

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de
microbiologia em Instituição de Ensino Superior**

Otávia de Almeida Martins

Pelotas, 2016

Otávia de Almeida Martins

**Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de
microbiologia em Instituição de Ensino Superior**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Coorientadora: Dra. Renata Osório de Faria

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M379f Martins, Otávia de Almeida

Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior / Otávia de Almeida Martins. – 64f. : il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2016. – Orientador Mário Carlos Araújo Meireles; co-orientador Renata Osório de Faria.

1. Veterinária. 2. Fungos. 3. Micobiota ambiental.
4. *Cladosporium* spp.. 5. *Penicillium* spp.. I. Meireles, Mário Carlos Araújo. II. Faria, Renata Osório de. III. Título.

CDD: 589.2

Otávia de Almeida Martins

Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de
microbiologia em Instituição de Ensino Superior

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade de São Paulo

Prof. Dra. Ana Raquel Mano Meinerz
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Luiza da Gama Osório
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Início meus agradecimentos por Deus, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta! É muito difícil transformar sentimentos em palavras, mas serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus orientadores Profº Mário Carlos Araújo Meireles e Profª Renata Osório de Faria, pela amizade, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, contribuírem para meu crescimento pessoal e profissional e por serem um exemplo a ser seguido.

Às filhinhas do Micvet, Ângela, Angelita, Alessandra, Carol, Josiara, Luiza, Manu, Stéfanie, obrigada por tudo gurias! Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ângela e Angelita, muito obrigada, pela fundamental ajuda na reta final e pelas correções carinhosas.

Aos colegas e funcionários da Universidade Federal de Pelotas, que durante este tempo tive o prazer de conhecer.

Aos meus amigos de sempre, Vica, Marilia, Paula, Ludi...e aqueles que fui conquistando ao longo dos anos, os quais sempre me incentivaram e me encorajaram. Muito obrigada!

Por fim agradeço à minha família. Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para o final e vocês são o melhor da minha vida. Obrigada pai e mãe, por tudo que me deram e ensinaram, pelo apoio incondicional, por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava. Vocês são a minha fortaleza. Amo vocês!

À minha imã Rita, meu cunhado Marcos e minhas sobrinhas, pelo incentivo e orações, mesmo a distância sempre presentes nos meus pensamentos.

À minha irmã Alessandra, meu cunha Ernesto e meu afilhado Bernardo, obrigada por tudo, vocês sempre tão presentes na minha trajetória foram fundamentais para esta conquista.

Obrigada Mana, pelo amor e cumplicidade de estar ao meu lado, sempre. E obrigada Ernesto, durante este tempo compartilhamos momentos e desafios da vida acadêmica, sempre torcendo e incentivando um ao outro.

Enfim, obrigada por tudo família, pelo amor incondicional e afeto. Não encontro palavras que consiga agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão!

“É preciso força para sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”
Los Hermanos

Resumo

MARTINS, Otávia de Almeida. **Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior.** 2016. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Os fungos presentes no ar atmosférico são denominados anemófilos, sendo este habitat o meio de dispersão mais utilizado por esses microrganismos, que possuem a capacidade de colonizar diferentes substratos de forma singular e eficiente. Assim, dificilmente pode existir ambiente livre de contaminação fúngica. As concentrações de fungos no ambiente sofrem influências de diversos fatores, incluindo variáveis ambientais e fatores físicos que podem aumentar a quantidade de propágulos no ambiente. Os fungos anemófilos podem causar problemas como a deterioração de materiais, alergias, intoxicações e infecções. Assim, a presença desses microrganismos em laboratórios de microbiologia pode causar grandes problemas econômicos, de qualidade diagnóstica e relacionados à pesquisa, além das possibilidades de causar prejuízo à saúde das pessoas que trabalham no local. Ao fazer-se uso das normas de biossegurança, o monitoramento de fungos torna-se, então, necessário para um adequado controle ambiental, evitando assim contaminações e infecções. O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e identificação da microbiota fúngica ambiental presente em nove laboratórios de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) durante o período de fevereiro a novembro de 2015, abrangendo as quatro estações. A técnica utilizada foi de sedimentação em placa de Petri contendo meio Ágar Sabouraud dextrose com adição de cloranfenical. Durante o estudo foram coletadas 228 placas mensais provenientes de coletas semanais dos nove laboratórios totalizando 912 placas no final do experimento, das quais foram isoladas um total de 5101 Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Conforme a sazonalidade, o outono foi a estação que apresentou maior número de UFC, correspondendo a 35% (1808/5101) do total encontrado, já no inverno obteve-se apenas 17,3% (884/5101). Em relação ao isolamento fúngico, o gênero *Cladosporium* representou 46,3% do total de UFC, seguido de *Penicillium* e de fungos não caracterizados quanto ao gênero, em decorrência da ausência de micélio reprodutivo, sendo então classificados como “micélio aéreo estéril”. Não houve diferença significativa entre o número de UFC encontradas nos distintos laboratórios, assim como também não houve diferença no número de UFC encontradas nos distintos ambientes pertencentes aos laboratórios. Os gêneros prevalentes foram *Cladosporium* e *Penicillium*.

Palavras chave: classificação de fungos; micobiota ambiental; *Cladosporium* spp.; *Penicillium* spp.

Abstract

MARTINS, Otávia de Almeida. **Airborne fungi and yeasts isolated in microbiology laboratories environments in Higher Education Institution.** 2016. 64f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

The fungi present in atmospheric air are called airborne, which is the dispersion medium habitat most used by these microorganisms, which have the ability to colonize different natural substrates and efficiently. Thus, there can hardly fungal contamination-free environment. Fungal concentrations in the environment are influenced by several factors, including environmental factors and physical factors that can increase the number of propagules in the environment. The airborne fungi can cause problems such as deterioration of materials, allergies, poisoning and infections. Thus, the presence of these microorganisms in microbiology laboratories can cause major economic problems, diagnostic and research related to quality, and the potential to cause harm to the health of the people working on site. When making up the use of bio-security standards, monitoring of fungi becomes then necessary for proper environmental control, thus avoiding contamination and infections. The aim of this study was the isolation and identification of the fungal microbiota present in nine teaching laboratories, research and extension of the Federal University of Pelotas (UFPel) during the period from February to November 2015, covering the four seasons. The technique used was settling in Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar medium with added cloranfenical. During the study were collected 228 monthly cards from weeks collection of nine laboratories totaling 912 cards at the end of the experiment, which were isolated from a total of 5101 Colony Forming Units (CFU). As the seasonal, autumn was the season that had the highest number of CFU, corresponding to 35% (1808/5101) of the total found, already in winter yielded only 17.3 % (884/5101). Compared to fungal isolation, *Cladosporium* genre represented 46.3 % of the CFU, followed by *Penicillium* fungi and not characterized as gender, due to the absence of reproductive mycelium, then being classified as "sterile aerial mycelium". There was no significant difference between the number of CFU found in different laboratories, as well as there was no difference in the number of CFUs in different environments belonging to the laboratories. The prevalent genera were *Cladosporium* and *Penicillium*.

Keywords: fungal classification; environmental mycobiota; *Cladosporium* spp.; *Penicillium* spp.

Lista de Figuras

Artigo 2 - Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior

- Figura 1 Variação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos quatro principais gêneros fúngicos isolados nos laboratórios de microbiologia de uma Instituição de Ensino Superior, conforme as estações climáticas e suas respectivas médias de temperaturas e umidade relativa do ar..... 50

Lista de Tabelas

Artigo 1 - Fungos anemófilos em ambientes de laboratório de micologia veterinária

Tabela 1	Gêneros fúngicos encontrados nos diferentes ambientes analisados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária/UFPel, março-maio/2014 (valores expressos de 34 unidades formadoras de colônia – UFC).....	34
Tabela 2	Gênero <i>Aspergillus</i> distribuído nas suas seções, encontrados nos diferentes ambientes analisados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária/UFPel (valores expressos de unidades formadoras de colônia – UFC).....	35

Artigo 2 - Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior

Tabela 1	Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos anemófilos encontradas em ambientes pertencentes a distintos laboratórios de microbiologia conforme a sazonalidade.....	46
Tabela 2	Gêneros fúngicos e respectivas Unidades formadoras de Colônias (UFC) encontradas em amostras do ar de cinco dos laboratórios analisados conforme a sazonalidade.....	48
Tabela 3	Gêneros fúngicos e respectivas Unidades formadoras de Colônia (UFC) encontradas em amostras do ar de quatro dos laboratórios analisados conforme a sazonalidade.....	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

EPI	Equipamentos de proteção individual
FAVET	Faculdade de Veterinária
mg	Miligramma
MICVET	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária
mL	Mililitro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UR	Umidade relativa

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão da Literatura.....	14
3 Objetivos	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 Artigos.....	30
4.1 Artigo 1	30
4.2 Artigo 2	41
5 Considerações Finais.....	55
Referências	56
Anexos	63

1 Introdução

Os fungos são microrganismos ubíquos, encontrados amplamente disseminados no ar, solo e ambientes aquáticos. São seres vivos absorтивos com organização celular e DNA delimitado por um envoltório nuclear (LACAZ *et al.*, 2002).

Os fungos que vivem no ar atmosférico são denominados anemófilos, sendo esse habitat o meio de dispersão mais utilizado por estes microrganismos, que possuem a capacidade de colonizar diferentes substratos e habitats de forma singular e muito eficiente. Assim, dificilmente pode existir ambiente livre de contaminação fúngica, pois estes organismos têm o ar atmosférico como seu principal meio e suportam grandes variações de temperatura, umidade, pH e concentrações de oxigênio. Sendo assim, são facilmente encontrados em ambientes internos e qualquer lugar que tenha condições para o seu desenvolvimento (LACAZ *et al.*, 2002).

