacientes imunocomprometidos (Wirth e Goldani 2012). Portanto, como estas espécies foram isoladas de água, sururu do mangue e ostra denotam uma preocupação não somente ambiental, mas de saúde pública, devido à possibilidade de ocorrências de surtos alimentares, pois esses moluscos são, muitas vezes, consumidos in natura.

## 5. Referências

ALMEIDA MA, CUNHA MA, ALCANTARA F. 2001. Factors influencing bacterial production in a shallow estuarine system. FEMS Microbiol. Ecol. 42: 416-426.

ARAUJO EV, SOARES CAG, HAGLER AN, MENDONÇA-HAGLER LC. 1995. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. A Van Leeuw J Microb 68: 91-99.

ARAUJO FV AND HAGLER AN. 2010. Leveduras associadas a sedimentos em diferentes manguezais fluminenses. Gerenciamento Costeiro Integrado. Ano 4, n. 6

BANJARA N, NICKERSON KW, SUHR MJ, HALLEN-ADAMS HE. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. Int J Food Microbiol 222: 23–29.

BARBIERI E AND DOI SA. 2011. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp. Mar Freshw Behav Phy 44: 251-263.

BARROS D AND BARBIERI E. 2012. Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliiana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananéia, SP (Brasil). *O Mundo da Saúde*, São Paulo 36: 635-642.

BELY M, STOECKLE P, MASNEUF-POMAREDE I, DUBOURDIEU D. 2008. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int J Food Microbiol* 122: 312–320.

BOGUSLAWSKA-WAS E AND DABROWSKI W. 2001. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *Int J Hyg Environ Health* 203: 451-458.

BOTHA A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biol Biochem* 43: 1-8.

BRAHIMI-HORN MC, GUGLIELMINO ML, ELLING L, SPARROW LG. 1990. The esterase profile of a lipase from *Candida cylindracea*. *BBA-Lipid Lipid Met* 1042: 51-54.

BUCK JD, BUBUCIS PMA, COMBS TJ. 1977. Occurrence of Human-Associated Yeasts in bivalve shellfish from Long Island sound *Appl Environ Microb* 33: 370-378.

BUTINAR L, SANTOS S, SPENCER-MARTINS I, OREN A, GUNDE-CIMERMAN N. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats *FEMS Microbiol Lett* 244: 229–234.

CANO-GARCÍA L, RIVERA-JIMÉNEZ S, BELLOCH C, FLORES, M. 2014. Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chem* 151: 364–373.

CHEN YU C, TAO ZHOU T, SHENG K, ZENG L, YE C, YU T, ZHENG X. 2013. Effect of pyrimethanil on *Cryptococcus laurentii*, *Rhodospiridium paludigenum*, and *Rhodotorula glutinis* biocontrol of *Penicillium expansum* infection in pear fruit *Int J Food Microbiol* 164: 155–160.

CHI Z, LIU T, CHI Z, LIU G, WANG Z. 2012. Occurrence and diversity of yeasts in the mangrove ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan provinces of China *Indian. J Microbiol* 52: 346-353.

COELHO MA, ALMEIDA JMF, MARTINS IM, SILVA AJ da, SAMPAIO JP. 2010. The dynamics of the yeast community of the Tagus river estuary: testing the hypothesis of the multiple origins of estuarine yeasts. *A Van Leeuw J Microb* 98: 331–342.

COMBS TJ, MURCHELANO RA, JURGEN F. 1971. Yeasts isolated from long island sound. *Mycologia* 63:178-181.

CORRAL S, SALVADOR A, BELLOCH C, FLORES M. 2014. Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. *Food Control* 45: 1–7.



DOI SA, COLLAÇO FL, STURARO LGR, BARBIERI E. 2012. Efeito do chumbo em nível de oxigênio e amônia no camarão rosa (*Farfantepenaeus paulensis*) em relação à salinidade. *O Mundo da Saúde*, São Paulo 36: 594-601.

DUARTE AWF, DAYO-OWOYEMI I, NOBRE FS, PAGNOCCA FC, CHAUD LCS, PESSOA A, FELIPE MGA, SETTE LD. 2013. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. *Extremophiles* v. 17, p. 1023–1035.

ELGHARBAWY AA, ALAM MDZ, SALLEH HM. 2014. Kinetics of lipase production from *Candida cylindracea* by solid-state bioconversion of palm kernel cake. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci* 16: 523-528.

EVANGELISTA-BARRETO NS, de SOUSA O V, VIEIRA RHSF. 2008. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. *Rev Bras Hig San Anim* 2: 17 - 29.

GADANHO M, ALMEIDA JMGCF, SAMPAIO JP. 2003 Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *A Van Leeuw J Microb* 84: 217–227.

GALVÃO PMA, REBELO MF, GUIMARÃES JRD, TORRES JPM, MALM O. 2009. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. *Braz J Aquat Sci Technol* 13: 59-66.

GARGEL CA, BAFFI MA, GOMES E, DA-SILVA R. 2014. Invertase from a *Candida stellata* strain isolated from grape: production and physicochemical characterization. *J Microbiol Biotechnol Food Sci* 4.1: 24-28.