Dentre os poluentes biológicos, os fungos destacam-se por crescerem e disseminarem-se pela poeira ambiental, além de manterem-se viáveis por longos períodos em materiais de uso comum e em superfícies (STRAUSZ, 2001). Os conídios fúngicos constituem grande parte do material biológico suspenso no ar, e o seu monitoramento pode fornecer informações epidemiológicas importantes quanto aos gêneros presentes e sua quantificação (PERDELLI *et al.*, 2006). As concentrações de fungos no ambiente sofrem influências de diversos fatores, incluindo variáveis ambientais (como temperatura e umidade) e fatores físicos (forma, tamanho e densidade das partículas) que podem aumentar a quantidade de propágulos no ambiente. (BOFF, 2011).

A contagem e caracterização dos fungos anemófilos, assim como os fatores internos e externos que levam à formação dessa microbiota, são importantes para avaliação de locais onde lida-se com material biológico, fabrica-se medicamentos e onde há exposição de funcionários. Ambientes que, geralmente, possuem controle de micobiota ambiental, evitando assim possíveis contaminações e patologias

provocadas por fungos oportunistas (CORRÊA, 1998; KNEIFEL, CZECH & KOPP, 2001).

Os fungos anemófilos podem causar problemas como a deterioração de materiais, alergias, intoxicações e infecções. Assim, a presença desses microrganismos em laboratórios de microbiologia pode causar grandes problemas econômicos, de qualidade diagnóstica e relacionados à pesquisa, além das possibilidades de causar prejuízo à saúde das pessoas que trabalham no local. Ao fazer-se uso das normas de biossegurança, o monitoramento de fungos torna-se, então, necessário para um adequado controle ambiental, evitando assim contaminações e infecções (KNEIFEL, CZECH & KOPP, 2001).

A necessidade de expansão do conhecimento sobre isolamento e identificação de fungos anemófilos, o crescente interesse por microrganismos alergênicos e a procura de novos indicadores ambientais, vem despertando interesse no estudo desses fungos. Já que a frequência e a diversidade dos mesmos pode estar associada a diferentes fatores, como condições higiênico sanitárias, uso de EPI (equipamentos de proteção individual), adequação das normas de biossegurança, e poluição ambiental, sendo, portanto, também considerados bons indicadores ambientais (SCHOENLEIN-CRUSIUS *et al*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e identificação da microbiota fúngica ambiental presente em nove laboratórios de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) durante o período fevereiro a novembro de 2015, abrangendo as quatro estações.

2 Revisão da Literatura

2.1 Características gerais dos fungos

Os fungos têm existência bastante difusa. Eles são considerados ubíquos e cosmopolitas por estarem no solo, na água e no ar em todas as partes do planeta (KONEMAN *et al.*, 2001). Estes microrganismos necessitam de matéria orgânica para obtenção de carbono e de energia para seu metabolismo, por isso, estarão sempre associados ao material orgânico como sapróbios ou decompositores, simbiontes, comensais e parasitas e os efeitos decorrentes de quaisquer uma destas manifestações são considerados como úteis ou prejudiciais (BARON *et al.*, 1994; BLEVINS, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001).

Fungos são organismos eucarióticos que podem se apresentar uninucleados, como as leveduras, ou multinucleados, como os fungos filamentosos. São organismos heterotróficos, ou quimiorganotróficos, incapazes de assimilar o carbono inorgânico, exigindo carbono orgânico como material plástico ou energético. Os processos de obtenção de energia são a respiração e a fermentação. São aeróbios obrigatórios, no entanto, certas leveduras fermentadoras são anaeróbias facultativas podendo se desenvolver em ambientes com restrição ou ausência de oxigênio. A parede celular, superfície de contato da célula fúngica com o meio externo, é rígida, e seus componentes principais são hexoses e hexoaminas que formam mananas, glucanas e galactanas. Alguns fungos têm parede de quitina (N-acetyl glicosamina), enquanto outros possuem complexos polissacarídios e proteínas com predominância de cisteína (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2010).

Os fungos, em especial os filamentosos, compreendem uma grande diversidade de gêneros que colonizam diferentes ambientes, onde desenvolvem estruturas reprodutivas como esporos, conídios, esporangiosporos, os quais são veiculados por correntes de ar, dispersos com muita facilidade e com alto potencial de contaminação (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

A classificação taxonômica dos fungos era tradicionalmente baseada em características estruturais relacionadas com a reprodução sexuada e na falta desta, a mesma era feita pelos órgãos de reprodução assexuada. Nos dias atuais, técnicas bioquímicas e moleculares estão sendo utilizadas para auxiliar na identificação das espécies fúngicas (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; SIDRIM & MOREIRA, 1999; MOLINARO et al., 2009).

Macroscopicamente, os fungos são divididos em filamentosos (bolores ou fungos multicelulares) e leveduriformes (leveduras, levedos ou fungos unicelulares). No estudo macroscópico, é importante a análise das características das colônias, como verso e reverso, pigmentação (presença ou ausência, cor do pigmento, e se é difuso ou restrito à colônia), bordas (regulares, irregulares, radiadas), superfície (lisa, fissurada, rugosa), textura ou consistência (de forma geral algodonosa ou lanosa, aveludada, granular ou pulverulenta, glabra ou cérea), velocidade de crescimento, topografia (plana, convexa, umbilicada, pregueada, cerebriforme), aspecto (brilhante, opaco, seco, úmido), diâmetro (LACAZ et al., 2002; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

Nas leveduras, as colônias se apresentam esféricas ou ovais e de consistência pastosa ou cremosa, apresentando crescimento limitado. Nos fungos filamentosos há uma maior variedade de formas de colônias, por exemplo, quanto à textura podem ser aveludadas, cremosas, butirosas ou mucoides, cotonosas, serosas, camurças, granulosas, membranosas ou coriáceas, verrucosas ou pulverulentas, e apresentarem crescimento invasor (LACAZ et al., 2002; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

O corpo dos fungos multicelulares apresenta uma organização formada por filamentos delgados chamado de hifas, essas podem apresentar septos (septadas) ou serem cenocíticas (asseptadas). Bem como podem apresentar coloração (demáceas) ou não (hialinas); núcleo único por região (haploides) ou dois núcleos por região (diploides). Além, disso, outros aspectos como espessura e angulação das ramificações, também diferem ao se analisar hifas de diferentes gêneros fúngicos. O conjunto de hifas recebe o nome de micélio e pode ser dividido em micélio vegetativo, aquele que cresce para dentro do substrato e tem a função de sustentação e de absorção de nutrientes, e em micélio aéreo, que se projeta na superfície (TORTORA, 2009).

Alguns pontos do micélio aéreo podem se diferenciar e formar o micélio reprodutivo, formando esporos ou propágulos sexuada ou assexuada mente. Quando na ausência de micélio reprodutivo, considera-se o micélio aéreo como estéril. As leveduras são células isoladas, que não possuem hifas, porém, algumas espécies ao se reproduzirem por brotamento, podem produzir uma cadeia alongada de células unidas, formando pseudo-hifas. Sua morfologia microscópica é semelhante nas diferentes espécies de fungos leveduriformes (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007; CAMERON *et al.*, 2009).

Hifas especializadas, ou reprodutivas, dão origem aos propágulos assexuados. Os conídios são formados a partir do conidióforo, enquanto os esporangiósforos são formados em uma estrutura chamada esporângio, sustentada pelo esporangióforo. Já os propágulos sexuados se originam pela fusão de estruturas diferenciadas. Os ascóforos são formados dentro de estruturas chamadas ascos, que podem ser simples ou estarem distribuídos em lóculos (ascostroma) no micélio, ou contidos em corpos de frutificação (ascocarpos). Estas últimas estruturas de frutificação podem ter três diferentes formas: cleistotécio (estrutura fechada e globosa), peritécio (estrutura piriforme, com uma abertura chamada ostíolo) ou apotécio (estrutura aberta em forma de cálice). Os basidiósforos, esporos característicos de cogumelos, originam-se externamente a uma estrutura chamada basídio (RAVEN, EVERT, EICHHORN, 2007).

Os fungos apresentam diferentes tipos de propágulos, sendo classificados como assexuados ou sexuados, internos ou externos. Os blastoconídios são típicos de fungos leveduriformes. Nos fungos filamentosos, os conídios são as estruturas de reprodução mais comuns, eles são assexuados e formados no exterior das estruturas reprodutivas, tendo relevante papel na dispersão. Outro exemplo de propágulos assexuais são os esporangiósforos, que se formam internamente na estrutura reprodutiva esporangióforo, através da clivagem do citoplasma. Os esporos sexuados são os basidiósforos, que são externos, e os ascóforos, que são internos, contidos em bolsas denominadas ascos (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2010).

Outras estruturas encontradas são os fragmentos de hifas, denominados artroconídios, e as estruturas de resistência denominadas clamidoconídios. Estes se formam em condições ambientais adversas, como escassez de nutrientes, de água e temperaturas não favoráveis ao desenvolvimento fúngico. E apresentam-se como

células, geralmente arredondadas, de volume aumentado, com paredes duplas e espessas, nas quais se concentra o citoplasma (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2010).