GETHINS L, GUNESER O, DEMIRKOL A, REA M C, CATHERINE STANTON C, ROSS R P, YUCEER Y, MORRISSEY JP. 2015. Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast* 32: 67–76.

HAGLER AN e MENDONÇA-HAGLER LC. 1981. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil *Appl Environ Microbiol* 41: 173-178.

HAGLER AN. 2006. Yeasts as Indicators of Environmental Quality. In: Gábor P, Rosa C, editors. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer; Berlin: 2006. pp. 515–532.

LAPOINTE BE AND CLARK MW. 1992 Nutrient inputs from the watershed and coastal eutrophication in the Florida keys. *Estuaries* 15: 465-476.

Mar Ecol-Prog Ser 426: 197-212.

- LI M, LIU G-L, CHI Z, CHI Z-M. 2010. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass Bioenerg* 34:101–107.
- LIBKIND D, BRIZZIO S, BROOCK M. 2004. *Rhodotorula mucilaginosa*, a carotenoid producing yeast strain from a patagonian high-altitude lake. *Folia Microbiol* 49:19–25.
- LIU YL, WHELEN S, HALL BD. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Mol Biol Evol* 16: 1799-1808.
- LOUREIRO STA, CAVALCANTI MAQ, NEVES RP, PASSAVANTE JZO. 2011. Leveduras isoladas de sedimento do manguezal de barra das jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. *Trop Oceanogr* 39: 60-68.
- MARQUES HLA. Criação Comercial de Mexilhões. Editora Nobel, 1998.
- MEDEIROS AO, MISSAGIA BS, BRANDÃO LR, CALLISTO M, BARBOSA FAR, ROSA CA. 2012. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in southeastern Brazil. *Braz J Microbiol* 1582-1594.
- MORRISSEY JP, ETSCHMANN MMW, SCHRADER J, BILLERBECK GM de. 2015. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. *Yeast* 32: 3–16.
- NASCIMENTO, IA. 1983. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. *Cienc Cult* 35: 871-76.
- NEVES KCS, PORTO ALF, TEIXEIRA MFS. 2006. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amaz* 36: 299 – 306.
- NISHIDA AK, LEONEL RMV. 1995. Occurrence, population dynamics and habitat characterization of *Mytella guyanensis* (Lamarck, 1819) (Mollusca, Bivalvia) in the Paraíba do Norte river estuary. *Bol Inst Oceanogr* 43.1:41- 49.
- O'DONNELL K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Ed). *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic*. CAB International, Wallingford, UK, p. 225-233.
- ODA Y, HIROMI K, TONOMURA K 1993. Purification and Characterization of  $\alpha$ -Glucosidase from *Torulaspora pretoriensis* YK-1. *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1902-1905.
- PEREIRA MA, NUNES MM, NUERNBERG L, SCHULZ D, BATISTA CRV. 2006. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. *Braz J Microbiol* 37: 159-163.

PEREIRA OM, GALVÃO MSN, PIMENTEL CM, HENRIQUES MB, MACHADO IC. 2007. Distribution of natural beds and stocks estimate of Genera *Mytella* in the Cananéia estuary, São Paulo State, Brazil. *Braz J Aquat Sci Technol* 11: 21-29.

REEB V, LUTZONI F, ROUX C. 2004 Contribution of RPB2 to multilocus phylogenetic studies of the euascomycetes (Pezizomycotina, Fungi) with special emphasis on the lichen-forming Acarosporaceae and evolution of polyspory. *Mol Phylogenet Evol* 32: 1036-1060.

RENAULT P, MIOT-SERTIER C, MARULLO P, HERNANDEZ-ORTE P, LAGARRIGUE, L. 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspora delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 134: 201–210.

RICHARDS TA, LEONARD G, MAHE F, CAMPO, J, ROMAC S, MEREDITH M DM, MAGUIRE F, DUNTHORN M, VARGAS C, MASSANA R, CHAMBOUVET A. 2015. Molecular diversity and distribution of marine fungi across 130 European environmental samples. *Proc R Soc B* 282: 20152243.

RIOS EC. Seashells of Brazil. Rio Grande, RS, Ed. Fundação Universidade Rio Grande, 1994. 368 p.

ROSA CA, REZENDE MA, FRANZOT SP, MORAIS PB, BARBOSA FAR. 1990. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do Karst do planalto de Lagoa Santa, MG, Brasil. *Rev Microbiol* 21: 19-24.

ROTH FJ, AHEARN DG, JACK W, FELL JW, SARNUEL P, MEYER SA. 1962. Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. *Limnol Oceanogr* 7: 178–185.

SANKH S, THIRU M, SARAN S, RANGASWAMY V. 2012. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Bioresour Technol* 124: 77–82.

SARAVANAKUMAR K, SENTHILRAJA P, KATHIRESAN K. 2013. Bioethanol production by mangrove-derived marine yeast, *Sacchromyces cerevisiae*. *J King Saud Univ Sci* 25: 121–127.

SOARES CA, MAURY M, PAGNOCCA FC, ARAUJO FV, MENDONCA-HAGLER LC, HAGLER AN. (1997) Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. *J Gen Appl Microbiol* 43: 265-272.