Os fungos para se nutrirem precisam viver em estado de saprofitismo, parasitismos ou simbiose. Sua nutrição na maioria das vezes ocorre por absorção (enzimas hidrolíticas degradam macromoléculas e essas são assimiladas por mecanismos de transporte) (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

Para seu desenvolvimento, os fungos são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono, incluindo carboidratos complexos como a lignina (componente da madeira), lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas, mas, preferencialmente, utilizam carboidratos simples como a D-glicose. Fontes de nitrogênio também são necessárias, podendo ser inorgânicas (amônias ou nitratos) ou orgânicas (peptona, sulfatos e fosfatos). A maioria cresce em atividade de água na faixa de 0,8 (os valores oscilam entre 0 e 1). Há uma ampla faixa de temperatura, podendo ser encontrados fungos psicrófilos, mesófilos e termófilos. O pH ótimo para crescimento fica em torno de cinco. A forma e a esporulação podem ser influenciadas por estes fatores e pelas condições nutricionais, apresentando algumas espécies dimorfismos, variando sua forma morfológica, ou pleomorfismo, em dermatófitos, que é expresso pela perda de estruturas de reprodução e mudanças na morfologia das colônias. As estruturas vegetativas dos fungos crescem preferencialmente em ambientes com pouca luz, enquanto a parte reprodutiva procura a luz para se desenvolver (RAVEN, EVERET, EICHHORN, 2007; CAMERON *et al.*, 2009).

Os fungos podem ser hialinos ou demáceos, sendo, os últimos, aqueles que apresentam grande concentração de melanina na sua parede celular produzindo um pigmento acastanhado que lhes confere resistência aos raios ultravioletas e enzimas produzidas por outros organismos. Por diferentes processos os fungos, através de seu metabolismo secundário, podem elaborar metabólitos como antibióticos, dos quais a penicilina é o mais conhecido, e micotoxinas como aflatoxinas e gliotoxina, que lhes conferem vantagens seletivas e virulência (LACAZ *et al.*, 2002; SIDRIM & ROCHA, 2010).

Fungos são ubíquos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, terra, animais e alimentos. Suas espécies sofrem em sua incidência variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outras. O vento age como importante veículo de

dispersão de seus propágulos e fragmentos de hifa. Os seres humanos são expostos continuamente a vários gêneros de fungos, o que permite a possibilidade de colonização. Dependendo da interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e fatores de virulência de fungos, a colonização pode ser transitória ou persistente com risco para o desenvolvimento de doença (LACAZ *et al.*, 1991; SIDRIM & MOREIRA, 1999; MENEZES *et al.*, 2006; FLORES & ONOFRE, 2010; BOECHAT & RIOS, 2011).

2.2 Fungos Anemófilos

Os fungos, dispersos por meio do ar atmosférico, são denominados fungos anemófilos e essa microbiota fúngica pode ser semelhante ou diferente em cada cidade ou região (SIDRIM & MOREIRA, 1999; BERNARDI *et al.*, 2006). Alguns fungos anemófilos podem, por oportunismo, provocar patologias no ser humano, a partir da dispersão dos seus propágulos através do vento (JAWETZ, 1998; MEZZARI *et al.*, 2002; ESQUIVEL *et al.*, 2003).

Eles têm sua incidência amplamente influenciada por variações da temperatura, umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, pressão barométrica, nebulosidade, direção e velocidade do vento, irradiação solar e das estações climáticas. Além de outros fatores, incluindo, número populacional, circulação de pessoas e animais, intensidade das trocas de ar e ainda da limpeza e desinfecção ambiental (FALVEY & STREIFEL, 2007; XAVIER *et al.*, 2008; MATTEI, 2010).

Esses fungos pertencem a diversos gêneros e espécies, sendo quase todos contaminantes do ar, principalmente em ambientes fechados, e podem ocasionar sérios danos à saúde humana, de animais e plantas (SIDRIM & MOREIRA, 1999; BERNARDI *et al.*, 2006).

Os elementos fúngicos que são encontrados no ar atmosférico são os propágulos, que gerados de forma sexual ou assexual, apresentam papel importante na constatação e identificação das espécies. Por oportunismo, a partir da dispersão destes no ar, algumas espécies de fungos anemófilos, podem provocar patologias ao ser humano (JAWETS, 1998).

Tais fungos são encontrados frequentemente como componentes da microbiota transitória do homem e animais domésticos; como contaminantes de

alimentos; deteriorantes de acervos, madeiras; em água doce e salgada; e são responsáveis pela contaminação de diversos materiais (TRABULSI *et al.*, 1999).

Os fungos anemófilos podem ser encontrados em qualquer lugar que tenha condições para o seu desenvolvimento, no entanto, a maioria deles não causa nenhum tipo de patologia no homem quando inalados. Dos fungos encontrados no ar, 87% não causam nenhum tipo de doença no homem, 10% atuam como oportunistas e 3% são patogênicos (BROOKS *et al.*, 1998).

Quando se tornam oportunistas ou patogênicos, podem aumentar o número de micoses e alergias em humanos ou animais e doenças em plantas (WANKE, LAZERA e NUCCI, 2000; MEZZARI *et al.*, 2003).

A contagem e caracterização dos fungos anemófilos assim como os fatores internos e externos que levam à formação dessa microbiota, são importantes para avaliar se os locais trabalho, onde se expõe os funcionários, possuem micobiota equilibrada para evitar possíveis contaminações e patologias provocadas por fungos oportunistas (CORRÊA, 1998; KNEIFEL, CZECH & KOPP, 2001).

Devido à importância relacionada às doenças causadas por fungos anemófilos é que explicam-se os estudos com estes fungos, pois as doenças causadas pelo ar interno já estão entre as principais causas de pedidos de afastamento do trabalho, tanto nos Estados Unidos quanto na Europa (QUADROS *et al.*, 2009).

Por exemplo, indivíduos de terceira idade passam até 90% do seu tempo em ambientes fechados (ZHANG, 2004), e os poluentes contidos no ar desses ambientes podem ser tóxicos, principalmente para indivíduos suscetíveis a derrame cerebral e doenças cardíacas (QUADROS *et al.*, 2009).

Exposição a fungos ocorre primariamente em ambientes externos, mas eles penetram em interiores e colonizam materiais ali encontrados, resultando em exposição domiciliar e ocupacional. Como são nutrientes para ácaros micófagos, a contaminação por fungos dentro das residências aumenta a população destes, e como consequência tem-se aumento no número de alérgenos (GREEN, MITAKAKIS & TOVEY, 2003).

A concentração de estruturas de frutificação de fungos no meio ambiente depende de muitos fatores, incluindo condições climáticas e vegetação. Os tipos e prevalência de fungos presentes em ambientes fechados, dentro dos domicílios, dependem de inúmeros fatores, como umidade, ventilação, presença ou ausência de

carpetes, animais de estimação e plantas (KOZAK *et al.*, 1979; GREEN, SERCOMBE & TOVEY, 2005).

A contagem de propágulos de fungos em ambientes fechados, e no ar livre, varia consideravelmente dependendo de vários fatores, e entre eles os ambientais, a ventilação, o número de pessoas que ocupam o ambiente, a natureza e o grau de atividade exercida por essas pessoas, bem como a umidade relativa do ar (KOZAK *et al.*, 1979; GREEN, SERCOMBE & TOVEY, 2005).

Estudos de contaminação do ar de interiores e exteriores são necessários para definição da microbiota fúngica a fim de avaliar as alergias nos pacientes de diferentes locais geográficos (KOZAK *et al.*, 1979; BIERMAN & VAN ARSDEL, 1987; PORTNOY *et al.*, 1987; GRAVESEN, 1999), pois alguns destes fungos podem causar reações alérgicas ou tóxicas, enquanto outros podem causar infecções em indivíduos suscetíveis (LINDFORDS & WICKMAN, 1995).

Os fungos são muito resistentes, podendo sobreviver por longos períodos em condições adversas. O crescimento vegetativo ocorre de forma eficaz principalmente entre 18° C a 32° C e, embora não reproduzam-se abaixo de zero grau, podem permanecer viáveis, em estado latente, em temperaturas negativas (-45° C a -55° C) ou até menos. Temperaturas acima de 75° C geralmente são letais para fungos, porém existem alguns fungos termófilos que, apesar de sobreviverem, não produzem micélio reprodutivo abaixo de 45° C (LINDFORDS & WICKMAN, 1995).

Os fungos crescem rapidamente em qualquer época quando as condições são favoráveis. Dentro das casas, os fungos se desenvolvem com maior intensidade em recipientes para depositar lixo, lugares de armazenamento de alimentos, estofados, papel de parede, cortinas de pano, porões, ar condicionado, roupas de couro, entre outros fômites (PAGÁN ALEMÁN *et al.*, 1984).

Apesar de serem considerados um dos principais decompositores da natureza e terem ampla aplicabilidade na indústria farmacêutica, alimentícia, de combustíveis e cosmética, bem como, no controle biológico de parasitos e insetos, esses fungos encontrados no ar e na poeira apresentam papel relevante na micologia médica pelo seu potencial patogênico (ZAITZ *et al.*, 1998; LACAZ *et al.*, 2002).

2.3 Contaminação de ambientes laboratoriais e hospitalares

A contaminação do ambiente laboratorial e hospitalar por bactérias, vírus e fungos ocorre através do ar, água, pessoas e objetos ocasionalmente contaminados por pessoas que transitam nesses locais, assim como pacientes internados. O monitoramento de ambientes tem sido prioridade na qualidade dos laboratórios e hospitalares (AYLIFFE et al., 1966; SHERLOCK et al., 2009).

Os fungos considerados como alergênicos, denominados contaminantes ou anemófilos, veiculados através do ar, podem causar diversas manifestações alérgicas respiratórias, como rinite, asma alérgica e outras manifestações decorrentes de hipersensibilidade do tipo III (alveolite alérgica extrínseca ou pneumonite). Além dos casos de alergia, muitos fungos oportunistas como *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., são responsáveis por doenças desde otites, micotoxicoses, infecções urinárias, onicomicoses, infecções oculares até fungemias (CARMO, BELÉM & CATÃO, 2007; JORGE, 2012). As infecções fúngicas são comuns e possuem grande importância em pacientes imunocomprometidos, por serem difíceis de tratar e muitas vezes, anteciparem a sua morte. Como, por exemplo, em pacientes com transplante de medula óssea, uma infecção invasiva por leveduras ou aspergilose pulmonar é responsável por pelo menos metade das mortes precoces (MORRIS, 2005). Um estudo realizado sobre a epidemiologia da septicemia descreveu um aumento de 207% dos casos de infecções por fungos entre 1979 a 2000, sendo, principalmente, relacionados aos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus* (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Dentre os fatores de patogenicidade, está a capacidade de algumas espécies de leveduras formar biofilme, potencializando seus fatores de virulência, adquirindo assim maior proteção contra as defesas do hospedeiro e ambiente (ZANATTA & RÖSING, 2007).

As rotinas de boa higiene, baseadas na limpeza de superfícies são recomendadas para controlar a propagação de patógenos em ambientes laboratoriais e hospitalares. A limpeza remove mecanicamente sujidades que predispõem o crescimento de microrganismos e elimina a microbiota residente (ANDERSEN et. al, 2009).

2.4 Principais gêneros fúngicos presentes/contaminantes do ar

2.4.1 *Alternaria* spp.

Possui distribuição mundial, sendo normalmente considerado um contaminante saprófita. Além de ser um importante alergênico, já foi descrito como agente casual de lesões cutâneas, caratomicose, osteomelite, doenças pulmonares e infecções no septo nasal, geralmente causadas por inoculação accidental (ZOPPAS, 2005).

Macromorfologicamente têm crescimento rápido (três a quatro dias) com textura aveludada. A colônia se apresenta lanosa, sendo inicialmente branca-acinzentada tornando-se verde musgo com tendência ao preto. O reverso apresenta cor preta (SIDRIM et al., 2004; ZOPPAS, 2005).

Na micromorfologia apresentam hifas demáceas septadas com numerosos dictioconídios em cadeia, formados a partir de uma hifa através de um poroconídio (SIDRIM et al., 2004). Os conídios (20-60 µm) possuem septos horizontais e verticais e base na forma de baquete com ápices afilados (ZOPPAS, 2005). Uma das extremidades do conídio mostra-se pontiaguda, formando um bico, geralmente seguido de outro conídio (SIDRIM et al., 2004).

2.4.2 *Aspergillus* spp.

As espécies de *Aspergillus* são ubíquas no ambiente, podendo ser encontradas no solo, água e no ar; crescem em uma ampla variedade de materiais orgânicos (VANDEWOODE et al., 2006). Os fungos do gênero *Aspergillus* dão origem a grande quantidade de conídios pequenos (2-6µm), lisos ou rugosos, que penetram facilmente no sistema respiratório e nos seios paranasais, causando infecções em pacientes suscetíveis, além de acometer pacientes com traumas e feridas, imunodeprimidos, diabéticos, entre outros (SIDRIM, CORDEIRO & ROCHA, 2004).

As principais espécies do gênero *Aspergillus* estão distribuídas atualmente desta forma: *Aspergillus* seção *Fumigati*, *Aspergillus* seção *Flavi*, *Aspergillus* seção *nigri*, *Aspergillus* seção *Circumdati* (RICHARDSON & WARNOCK, 2003; SIDRIM & ROCHA, 2004; BRUN, 2011).

2.4.2.1 *Aspergillus* seção *fumigati*

Apresenta em sua maioria colônias de crescimento rápido. Inicialmente, colônias de texturas algodonosa e cor branca, tornando-se cinza-esverdeada e textura mais veludosa, com reverso branco ou acastanhado. A sua micromorfologia apresentam conidióforos liso, incolor com tendência terminal a verde; vesícula hemiesférica e com série de fiálides densas, localizada nos três quartos superiores da vesícula. Os conídios são globosos, podendo apresentar-se também na forma de rugosos ou equinulados (RAPPER & FENNEL, 1965; SIDRIM, CORDEIRO & ROCHA, 2004).

2.4.2.2 *Aspergillus* seção *flavi*

Macromorfológicamente têm crescimento e maturação rápidos (dois a três dias) com textura arenosa de grãos grandes e coloração amarelo-esverdeada. O reverso é branco ou cinza. Na micromorfologia apresentam conidióforo incolor, vesícula hemiesférica de variadas dimensões, coroa bisseriada com formação de métrulas e fiálides. Os conídios são globosos, lisos ou rugosos (RAPPER & FENNEL, 1965; SIDRIM, CORDEIRO & ROCHA, 2004).

2.4.2.3 *Aspergillus* seção *nigri*

Macromorfológicamente ocorre a maturação das colônias em três a quatro dias, inicialmente com textura algodonosa, coloração branca ou amarelada que rapidamente tornam-se pretas, com textura arenosa de grânulos grandes, reverso branco-amarelado. À observação micromorfológica, possuem os conidióforos de coloração variável do hialino ao castanho, com paredes lisas e espessas; a vesícula é globosa com duas fileiras radiais. Os conídios são globosos, castanhos escuros, lisos ou equinulados (RAPPER & FENNEL, 1965; SIDRIM, CORDEIRO e ROCHA, 2004).

2.4.2.4 *Aspergillus* seção *circumdati*

As espécies da Seção *circumdati* são predominantemente bisseriadas e apresentam conídio amarelo ou ochraceus. São economicamente importantes, pois algumas produzem a ocratoxina A. esses micro-organismos também são utilizados na biotransformação de esteroides e alcaloides (VARGA et al., 2003).

O primeiro isolado descrito como produtor de ocratoxina foi identificado como *Aspergillus ochraceus* (VAN DER MERWE, STEYN & FOURIE, 1965), desde então novas espécies têm sido descritas. Os fungos pertencentes à Seção *circumdati*, foram encontrados em frutos de café, onde a presença desse fungo não é desejável, pois muitas espécies deste gênero são produtoras de micotoxinas (FRISVAD et al., 2004; SAMSON, HONG & FRISVAD, 2006).

2.4.3 *Cladosporium* spp.

É caracterizado como um fungo ambiental de distribuição universal, sendo um dos gêneros mais citados em estudos de monitoramento em ambientes externos, facilmente veiculado pelo vento devido ao tamanho reduzido dos conídios (2-4µm). Geralmente são considerados contaminantes, porém são relatados casos de feohifomicoses superficiais e profundas (SIDRIM et al., 2004).

Vale ressaltar que foi criado um novo gênero *Cladophialophora* para agrupar as espécies patogênicas de *Cladosporium* spp., que possuem afinidade principalmente pelo sistema nervoso central (SIDRIM et al., 2004).

Como características macromorfológicas tem crescimento moderadamente a lento (sete dias) e possui textura aveludada baixa de cor verde-oliva escuro a negro e o reverso negro (SIDRIM et al., 2004). Na micromorfologia apresentam filamentos demáceos, com conidióforos curtos ou longos, sendo que nas extremidades apresentam conídios em cadeia. Os conídios são lisos ou verrucosos, elipsoides ou globosos, apresentando uma cicatriz hilar pigmentada, que é característica do gênero (SIDRIM et al., 2004).

2.4.4 *Curvularia* spp.

A maioria das espécies é encontrada em países tropicais e subtropicais, contudo são consideradas de larga distribuição. São considerados primariamente como saprófitas. Clinicamente, o gênero pode ser esporadicamente implicado em casos de ceratite, sinusites, micetomas e feo-hifomicoses de distintos sítios anatômicos (SIDRIM et al., 2004).

As colônias do gênero *Curvularia* spp, tem crescimento rápido (três a quatro dias), são baixas de textura aveludada, de tom verde-oliva escuro, marrom ou preto e recobertas de um micélio algodonoso frouxo de tonalidade cinza, o reverso é preto (SIDRIM et al., 2004). Na micromorfologia apresenta hifas demáceas septadas, com conidióforos eretos, castanhos e multicelulares. Os macroconídios (20-40µm), apresentam quatro a cinco células, são curvos, escuros, com distensão central e extremidades mais claras que o centro (SIDRIM et al., 2004; ZOPPAS, 2005).

2.4.5 *Fusarium* spp.

São microrganismos ubíquos e fitopatógenos, porém podem causar grande variedade de manifestações clínicas, atingindo tecidos superficiais e profundos. Diversos são os quadros clínicos, tais como: ceratite, micetomas, onicomicoses e formas cutâneas. Infecções invasivas acometem pacientes imunossuprimidos. As colônias são algodonosas, de coloração variando de branca a cinza, rósea ou violeta, tem crescimento rápido (dois a quatro dias). O reverso é bastante variável, mas de modo geral mais claro que o verso (SIDRIM, CORDEIRO e ROCHA, 2004).

Na micromorfologia possuem hifas hialinas delgadas e septadas. Produzem micro e macroconídios produzidos a partir de fiálides em forma de fuso hialino. Os macroconídios são solitários, com extremidades afiladas, piriformes ou falciformes, unicelulares, bicelulares, com até cinco septos, curvos ou retos (ZOPPAS, 2005).

Fusarium moliniforme produz a micotoxina Fumonisina, encontrada principalmente em milho. A fumonisina pode ser fatal para alguns animais, como os equinos, nos quais causa a leucoencefalomalacia, que se caracteriza pela formação de cavitações na substância branca do cérebro, acompanhada de amolecimento da mesma, resultando em morte. O efeito das fumonisinas em humanos não estão bem

esclarecidos, no entanto, evidências sugerem a ocorrência de câncer de esôfago (PITT, 2000).

2.4.6 *Penicillium* spp.