SUBRAMANIAN M, ALIKUNHI NM. KANDASAMY K. 2010. *In vitro* synthesis of silver nanoparticles by marine yeasts from coastal mangrove sediment. *Adv Sci Lett* 3:428–433.

TAILLANDIER P, LAI QP, JULIEN-ORTIZ A, BRANDAM C. 2014. Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: influence of inoculation and nitrogen content. *World J Microbio Biotechnol* 30: 959-967.

TCHAKOUTEU SS, CHATZIFRAGKOU A, KALANTZI O, KOUTINAS AA, AGGELIS G, PAPANIKOLAOU S. 2015. Oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* exhibits interplay between biosynthesis of intracellular sugars and lipids. Eur J Lipid Sci Tech 117: 657–672.

WANG GY, CHI Z, SONG B, WANG ZP, CHI ZM. 2013. High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. Bioresour Technol 106: 690–696.

WIRTH F, GOLDANI LZ. 2012. Epidemiology of *Rhodotorula*: An Emerging Pathogen. Interdiscip Perspect Infect Dis 2012, Article ID 465717, 7 pages. doi:10.1155/2012/465717 2012:1-7.

YU X, GUO N, CHI Z, GONG F, SHENG J, CHI Z. 2009. Inulinase overproduction by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. Biochem Eng J 43: 266–271.

ZANETTE J, MONSERRAT JM, BIANCHINI, A. 2006 Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 143: 187-195.

## **CAPÍTULO 2**

### **Primeiro relato de cinco espécies de leveduras isoladas em tecido intervalvar de moluscos bivalves na cidade de São Francisco do Conde, BA, Brasil**

Short communication formatado de acordo com as normas da revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

## **Primeiro relato de cinco espécies de leveduras isoladas em tecido intervalvar de moluscos bivalves da Bacia do Rio Subaé, BA, Brasil**

### **Resumo**

O objetivo desse trabalho foi identificar espécies de leveduras isoladas de moluscos bivalves in natura, principalmente as que apresentam patogenicidade ao homem. As leveduras foram isoladas de duas espécies de moluscos bivalves: sururu (*Mytella guyanensis*) e ostra (*Crassostrea rhizophorae*). A identificação ocorreu a partir do sequenciamento dos domínios D1/D2 e da construção de árvores filogenéticas com as sequências obtidas. Foram obtidos 9 isolados, os quais foram identificados em cinco espécies de leveduras, sendo que quatro pertencem ao gênero *Candida* e cinco pertencem ao gênero *Hanseniaspora*, o qual foi o único a ser encontrado nos dois moluscos. Este é o primeiro relato das espécies citadas nesse comunicado para isolamento em moluscos bivalves. Duas das espécies encontradas foram consideradas patogênicas ao homem em diferentes estudos, apresentando caráter de multirresistência a antifúngicos.

Palavras-chave: *Candida haemulonis*; *Hanseniaspora opuntiae*; sequenciamento; primeiro relato.

### **Introdução**

As regiões estuarinas constituem ambientes fundamentais para o equilíbrio ecológico, atuando como área de criação, abrigo constante ou transitório de diferentes espécies da fauna marinha, incluindo crustáceos e moluscos, que são considerados recursos valiosos na pesca artesanal (Alves 2001). Estas regiões apresentam meio de subsistência fundamental para as populações ribeirinhas, que comercializam pescados retirados dos estuários (Santos et al. 2009).

Os moluscos bivalves que vivem nesses locais alimentam-se de matéria orgânica e inorgânica, fitoplâncton e partículas em suspensão presentes na água por meio de filtração branquial (Pereira et al. 2006). Portanto, o local de produção e/ou extrativismo de diferentes espécies de moluscos bivalves destinados ao consumo humano, emerge como um fator fundamental para que

estes possam ser comercializados com total segurança e isentos de quaisquer microrganismos patogênicos para o consumidor (Leal e Franco 2008). A ocorrência de diferentes micro-organismos patogênicos ao homem, presentes em moluscos bivalves, vem sendo relatado em estudos que visam monitorar a qualidade da água e de pescados (Pereira et al. 2006; Moreira et al. 2011; Mignani et al. 2013).

Com isso o objetivo desse trabalho foi identificar espécies de leveduras isoladas de moluscos bivalves in natura que não foram relatadas anteriormente na literatura, principalmente às que apresentam relatos na literatura de patogenicidade ao homem.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Área de coleta**

O estuário do Rio Subaé está localizado no município de São Francisco do Conde-BA, Brasil, compreendendo os 10 km finais da Bacia do rio Subaé, cuja foz encontra-se na Baía de Todos os Santos. As coletas foram realizadas no período de outubro de 2010 a novembro de 2011. As leveduras foram isoladas a partir de duas espécies de moluscos: *Mytella guyanensis* e *Crassostrea rhizophorae* obtidas por extrativismo do estuário. As linhagens estão depositadas no acervo de leveduras do laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

### **2.2 Manutenção das linhagens**

As leveduras consideradas puras foram mantidas a -80 °C em tubos criogênicos de 1,5 mL contendo meio GYMP (2 g de glicose; 0,5 g de extrato de levedura, 1 g de extrato de malte; 0,2 g de fosfato de sódio em 100 mL de água destilada) adicionado de 10% de glicerol.

### **2.3 Reativação**

Setenta isolados de levedura foram inoculados separadamente em placas contendo ágar Sabouraud (20 g/L de glicose, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L de peptona e 20 g/L de ágar) para obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas a 28° C ( $\pm 2$  °C) por 48 h.

### **2.4 Identificação molecular das leveduras**

A extração de DNA dos isolados foi realizada com o Kit de extração Wizard® Genomic DNA Purification, seguindo a recomendações do fabricante. As reações de PCR foram feitas para amplificar a região D1/D2 do gene codificador da subunidade maior do ribossomo (LSU) do rDNA utilizando os *primers* NL1 (5'- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'donnell 1993).

Os fragmentos obtidos foram purificados com o kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit" (GE Healthcare Life Sciences). Em seguida os *amplicons* foram sequenciados pelo sequenciador automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA.

### **2.5 Análises Filogenéticas**

A edição e montagem das sequências foram realizadas com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). O software BLASTn "basic local alignment search tool" (BLAST) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (versão 2.215 do BLAST 2.0) (ALTSCHUL et al., 1997), foi utilizado para comparar as sequências obtidas de cada isolado com aquelas encontradas nos bancos de dados públicos. Para a criação das árvores, foram incluídas as sequências de todas as espécies que apresentaram acima de 95% de identidade com as sequências que estavam sendo analisadas. O alinhamento das sequências e



as análises filogenéticas foram realizadas com o programa Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013). Inicialmente foi feita uma análise para encontrar o melhor modelo evolutivo. Em seguida, foi utilizado o método estatístico de Máxima Verossimilhança para fazer as análises evolutivas utilizando o modelo indicado pela análise de modelos do programa para cada grupo de sequências e bootstrap de 1000 repetições.

### 3. Resultados e Discussão

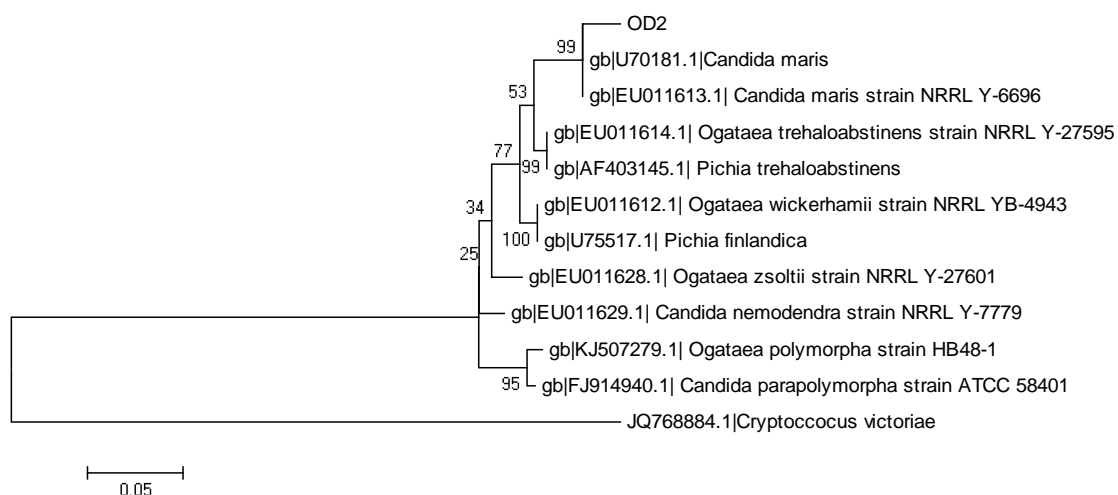
Cinco espécies de leveduras foram identificadas em um total de 9 isolados, dos quais 5 foram obtidos a partir de amostras de ostras e 4 isolados do sururu. O gênero *Hanseniaspora* sp. foi o mais comumente isolado na área de estudo, seguido por *Candida* sp (Tabela 1).

**TABELA I**

Isolados obtidos a partir de amostras de ostra e sururu e suas respectivas espécies.

Taxon Identificado	Código do isolado		Número de isolados
	Ostra	Sururu	
<i>Candida haemulonii</i>	OJL5		1
<i>Candida maris</i>	OD2		1
<i>Candida infanticola</i>		SF4	1
<i>Candida natalensis</i>	OM1		1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	OD3	SJ5	2
<i>Hanseniaspora</i> sp.	OJU3	SJ3 / SJ6	3
<b>Total</b>			<b>9</b>

As sequências do domínio D1/D2 do gene de rRNA LSU do isolado OD2 apresentaram acima de 95% de identidade com 9 espécies de leveduras. As espécies mais próximas foram *Ogataea trehaloabstinens* e *Candida maris*, apresentando entre 98% e 99% de identidade, respectivamente. Com a construção da árvore filogenética (Figura 1) ficou evidenciado que o isolado OD2 pertence à espécie *Candida maris*. Os relatos para essa espécie mostram-se incipientes na literatura, existindo apenas o estudo realizado Hagler e Mendonca-Hagler (1981), que isolaram *C. maris* de estuário poluído, bem como em amostras de praias de recreio no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