Apresentam ampla distribuição na natureza, são ubíquos e cosmopolitas. Raramente são isolados como agente causador de ceratites, otites, sinusites, infecções urinárias, infecções pulmonares, quadros alérgicos, micotoxicoses e casos de hialo-hifomicoses. As colônias têm crescimento rápido (três a quatro dias) inicialmente apresentam textura algodonosa baixa ou veludosa, de tom branco, que rapidamente se torna amarela-laranja, amarelo-esverdeado, verde ou azul-esverdeado. Reverso castanho-amarelado ao castanho-avermelhado (SIDRIM et al., 2004).

À micromorfologia apresentam hifas hialinas septadas, com conidióforo simples ou ramificados. Apresentam fiálides que dão origem a conídios que se encontram em cadeia de extensão variável. Os conídios (2-6 µm) são esféricos, com parede lisa ou rugosa, hialinos ou levemente esverdeados (SIDRIM et al., 2004; ZOPPAS, 2005).

2.4.7 *Rhizopus* spp.

São frequentemente encontrados sobre matéria orgânica em decomposição. Podem causar infecções respiratórias, cutâneas, subcutâneas ou disseminadas; como também, causar reações alérgicas e produzir infecções gastrointestinais pela ingestão de alimentos contaminados. Acometem pacientes com traumas e feridas, imunodeprimidos, diabéticos, entre outros (LACAZ et al., 1998; MILAN & ZAROR, 2004)

As colônias tem crescimento muito rápido (dois a quatro dias), com textura algodonosa de crescimento denso e inicialmente de tom branco passando a cinza ou amarelo-acastanhado, as quais preenchem toda a superfície do meio de cultivo. O reverso é branco (SIDRIM et al., 2004).

O gênero *Rhizopus* apresenta hifas largas típicas dos zigomicetos, com raras septações. Numerosos estolões são formados unindo grupos de esporangióforos, com numerosos esporangiósforos em seu interior, os quais são irregulares.

Apresentam estolões e rizoides, o que o diferencia do gênero *Mucor* (SIDRIM et al., 2004).

2.4.8 Leveduras

As leveduras fazem parte da microbiota normal do organismo, sendo também isolada no ar ambiente. As principais leveduras encontradas no ar são *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp., sendo associadas a infecções diversas, incluindo sistêmicas (MILAN & ZAROR, 2004).

As colônias das leveduras, de forma geral, tornam-se maduras em 48 horas, produzindo colônias glabras. Possuem textura cremosa e superfície lisa, sendo que colônias de *Candida* spp. apresentam cor branca-bege, enquanto colônias de *Rhodototula* spp. apresentam coloração alaranjada. Apresentam estruturas arredondadas ou ovais, sendo que em algumas espécies do gênero *Candida* podem ser observadas pseudohifas (MILAN & ZAROR, 2004; VANDEWOUDE et al., 2006).

2.4.8.1 *Rhodotorula* spp.

O gênero *Rhodotorula* spp. apresenta leveduras de baixa capacidade fermentativa, não formadoras de esporos e que tem às vezes, pseudo-micélios rudimentares e que se reproduzem por gemação multipolar. Este gênero se distribui amplamente na natureza e se localiza especialmente na poeira e no ar, de onde caem sobre os alimentos. Estas leveduras por conterem pigmentos de várias tonalidade (vermelha, laranja, amarela e rosa), modificam a coloração normal de alimentos: por exemplo, carnes contaminadas surgem como manchas de diferentes matrizes e o chucrute pode adquirir pontos de cor rosada (EVANGELISTA, 2008).

As leveduras do gênero *Rhodotorula* spp. são capazes de sintetizar carotenóides intracelularmente, além de outras substâncias ativas exocelularmente. Ainda que a biossíntese de carotenóides por leveduras seja bem conhecida, seu uso industrial ainda é restrito devido à pouca informação disponível sobre os mecanismos de regulação biossintética e também à ausência de estudos dirigidos, tanto para o aumento da biomassa quanto para produção dos carotenóides (SILVA, 2004).

O processo de reprodução ocorre por gemiparidade. Este processo polar ou multilateral se caracteriza pela formação na periferia celular, de uma saliência ou protuberância (verruga), que é a gema. No decorrer da geminação, a substância citoplasmática e nuclear da célula original passa para a gema. À medida que a gema aumenta de tamanho, se estreita em sua parte inferior, formando uma parede de limitação, em seguida, a gema se separa da célula mãe. Muitas vezes antes do desligamento da gema da célula mãe, pode brotar nesta, ao mesmo tempo, em outros lugares, novos botões, que posteriormente seguem seu ciclo (EVANGELISTA, 2008).

2.4.9 Micélio aéreo estéril

Compreende um grupo heterogêneo de fungos imperfeitos, parasitas e saprófitas, conhecidos apenas por seu estágio miceliano, não apresentando conídios. Nesta ordem estão incluídos fungos que podem apresentar corpos de resistência – esclerócios, que não possuem conídios endógenos. Os esclerócios de forma variada, de marrons a negros, são geralmente pequenos, formando-se na massa miceliana, impedindo uma classificação de espécies dos mesmos (LACAZ et al., 1998).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar a microbiota fúngica ambiental presente em laboratórios de microbiologia de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) durante o período de fevereiro a novembro de 2015, abrangendo as quatro estações.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar fungos leveduriformes em ambientes laboratoriais;
- Isolar e identificar fungos filamentosos anemófilos em ambientes laboratoriais;
- Analisar a influência da sazonalidade na presença e crescimento fúngico em diferentes ambientes laboratoriais.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Fungos anemófilos em ambiente de laboratório de micologia veterinária

MARTINS, Otávia de Almeida; MENDES, Josiara Furtado; CABANA, Ângela Leitzke; TELES, Alessandra Jacomelli; REIS-GOMES, Angelita; FARIA, Renata Osório de; MEIRELES, Mário Carlos Araújo Meireles.

Submetido à revista Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science

FUNGOS ANEMÓFILOS EM AMBIENTE DE LABORATÓRIO DE MICOLOGIA VETERINÁRIA

ANEMOPHILOUS FUNGI IN AN ENVIRONMENTAL VETERINARY MYCOLOGY LABORATORY

MARTINS, Otávia de Almeida¹; MENDES, Josiara Furtado²; CABANA, Ângela Leitzke³;
TELES, Alessandra Jacomelli⁴; REIS-GOMES, Angelita⁵; FARIA, Renata Osório de⁶;
MEIRELES, Mário Carlos Araújo Meireles⁷.

¹Química Ambiental, Mestranda do Programa de Pós graduação em Veterinária – UFPel
otavia.martins@hotmail.com

²Bio, MSc., Doutoranda do Programa de Pós graduação em Veterinárias – UFPel
josiara.mds@hotmail.com

³MV, MSc., Doutoranda do Programa de Pós graduação em Veterinária – UFPel
cabanangela@gmail.com

⁴MV, Mestranda do Programa de Pós graduação em Veterinária – UFPel
ale.teles@gmail.com

⁵MV, MSc., Doutoranda do Programa de Pós graduação em Veterinária – UFPel
angelitagoes@gmail.com

⁶ MV, DSc, Prof. Adjunta de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos – UFPel
renataosorio@ig.com.br

⁷MV, DSc, Prof. Associado de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos – UFPel
meireles@ufpel.edu.br

INTRODUÇÃO

Os fungos, seres eucariontes e heterotróficos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, terra, seres vivos e alimentos. As espécies fúngicas encontradas podem sofrer variações conforme a localidade, estação do ano e grau higroscópico do ar (SIDRIM, 1999).

A concentração de fungos no ambiente ainda depende de outros diversos fatores, incluindo, número populacional, circulação de pessoas e animais, intensidade das trocas de ar e ainda da limpeza e desinfecção ambiental (FALVEY & STREIFEL, 2007, XAVIER, 2008, MATTEI, 2010).

Em seu habitat natural e em condições ambientais adequadas de temperatura e umidade, eles crescem e se reproduzem sexuada e/ou assexuadamente de acordo com a espécie e as necessidades de seu ciclo de vida, se difundindo amplamente na natureza, em consequência da grande produção de elementos de disseminação, os propágulos fúngicos (conídios/esporos). As vias de dispersão mais comuns são o ar atmosférico, a água, os insetos, humanos e animais. Ao atingirem um substrato com condições adequadas, germinam e iniciam um novo ciclo (AL-DOORY; DOMSON, 1984).

Os fungos anemófilos têm o ar atmosférico como seu principal habitat, suportando grandes variações de temperatura, umidade e pH. Sendo assim, são facilmente encontrados em ambientes internos em qualquer lugar que tenha condições para o seu desenvolvimento (LACAZ et al., 2002).

Estima-se que 87% dos fungos anemófilos, quando inalados, não causam doenças em humanos. Contudo, aproximadamente 10% atuam como oportunistas e 3% são patogênicos (JAWETZ et al, 1998, MAGESTE et al, 2012).

Os fungos anemófilos podem causar problemas como a deterioração de materiais, alergias, intoxicações e infecções. Assim, a presença desses fungos em um laboratório de micologia pode causar grandes problemas econômicos, de qualidade diagnóstica, além dos relacionados à pesquisa, podendo causar prejuízo à saúde das pessoas que trabalham no local. Dessa forma, o monitoramento de fungos torna-se necessário para um adequado controle ambiental, fazendo uso das normas de biossegurança, assegurando boas condições higiênico-sanitárias e evitando assim contaminações.

A necessidade de expansão no conhecimento sobre isolamento e identificação de fungos anemófilos, o crescente interesse por micro-organismos alergênicos e a procura de novos indicadores ambientais, vem despertando interesse no estudo destes fungos, já que a frequência e a diversidade dos mesmos pode estar associada à poluição ambiental, sendo, portanto, considerados bons indicadores ambientais (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al, 2001). O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e identificação de fungos anemófilos em diferentes ambientes do Laboratório de Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL).

MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Micologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas. Para este estudo foram coletadas amostras, em duplicata, durante 14 semanas, em diferentes ambientes do laboratório (sala, cozinha, bancada, fluxo e estufa), no período de março a maio de 2014.

A metodologia baseou-se na técnica de sedimentação em placa de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose com adição de cloranfenicol (0,4mg/mL), previamente preparado e esterilizado. Estas placas ficaram abertas durante um período de 20 minutos, situadas a um metro acima do piso, distantes das paredes em locais representativos no laboratório pesquisado. Transcorrido o tempo da coleta, as placas foram fechadas, identificadas, datadas e incubadas a 25°C por até cinco dias, com observação diária.

Transcorrido este período foram analisadas as colônias fúngicas encontradas e quantificadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por placa, de acordo com protocolo descrito no Clinical and Laboratory Standards Institute (CSLI, 2008). A identificação dos gêneros encontrados foi realizada por meio da observação macroscópica das colônias, associando-se ao exame direto destas em lâmina de vidro com coloração de lactofenol azul de algodão e observação em microscópio óptico, no aumento de 40X para a visualização de características microscópicas individuais de cada espécie fúngica, utilizando critérios descritos em chaves de identificação. Os dados foram analisados por estatística descritiva com proporções absolutas e relativas, sendo os resultados apresentados em tabelas de contigências.

RESULTADO

No total de 10 placas expostas semanalmente, em cinco diferentes ambientes (sala, cozinha, bancada, fluxo e estufa) do Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária/UFPel, num total de 140 placas, nas quais foram observadas 1.162 unidades formadoras de colônias, sendo isolados 11 gêneros fúngicos, conforme a tabela 1.

Tabela 1: Gêneros fúngicos encontrados nos diferentes ambientes analisados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária/UFPel, março-maio/2014 (valores expressos de unidades formadoras de colônia – UFC)

Gênero Fúngico	UFC Sala	UFC Cozinha	UFC Bancada	UFC Fluxo	UFC Estufa	UFC Total	Total (%)
<i>Aspergillus</i> <td>42</td> <td>25</td> <td>157</td> <td>87</td> <td>71</td> <td>382</td> <td>32,87</td>	42	25	157	87	71	382	32,87
<i>Alternaria</i> <td>4</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>9</td> <td>18</td> <td>1,55</td>	4	1	2	2	9	18	1,55
<i>Cladosporium</i> <td>17</td> <td>65</td> <td>4</td> <td>15</td> <td>11</td> <td>112</td> <td>9,64</td>	17	65	4	15	11	112	9,64
<i>Curvularia</i> <td>5</td> <td>1</td> <td>6</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>12</td> <td>1,03</td>	5	1	6	0	0	12	1,03
<i>Fusarium</i> <td>61</td> <td>86</td> <td>26</td> <td>48</td> <td>68</td> <td>289</td> <td>24,87</td>	61	86	26	48	68	289	24,87
<i>Mucor</i> <td>0</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>2</td> <td>0,17</td>	0	2	0	0	0	2	0,17
<i>Paecilomyces</i> <td>9</td> <td>10</td> <td>0</td> <td>9</td> <td>3</td> <td>31</td> <td>2,67</td>	9	10	0	9	3	31	2,67
<i>Penicillium</i> <td>35</td> <td>36</td> <td>10</td> <td>15</td> <td>46</td> <td>142</td> <td>12,22</td>	35	36	10	15	46	142	12,22
<i>Rhizopus</i> <td>6</td> <td>2</td> <td>0</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>11</td> <td>0,95</td>	6	2	0	1	2	11	0,95
<i>Rhodotorula</i> <td>36</td> <td>40</td> <td>16</td> <td>21</td> <td>7</td> <td>120</td> <td>10,33</td>	36	40	16	21	7	120	10,33
micélio aéreo estéril	6	7	19	8	3	43	3,70

Os resultados obtidos após o isolamento em cada ambiente serão descritos abaixo: O ambiente denominado sala, os gêneros de fungos isolados foram *Fusarium* spp. (n=16 placas) totalizando 61 unidades formadoras de colônia (UFC), *Aspergillus* spp. (n= 11) totalizando 42 UFC, *Rhodotorula* spp. (n=11) totalizando 36 UFC, seguido por *Penicillium* spp. (n=13) totalizando 35 UFC e *Cladosporium* spp. (n=9) com 17 UFC. Os gêneros *Curvularia* spp., *Alternaria* spp., *Paecilomyces* spp., *Rhizopus* spp. e micélio aéreo estéril foram encontrados em menores quantidades, com (n=3) totalizando 5 UFC, (n=3) com 4 UFC, (n=4) com 9 UFC, (n=4) com 6 UFC e (n=5) com 6 UFC respectivamente.

No ambiente denominado cozinha, o gênero dominante foi novamente o *Fusarium* spp. (n=17 placas) com 86 UFC, seguido do *Cladosporium* spp. (n=7) com 65 UFC,

Rhodotorula spp. (n=7) com 40 UFC e *Penicillium* spp. (n=11) com 36 UFC. Em menores quantidades estavam *Aspergillus* spp. (n=15) com 25 UFC, *Paecilomyces* spp. (n= 4) com 10 UFC, micélio aéreo estéril (n=5) com 7 UFC, *Rhizopus* spp. (n=1) e *Mucor* spp. (n=2) com 2 UFC e representados por 1 UFC *Alternaria* spp. (n=1) e *Curvularia* spp. (n=1).

No ambiente denominado bancada, o gênero mais encontrado foi *Aspergillus* spp. (n=13 placas), importante fungo com representatividade patogênica, com 157 UFC, *Fusarium* spp. (n=14) com 26 UFC, micélio aéreo estéril (n=9) com 19 UFC *Rhodotorula* spp. (n=4) com 16 UFC, em números reduzidos estavam os gêneros *Curvalaria* spp. (n=5) com 6 UFC, *Penicillium* spp. (n=8) com 10 UFC, *Alternaria* spp. (n=2) com 2 UFC e *Cladosporium* spp. (n=4) totalizando 4 UFC.

No ambiente denominado fluxo, o gênero predominante também foi o *Aspergillus* spp. (n= 19) com 87 UFC, em seguida o *Fusarium* spp. (n=19) com 48 UFC e o *Rhodotorula* spp. (n=7) com 21 UFC, em menores quantidades foram isolados, *Cladosporium* spp. (n=2) com 15 UFC, *Penicillium* spp. (n= 5) com 15 UFC, *Paecilomyces* spp. (n= 3) com 9 UFC, micélio aéreo estéril (n=4) num total de 8 UFC, *Alternaria* spp. (n=2) com 2 UFC e *Rhizopus* spp. (n=1) com apenas 1 UFC.

No ambiente denominado estufa, o gênero predominante foi *Aspergillus* spp. (n=11) com 71 UFC, seguido por *Fusarium* spp. (n=21) com 68 UFC, *Penicillium* spp. (n=13) totalizando 46 UFC, em menores quantidades estavam *Cladosporium* spp. (n=6) com 11 UFC, *Rhodotorula* spp. (n=4) com 7 UFC, *Alternaria* spp. (n=5) com 9 UFC, *Paecilomyces* spp. (n=3 placas) e micélio aéreo estéril (n=2) com apenas 3 UFC encontradas e finalizando *Rhizopus* spp. (n=1) com 2 UFC.

Na tabela 2, é apresentado o gênero *Aspergillus* distribuído nas suas seções *Flavi*, *Fumigati* e *Nigri*.

Tabela 2: Gênero *Aspergillus* distribuído nas suas seções, encontrados nos diferentes ambientes analisados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária/UFPel (valores expressos de unidades formadoras de colônia – UFC)

Seções <i>Aspergillus</i>	UFC Sala	UFC Cozinha	UFC Bancada	UFC Fluxo	UFC Estufa	UFC Total
A. seção <i>Flavi</i>	37	6	145	80	64	332
A. seção <i>Fumigati</i>	5	17	9	7	7	45
A. seção <i>Nigri</i>	0	2	3	0	0	5

DISCUSSÃO

A determinação de fungos anemófilos de áreas externas ou internas de ambientes laboratoriais tem sido pouco pesquisada, mas alguns estudos reforçam sua importância devido a contaminação de amostras, comprometendo diagnósticos (MARTINS-DINIZ *et al.*, 2005). Em nosso estudo, em todos os ambientes foram isolados fungos contaminantes potencialmente patogênicos e potencialmente toxigênico, os quais caracterizam-se principalmente e em maior frequência como os pertencentes a *Aspergillus* spp., fungo filamentoso conhecidamente contaminante de ambiente e com caráter oportunista, causador de doenças principalmente respiratórias em indivíduos imunossuprimidos (XAVIER, 2003), *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Rhodotorula* spp.

No que diz respeito à diversidade fúngica anemófila encontrada, este estudo confirma pesquisas antes realizadas em ambientes internos. Molina *et al.* (2002), pesquisando o ar de ambientes interiores de um hospital, encontraram como mais frequente o gênero fúngico *Aspergillus* spp., seguido de outros fungos filamentosos, entre eles, em menor quantidade presentes neste trabalho.

O gênero *Aspergillus*, um dos fungos mais isolados, possui mais de 300 espécies, com cerca de 20 espécies patogênicas, destacando *A. seção fumigati* e *A. seção flavi*, que contaminam o ambiente desprendendo milhares de conídios das suas fiálide e dispersando no ar (SIDRIM; ROCHA, 2004). Este gênero dá origem a grande quantidade de conídios pequenos, lisos ou rugosos e capazes de serem veiculados muito facilmente pelo ar, contaminando amostras de laboratório, humanos e animais imunossuprimidos, caracterizando doenças oportunistas (ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003).