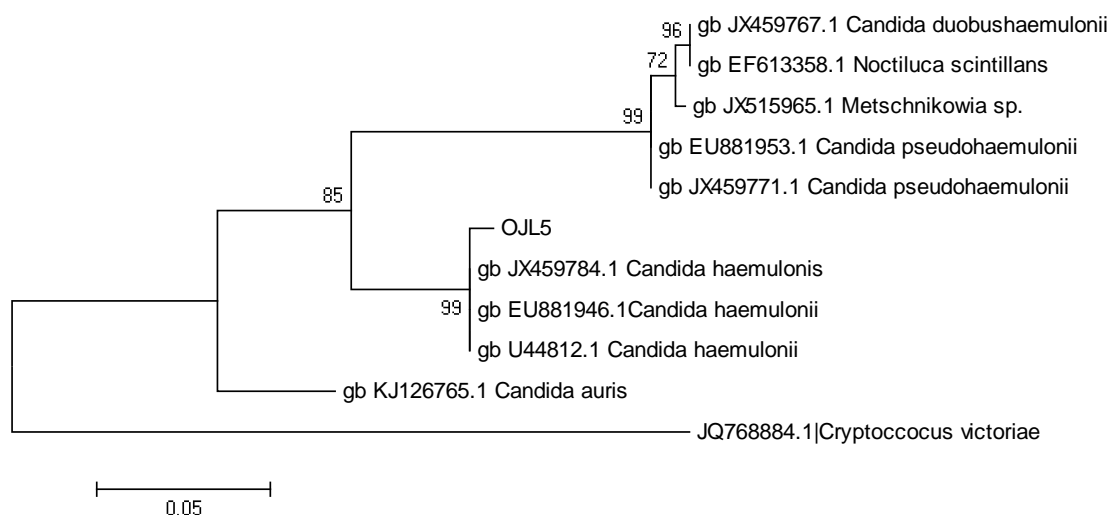


**Figura 1.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.

As sequências do domínio D1/D2 do gene de rRNA LSU do isolado OJL5 apresentaram acima de 97% de identidade com 3 espécies de leveduras. As espécies mais próximas, em termos de semelhança de sequência, foram

*Candida haemulonii* e *C. pseudohaemulonii*.

O isolado OJL5 ficou agrupado com *C. haemulonii*, apresentando maior similaridade genética com essa espécie (Figura 2). Esse isolado foi obtido a partir de amostras de ostras e a espécie identificada traz preocupação, pois existem relatos na literatura fazendo alusão quanto à sua patogenicidade, apresentando perfil multirresistente a antifúngicos (Rodero et al. 2002; Cendejas-Bueno et al. 2012). *C. haemulonii* foi isolada pela primeira vez em 1962, ocorrendo posterior reclassificação em 2012 (Cendejas-Bueno et al. 2012). No Brasil, foi encontrada em fermentação alcoólica no estado de São Paulo (Cabrini e Gallo 1999). Também existem relatos que esta espécie foi isolada em 2010, sendo responsável por causar candidemia em pacientes do Instituto de Câncer de São Paulo (Almeida et al. 2012). Essa espécie ainda não havia sido relatada em ambientes aquáticos e nem isolada em moluscos bivalves.



**Figura 2.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parameter (Kimura 1980), com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como agrupamento externo.

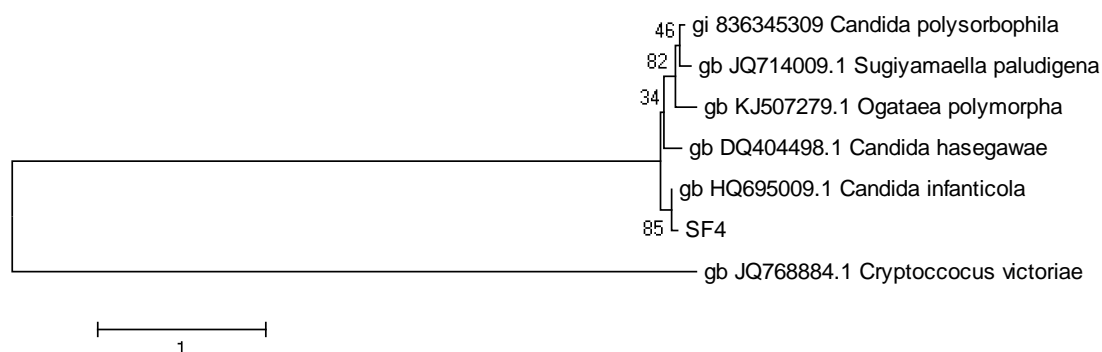
Apesar da sequência do isolado OM1 apresentar similaridade de 97% e 98% com diferentes espécies de *Candida* spp., com a análise filogenética foi possível inferir que ele pertence a espécie *Candida natalensis* (Figura 3). Foram realizados estudos com essa espécie demonstrando que ela pode ser utilizada na produção de ácidos graxos de cadeia longa (Viljoen et al. 1989), assim como na produção de enzimas, sendo isolada a partir de um sistema de maltagem industrial (Laitila et al. 2006). Contudo, essa é uma espécie que não é muito frequente em estudos com leveduras.



**Figura 3.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.

O isolado SF4 apresentou alta similaridade com cinco espécies diferentes, porém, na construção da árvore filogenética, o mesmo ficou agrupado com a espécie *Candida infanticola* (Figura 4). Essa espécie foi descrita em 2007 (Kurtzman 2007) e recentemente foi isolada de efluente têxtil, sendo utilizada na descoloração de corantes (Matias et al. 2013) e na produção de biossurfactantes. Além do potencial biotecnológico, essa espécie também

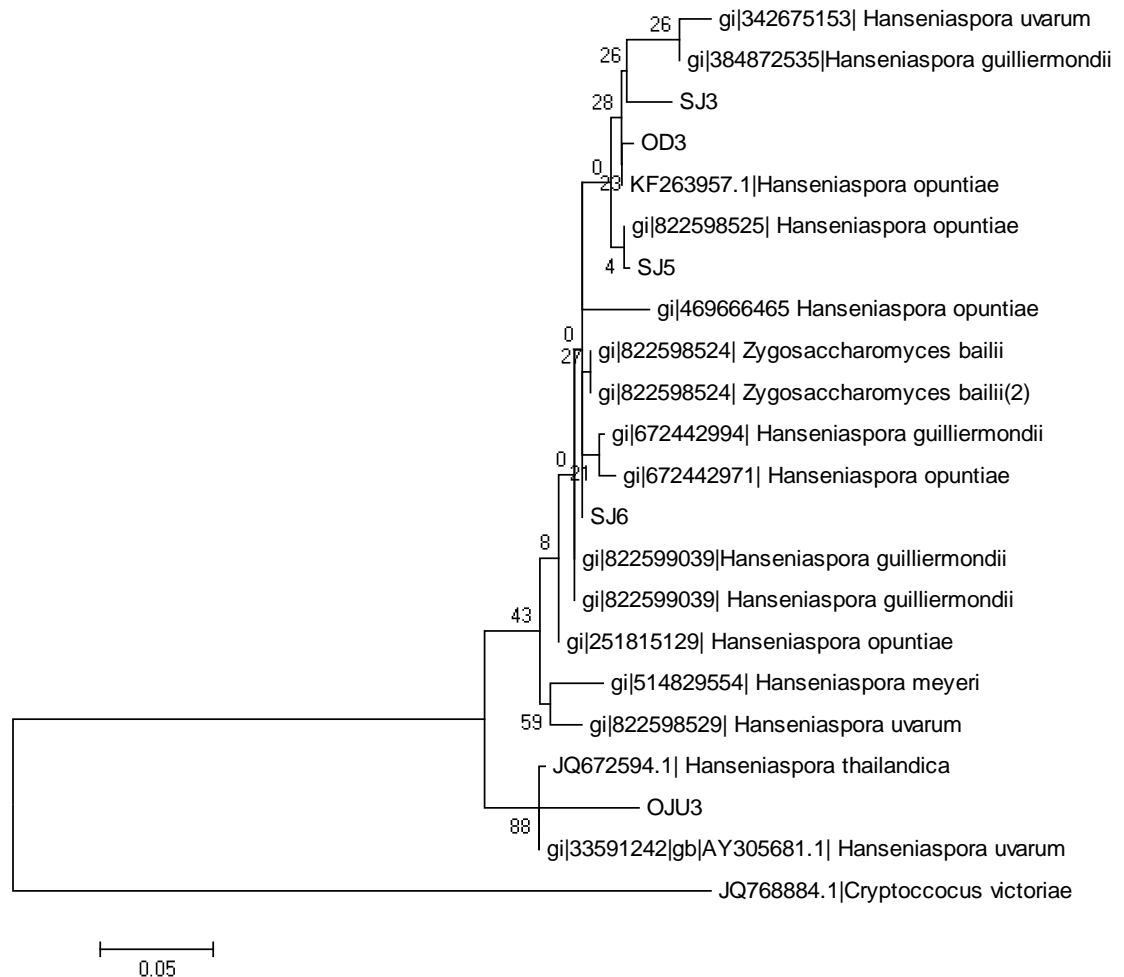
apresenta patogenicidade ao homem, sendo responsável por causar candidemia em pacientes com câncer (Shokohi et al. 2011).



**Figura 4.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Tamura 3-parameter (Tamura 1992) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.

Os isolados SJ3, SJ5, SJ6, OD3 e OJU3 foram obtidos de amostras de ostras e sururu e, ao analisar as suas sequências, foi possível verificar que eles não exibem diferenças significativas no domínio D1/D2 do gene de rRNA LSU permitindo identificar apenas que os isolados SJ5 e OD3 são da espécie *Hanseniaspora opuntiae* e que os demais pertencem ao gênero *Hanseniaspora* (Figura 5). A espécie *Hanseniaspora opuntiae* foi descrita pela primeira vez em 2003, tendo sido isolada de diversas fontes na África, América do Norte e no Havaí (Cadez et al. 2013). Com diferentes aplicações biotecnológicas, essa espécie foi considerada como predominante em fermentações do cacau para produção de chocolate (Papalexandratou et al. 2013). Responsável por estimular o sistema imunológico do pepino do mar (*Apostichopus japonicus*) aumentando assim a sua resistência contra *Vibrio splendidus*, sendo considerada uma levedura probiótica (Ma et al. 2013), e também demonstrando

sucesso ao colonizar o intestino de juvenis da mesma espécie de pepino do mar, melhorando seu crescimento e atividade das enzimas digestivas (Ma et al. 2014).