A identificação do *Fusarium* em nosso estudo, corrobora com estudos anteriores, os quais enfatizam a adaptabilidade desse organismo em ambientes diversos, apontando o *Fusarium* spp. como um dos principais fungos anemófilos do mundo, cuja inalação dos conídios pode acarretar em diversas patologias (MENEZES *et al.*, 2006).

Outro fungo isolado em vários ambientes foi o gênero *Rhodotorula* e segundo Gomes-Lopes (2005), essa levedura já foi considerada oportunista, entretanto nos últimos anos tem emergido como patógeno oportunista, causando diversas contaminações e infecções hospitalares.

Essa diversidade de fungos em ambientes fechados, segundo Gontijo Filho *et al.* (2000), resulta da disseminação ocasionada pelas correntes dos ventos, entre outros fatores

abióticos do ambiente externo, e correlaciona-se principalmente no aparecimento de gêneros característicos da microbiota local de determinada região.

Pesquisas em diferentes locais do Brasil apresentam grande variação nos resultados, isso pode estar associado às diferenças geográficas e variações climáticas de cada região, onde segundo Galvagno & Forchiassini (2010) é possível que a falta de crescimento se deva à ausência dos nutrientes necessários para desenvolvimento de certas espécies fúngicas e demonstração de suas estruturas de reprodução necessárias à caracterização de espécies. Essa variação também pode estar associada à forma em que cada pesquisa foi realizada (local, coordenadas geográficas, estação do ano), ou devido as condições de análise e interpretação dos dados de cada local, segundo protocolo laboratorial. Os fungos apresentam diferenciações em sua incidência, que pode variar com a estação do ano, a umidade do ar, temperatura, hora do dia, velocidade e direção do vento e, evidentemente pela presença humana e o tipo de climatização do ambiente (GAMBALE *et al.*, (1993); LACAZ *et al.* 2002; MEZZARI *et al.*, 2002). O estudo da sazonalidade da composição da microbiota do ar é de suma importância (MEDRELA-KUDER, 2003). Neste estudo não foi possível observar nenhuma variação sazonal da microbiota anemófila, uma vez que não houve uma busca direcionada a repetir a coleta nos mesmos ambientes em diferentes períodos do ano. A pesquisa por uma variação sazonal da microbiota poderá ser uma proposta para estudos posteriores, envolvendo um monitoramento mais ostensivo.

Além disso, Costa (1960) e Pecher et al (1988) destacam também a utilização da técnica sedimentação para o isolamento e identificação de fungos anemófilos, em estudos de contaminação ambiental de ambientes fechados. Os aspectos positivos deste estudo são: técnica simples, de fácil execução, além de permitir o estudo e a identificação das culturas fúngicas de maneira genérica; possibilitar o estudo da dispersão semanal de propágulos fúngicos em determinada região; permitir isolar fungos do ambiente e preparar embasamento para estudos de etiologia de processos alérgicos do sistema respiratório (COSTA, 1960). Porém como aspectos negativos são ressaltados: a dificuldade de obter a variação quantitativa de crescimento dos fungos isolados, devido às dificuldades em saber o volume e a velocidade das correntes de ar que passam sobre as placas em exposição e o crescimento rápido de certos fungos, menos exigentes, prejudicando o crescimento de outros secundários e sua consequente classificação (COSTA, 1960).

A partir da análise dos dados desta pesquisa, é possível comprovar a grande ocorrência de fungos anemófilos nos ambientes laboratoriais analisados, tendo em vista o isolamento e a identificação de gêneros distintos. O gênero mais frequente observado foi o *Aspergillus*

distribuídos nas suas seções *Flavi*, *Fumigati* e *Nigri*. Estes resultados conduzem à tomada de medidas relacionadas ao controle ambiental dentro do laboratório avaliado.

AGRADECIMENTOS

CNPq, CAPES e FAPERGS.

REFERÊNCIAS

AL-DOORY, Y.; DOMSON, J.F. **Mould allergy**. Philadelphia: Lea e Febigh, 1984.

CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COSTA, C. A. A. **Contribuição ao Estudo Qualitativo da Flora Micótica do Ar da Cidade de Belém e Sua Possível Relação com Asma Brônquica e Rinite Alérgica**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, Faculdade de Medicina, 1960.

FALVEY, D.; STREIFEL, A. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, p. 35-41, 2007.

GALVAGNO M. A; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos Fungos: crescimento, morfologia e diferenciação. In: **Fungos: uma introdução à biologia bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 2010.

GONTIJO FILHO, P. P.; SILVA, C. R. M.; KRITSKI, A. L. Ambientes climatizados, Portaria 3.523 de 28.08.98 do Ministério da Saúde e padrões de qualidade do ar de interiores do Brasil. **Jornal de Pneumologia**, 26(5), 2000.

JAWETZ, E. ; MELNICK, J.I.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCAU, E. M.; MELO, N. T. 9.ed. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

MAGESTE, J. O.; PEREIRA, T. C. D.; SILVA, G. A.; BARROS, R. A. M. Estudo da Microbiota Fúngica Anemófila de uma Indústria Farmacêutica de Juiz de Fora – MG. **FACIDER- Revista Científica**, vol 1, nº1, 2012.

MATTEI, A. S. **Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MOLINA, R. T.; GARIJOB, M. A. G.; RODRIGUEZ, A. F. M.; PALACIOS, I. S. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. **Allergol Immunopathol** 30:232-8, 2002.

PECHER, S.A., CASTRO, G.B., BORRÁS, M.R.L. Inquérito sobre fungos anemófilos na fronteira do Brasil-Colômbia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 21: 63-66, Abr-Jun, 1988.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; TRUFEM, S.F.B.; GRANDI, R.A.P.; MILANEZ, A.I.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32. p.61-65, 2001.

SIDRIM, J. J. C. & MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287p.

XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABANA, A.L.; SILVA FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. . Contaminação do ar quanto ao gênero Aspergillus em ambiente de reabilitação de animais marinhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 174-179, 2008.

RESUMO: Os fungos que vivem no ar atmosférico são denominados anemófilos, sendo esse habitat o meio de dispersão mais utilizado por esses organismos. Assim, dificilmente pode existir ambiente livre de contaminação fúngica. A presença desses fungos em um laboratório de micologia pode causar problemas relacionados à dificuldade de isolamento fúngico na rotina diagnóstica , assim como a contaminação de culturas fúngicas estocadas e utilizadas em projetos de pesquisa, além da possibilidade de se tornar problema de saúde pública em casos de fungos oportunistas ou patogênicos. O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e identificação de fungos anemófilos presentes em diferentes ambientes do Laboratório de Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Para este estudo foram coletadas amostras semanais durante os meses de março a maio de 2014, de cinco diferentes ambientes do laboratório, e em duplicita, totalizando 14 coletas. A metodologia baseou-se na técnica de sedimentação em placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose. Foram identificados 11 gêneros de fungos: *Aspergillus* spp. (33,07%), *Fusarium* spp. (24,98%), *Penicillium* spp. (12,27%), *Rhodotorula* spp. (10,38%), *Cladosporium* spp. (9,68%), *Paecilomyces* spp. (2,25%), *Alternaria* spp. (1,55%), *Curvularia* spp. (1,04%), *Rhizopus* spp. (0,95%), *Mucor* spp. (0,17%), e alguns classificados em micélio estéril (3,72%). O gênero mais frequentemente observado foi o *Aspergillus* spp. distribuídos nas seções *Flavi*, *Fumigati* e *Nigri*. Estes resultados conduzem, futuramente, para estudos mais aprofundados de controle ambiental neste ambiente laboratorial.

Palavras-chave: Fungos, contaminação ambiental, identificação.

ABSTRACT: Fungi that live in the atmospheric air are called airborne, and this habitat is used by these organisms for dispersion. So, it is very difficult to find an environment without fungi contamination. It could cause problems related to the difficulty of fungal isolation in a diagnostic routine, as well as contamination of stored fungal cultures that are used in research projects, besides the possibility of becoming a public health problem in cases of opportunistic or pathogenic fungi. The objective of this work was to isolate and identify the airborne fungi present in different environments in the Veterinary Mycology Laboratory of the Federal University of Pelotas. Samples of air were collected weekly between the months of March to May of 2014, in five different environments of the lab, in duplicate, totaling 14 samples. The methodology was based on sedimentation technique in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose agar. It was identified eleven fungi species: *Aspergillus* spp. (33.07%),

Fusarium spp. (24.98%), *Penicillium* spp. (12.27%), *Rhodotorula* spp. (10.38%), *Cladosporium* spp. (9.68%), *Paecilomyces* spp. (2.25%), *Alternaria* spp. (1.55%), *Curvularia* spp. (1.04%), *Rhizopus* spp. (0.95%), *Mucor* spp. (0.17%), and some fungi classified as sterile mycelium (3.72%). The most frequently genus observed was *Aspergillus* spp. distributed in sections: *Flavi*, *Fumigati* and *Nigri*. These results lead, in the future, for more detailed studies of environmental control in this laboratory.

Keywords: Fungi, environmental contamination, identification.