**Figura 5.** Análise filogenética molecular pelo método de máxima verossimilhança das sequências da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA construída no programa MEGA 6. O melhor modelo selecionado pelo programa foi o modelo Jukes-Cantor (Jukes e Cantor 1969) com deleção parcial de dados ausentes e nível de confiança de 1000 repetições de bootstrap. A árvore com a maior probabilidade está sendo mostrada. A espécie *Cryptococcus victoriae* foi utilizada como grupamento externo.

Os isolados obtidos pertencentes ao gênero *Hanseniaspora* exibem diferença em poucos nucleotídeos com as sequências que estão depositadas nos bancos de dados, o que permite uma identidade de 99% com diferentes espécies do gênero *Hanseniaspora*. Este gênero é um grupo monofilético e

pode ser dividido em dois subgrupos de acordo com o número de cromossomos (Esteve-Zaroso et al. 2001), podendo ser dividido em duas linhagens estreitamente relacionadas (Kurtzman e Robnett 2003). Estudos com análises filogenéticas indicaram que substituições nucleotídicas com taxa acima de 1% (6 nucleotídeos) são indicativos de limite de separação das espécies de leveduras, enquanto diferenças de 0-3 nucleotídeos parece ser um indicativo da mesma espécie (Kurtzman e Robnett 1998). Foi demonstrado, também, que as substituições de nucleotídeos no domínio D2 geralmente não excedem 1% entre cepas irmãs e presume-se que uma divergência maior poderia ser um indicativo de membros de espécies diferentes (Peterson e Kurtzman 1991; Daniel et al., 2001; Kurtzman, 2014). Uma limitação de dados de sequências de rDNA é que estes genes são altamente conservados, com variação entre os nucleotídeos muito limitada, podendo ocorrer várias substituições, então a dependência de um único gene ou dois podem produzir resultados imprecisos (Diezmann et al 2004).

#### **4. Considerações Finais**

Este é o primeiro relato das espécies citadas em moluscos bivalves de água doce. Duas das espécies encontradas são citadas como patogênicas ao homem, apresentando caráter de multirresistência a antifúngicos. Assim, é importante o constante monitoramento desses moluscos a fim de evitar surtos de doenças que possam ser veiculadas por alimentos pois os mesmos, muitas vezes, são consumidos na forma in natura, o que pode configurar surtos de candidemia em adultos, principalmente idosos, que podem apresentar sistema imunológico comprometido. Além da patogenicidade, existem relatos na

literatura de que as espécies encontradas apresentam bom potencial biotecnológico que pode ser explorado para desenvolvimento de várias substâncias de interesse industrial e ambiental.

Os domínios D1/D2 não apresentaram eficiência para identificar leveduras do gênero *Hanseniaspora*, fazendo-se necessário o sequenciamento de uma nova região para identificar as diferentes espécies dentro desse gênero. Este gênero foi o único encontrado nos dois tipos de moluscos estudados.

## 5. Referências Bibliográficas

ALMEIDA Jr. JN de, MOTTA AL, ROSSI F, ABDALA E, PIERROTTI LC, KONO ASG, DIZ MDPE, BENARD G, NEGRO GMBD. 2012. First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. Clinics 67(10):1229-1231.

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHAFFER AA, ZHENG ZHANG JZ, MILLER W, LIPMAN DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402.

ALVES JRP. 2001. Manguezais: educar para proteger. Rio de Janeiro: FEMAR: SEMADS 96 p.

CABRINI KT E GALLO CR. 1999. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. Sci. Agric 56 (1): 207-216.

CADEZ N, POOT GA, RASPOR P, SMITH MTH. 2003. *Hanseniaspora meyeri* sp. nov, *Hanseniaspora clermontiae* sp. nov, *Hanseniaspora lachancei* sp. nov and *Hanseniaspora opuntiae* sp. nov, novel apiculate yeast species. Int J Syst Evol Micr 53(5):1671-1680.

CENDEJAS-BUENO E, KOLECKA A, ALASTRUEY-IZQUIERDO A, THEELEN B, GROENEWALD M, KOSTRZEWA M, CUENCA-ESTRELLA M, GÓMEZ-LÓPEZ A, BOEKHOUT T. 2012. Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. J. Clin. Microbiol 50:3641-3651.

DANIEL HM, SORRELL TC, MEYER W. 2001. Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs. Int J Syst Evol Microbiol 51: 1593-1606.



- DIEZMANN S, COX CJ, SCHÖNIAN G, VILGALYS RJ, MITCHELL TG. 2004. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol* 42: 5624–5635.
- ESTEVE-ZARZOSO B, PERIS-TORÁN MJ, RAMÓN D, QUEROL A. 2001. Molecular characterisation of *Hanseniaspora* species. *A Van Leeuw J Microb* 80: 85-92.
- HAGLER AN, MENDONÇA-HAGLER LC. 1981. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, *Braz Appl Environ Microbiol* 41: 173-178.
- JUKES TH, CANTOR CR. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, pp. 21-132.
- KIMURA M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.
- KURTZMAN CP, ROBNETT CJ. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *A Van Leeuw J Microb* 73: 331-371.
- KURTZMAN CP, ROBNETT CJ. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res* 3: 417-432.
- KURTZMAN CP. 2007. New anamorphic yeast species: *Candida infanticola* sp. nov., *Candida polysorbophila* sp. nov., *Candida transvaalensis* sp. nov. and *Trigonopsis californica* sp. nov. *A Van Leeuw J Microb* 92(2):221-31.
- KURTZMAN, C. P. 2014. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 325–332.
- LAITILA A, WILHELMSON A, KOTAVIITA E, OLKKU J, HOME S, JUVONEN R. 2006. Yeasts in an industrial malting ecosystem. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:953– 966.
- LEAL DAG, FRANCO RMB. 2008. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. *Rev Panam Infectol* 10: 48-57.
- MA Y, LIU Z, YANG Z, BAO P, ZHANG C, DING J. 2014 Effects of *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the growth and digestive enzyme activity of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Chin J Oceanol Limnol* 32 (4): 743-748.
- MA Y, LIU Z, YANG Z, LI M, LIU J, SONG J. 2013 Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol* 34 (1): 66–73.

MATIAS KTS, GONÇALVES DB, SILVA APR, VIEIRA MS, GALDINO AS, GRANJEIRO PA, SILVA JA, SILVA A da. 2013. Uso da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) na descoloração do corante Preto Reativo 5 pela levedura *Candida infanticola* UFSJ 6A isolada de efluente têxtil. BBR - Biochem Biotechnol Reports 2(2): 51-53.

O'DONNELL K. 1993 *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. (Ed). The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematic. CAB International, Wallingford, UK, p. 225-233.

PAPALEXANDRATOU Z, LEFEBER T, BAHIM B, LEE OS, DANIEL HM, DE VUYST L. 2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa bean fermentation process. Food Microbiol 35(2):73-85.

PEREIRA MA, NUNES MM, NUERNBERG L, SCHULZ D, BATISTA CRV. 2006. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianopolis – Brazil. Braz J Microbiol 37(2): 159-163.

PETERSON SW, KURTZMAN CP. 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. Syst Appl Microbiol 14: 124–129.

RODERO L, CUENCA-ESTRELLA M, CÓRDOBA S, CAHN P, DAVEL G, KAUFMAN S, GUELFAND L, RODRÍGUEZ-TUDELA JL. 2002. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. J Clin Microbiol 40(6):2266-9.

SANTOS TG, BEZERRA-JUNIOR JL, COSTA KMP, FEITOSA FAN. 2009. Dinâmica da biomassa fitoplanctônica e variáveis ambientais em um estuário tropical (Bacia do Pina, Recife, PE). Rev Bras Eng Pesca 4(1): 95-109.

SHEARER CA, DESCALS E, KOHLMAYER B, KOHLMAYER J, MARVANNOVA L, PADGETT L, PORTER D, RAJA HA, SCHMIT JP, THORTON HA, VOGLYMAYR H. 2007. Fungal biodiversity in aquatic habitats. Biodivers Conserv 16: 49–67.

SHOKOHI T, BANDALIZADEH Z, HEDAYATI MT, MAYAHI S. 2011. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. Jundishapur J Microbiol. 4: S19-S26.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725-2729.

VILJOEN BC, KOCK JLF, K. THOUPOU K. 1989 The significance of cellular long-chain fatty acid compositions and other criteria in the study of the

relationship between sporogenous ascomycete species and asporogenous *Candida* Species. Syst Appl Microbiol 12: 80-90.

WURZBACHER CM, BÄRLOCHER F, GROSSART H. 2010. Fungi in lake ecosystems. Aquat Microbiol Ecol 59:125–149.

## Considerações Gerais

Muitas espécies encontradas no estuário do rio Subaé apresentam-se na literatura de forma patogênica ao homem, algumas estando relacionadas à contaminação fecal recente, sendo um indicio de que este estuário encontra-se poluído e necessita de atenção dos gestores públicos afim de se evitar que doenças sejam veiculadas através do alimento.

Podemos destacar, também, espécies de leveduras que ainda não tinham sido descritas em moluscos bivalves e água, algumas também apresentando relatos na literatura de patogenicidade e resistência a antifúngicos. Isso pode indicar que leveduras derivadas de ambientes que não o aquático estão migrando para o estuário e mostrando-se bem adaptadas.

Um fato relevante a ser levado em consideração é o número de espécies encontradas que apresentam aplicação biotecnológica na literatur, indicando que o estuário do rio Subaé pode ser uma fonte para futuras prospecções de espécies com alta aplicabilidade em diferentes setores.