4.2 Artigo 2

Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior

MARTINS, Otávia de Almeida; CABANA, Ângela Leitzke; REIS-GOMES, Angelita;
MENDES, Josiara Furtado; SANTOS, Caroline Lunkes; OSÓRIO, Luiza da Gama;
FARIA, Renata Osório; MEIRELES, Mário Carlos Araújo

Será submetido à Revista Iberoamericana de Micologia

**FUNGOS ANEMÓFILOS E LEVEDURAS ISOLADOS EM AMBIENTES DE
LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA EM INSTITUIÇÃO DE ENSINO
SUPERIOR**

MARTINS, OA^{*1}; CABANA, AL²; REIS-GOMES, A²; MENDES, JF²; SANTOS, CL²; OSÓRIO, LG²; FARIA, RO²; MEIRELES, MCA²

^{*1} Química Ambiental. Escola Superior PPGV – Universidade Federal de Pelotas – Endereço: Rua Dr. Fernando Ferrari, 257, apto 102/B. Pelotas/RS cep:96080090 +555381257454 – otavia.martins@hotmail.com

² Faculdade de Veterinária – FACVET – Veterinária Preventiva – Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinaria – MICVET – Universidade Federal de Pelotas

Resumo

Fungos são organismos heterótrofos que apresentam distintos papéis nos ecossistemas. Existem milhões de espécies de fungos, distribuídos em diversos habitats como ar, água, solo, matéria vegetal e animal em decomposição e vivos. Não existem ambientes livres da presença fúngica, portanto o conhecimento sobre a qualidade do ar é um fator preponderante para a saúde humana, estando relacionada, com a presença, a quantidade e a qualidade da diversidade fúngica no ambiente. O presente estudo foi desenvolvido junto ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Universidade Federal de Pelotas/UFPel, durante o período de um ano (abrangendo as quatro estações). Nove laboratórios foram analisados e as coletas foram realizadas através da técnica de sedimentação em placa. A partir dos resultados obtidos, foi possível comprovar a grande ocorrência de fungos anemófilos nos nove laboratórios analisados durante as quatro estações climáticas (verão, outono, inverno e primavera), com o isolamento e identificação de 16 diferentes gêneros fúngicos, incluindo fungos filamentosos e leveduriformes. Outono foi a estação em que obteve uma maior incidência de crescimento de fungos anemófilos, enquanto que no inverno houve um menor número de crescimento de colônias fúngicas. O gênero mais frequente observado foi *Cladosporium*, seguido de *Penicillium*.

Palavras chave: *Penicillium* spp.; *Cladosporium* spp.; contaminação ambiental; anemófilos.

Introdução

Fungos são organismos heterótrofos, em função disso apresentam distintos papéis nos ecossistemas, podendo ser sapróbios, parasitas de plantas e animais e simbiontes [1]. Estima-se que existam aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos [2], distribuídos em diversos habitats como ar, água, solo, matéria vegetal e animal em decomposição e/ou viva [1].

Em função disso, não existem ambientes livres da presença fúngica, pois estes se propagam em locais habitados, além de poderem sobreviver a grandes variações de temperatura, a baixa taxa de umidade, em grandes variações de pH e em baixas concentrações de oxigênio, sendo comum a exposição a propágulos fúngicos e seus metabólitos, principalmente em ambientes internos como escritórios, escolas, hospitais, laboratórios e residências [3; 4].

Sob o ponto de vista micológico, a atmosfera é um ambiente mais pobre quando comparado com o solo e a água, contudo é o ambiente que circunda e é inalado por humanos e grande parte dos animais, sendo, por isso, intensa a interação com fungos atmosféricos [5]. Considera-se que a qualidade do ar de ambientes do interior de instalações é um dos mais importantes fatores que influenciam a qualidade de vida, e a poluição pode resultar em problemas de saúde e aumento da mortalidade [6].

O conhecimento sobre a qualidade do ar é um fator preponderante para a saúde humana, estando esta relacionada em grande parte com a presença, a quantidade e a qualidade da diversidade fúngica presente no ambiente [7; 8]. Estima-se que 87% dos fungos anemófilos, quando inalados não causem doenças em humanos. Contudo, aproximadamente 10% atuam como oportunistas e 3% são patogênicos [9; 10].

Sabidamente a exposição ao ar contaminado por fungos e seus metabólitos pode causar alergias, sintomas tóxicos e irritantes dentre outras doenças. Apesar deste impacto na saúde humana, poucos estudos têm focado na presença de fungos em ambientes de laboratórios. Além do prejuízo à saúde das pessoas que trabalham em tais locais, a presença de fungos pode causar grandes problemas econômicos, de qualidade diagnóstica e relacionados a pesquisa. O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento e a identificação da microbiota fúngica presente em nove

laboratórios de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), avaliando possíveis variações conforme a sazonalidade.

Material e Métodos

O estudo foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (MICVET-FAVET-UFPel).

Foram analisadas amostras oriundas de nove laboratórios de ensino, pesquisa e extensão da Universidade Federal de Pelotas, mediante termo de consentimento.

As amostras microbiológicas foram coletadas da sala de estudos e dos laboratórios pertencentes as instalações de nove distintos laboratórios de microbiologia da Universidade Federal de Pelotas, todos localizados no mesmo campus.

As coletas ocorreram entre os meses de fevereiro a novembro de 2015, sendo realizadas um total de quatro coletas microbiológicas mensais dos ambientes analisados em cada laboratório, distribuídas conforme as estações climáticas: verão, outono, inverno e primavera. As amostras foram coletadas em triplicada em placas de Petri, totalizando duzentas e vinte oito placas por mês.

A técnica utilizada foi a de sedimentação em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud dextrose com adição de cloranfenicol (0,4mg/mL), previamente preparado e esterilizado. As placas foram expostas durante 20 minutos, a um metro acima do piso, distantes das paredes.

As amostras foram identificadas com local e data de coleta e incubadas a 25°C em estufa durante cinco dias com observação diária para identificação das cepas isoladas.

As colônias fúngicas isoladas foram quantificadas utilizando Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por placa, de acordo com protocolo descrito no Clinical & Laboratory Standards Institute [11].

Para a identificação dos fungos foram observadas as características macroscópicas das colônias, associando-se ao exame direto destas em lâmina de

vidro e observadas em microscópio óptico, no aumento de 400X para a visualização de características microscópicas individuais de cada espécie fúngica. Além disso, realizou-se microcultivo das colônias entre lâmina e lamínula. As amostras filamentosas foram coradas com azul de metileno, enquanto as leveduras foram visualizadas com a coloração de Gram.

A identificação foi feita utilizando-se critérios descritos em chaves de identificação e características morfotintoriais (macro e micromorfológicas). Colônias fúngicas que não apresentaram estrutura de frutificação do micélio reprodutivo, mesmo após exame de microcultivo, foram classificadas como micélio aéreo estéril.

Os dados meteorológicos de temperatura e umidade relativa do ar foram obtidos através dos registros cedidos pelo Laboratório de Agrometeorologia da Estação Agroclimatológica da Embrapa Clima Temperado, localizada na latitude 31° 52' 00" S, longitude 52° 21' 24" W (GRW) e altitude de 13, 24 m, Campus da Universidade Federal de Pelotas/Embrapa.

Os dados foram analisados por estatística descritiva com proporções absolutas e relativas, os resultados foram apresentados em tabelas de contingência, aplicando-se o teste do qui-quadrado (χ^2) apresentando o valor-*P*, interpretado utilizando nível de significância de 5%.

Resultados

Durante o período de estudo foram isoladas um total de 5101 UFC. Conforme a sazonalidade, o outono foi a estação que apresentou maior número de UFC, correspondendo a 35% (1808/5101) do total encontrado, já no inverno obteve-se apenas 17,3% (884/5101).

Não houve diferença significativa entre o número de UFCs encontradas nos distintos laboratórios, assim como também não houve diferença de UFCs encontradas nos distintos ambientes pertencentes aos laboratórios, conforme tabela 1.

Tabela 1. Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de fungos anemófilos encontradas em ambientes pertencentes a distintos laboratórios de microbiologia conforme a sazonalidade

Ambientes dos laboratórios	Verão	Outono	Inverno	Primavera	TOTAL UFC	
	UFC	UFC	UFC	UFC		
Laboratório 1	Laboratório	73	93	46	32	212
	Sala de estudos	75	79	49	49	252
Laboratório 2	Laboratório	92	129	42	49	312
	Sala de estudos	79	109	32	62	282
Laboratório 3	Laboratório	150	158	31	73	412
	Sala de estudos	101	60	61	66	288
Laboratório 4	Laboratório	49	79	55	62	245
	Sala de estudos	85	109	42	63	299
Laboratório 5	Laboratório	48	92	68	49	257
	Sala de estudos	62	45	67	60	234
	Sala de vacinas	39	44	37	47	167
Laboratório 6	Laboratório	109	46	68	61	284
	Sala de estudos	85	63	28	59	235
Laboratório 7	Laboratório	56	202	61	62	381
	Sala de estudos	59	217	32	72	380
Laboratório 8	Laboratório	26	47	50	55	178
	Sala de estudos	25	35	29	50	139
Laboratório 9	Laboratório	57	79	54	66	256
	Sala de estudos	63	122	32	39	256
Total		1.333	1.808	884	1.076	5.101

No total foram isolados 16 gêneros fúngicos: *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula* e micélio aéreo estéril. A estação do outono foi a que apresentou maior diversidade de microbioma fúngico, isolando-se todos os 16 gêneros. No verão e primavera não houve isolamento do gênero *Rhizopus*, e diferentemente das outras estações nas quais *Penicillium* spp. foi o segundo fungo mais frequente, a primavera teve isolamento da levedura *Rhodotorula*. O inverno foi a estação com menor número de gêneros fúngicos isolados não havendo isolamento de *Acremonium* spp., *Aureobasidium* spp. e *Nigrospora* spp.. *Cladosporium* spp. foi predominante no número de isolamentos em todas as estações e em todos os laboratórios, conforme

tabelas 2 e 3, seguido de *Penicillium*, do grupo micélio aéreo estéril e de *Aspergillus* spp. Sendo, o grupo micélio aéreo estéril composto por fungos filamentosos não produtores de micélio reprodutivo, possivelmente pertencentes a um grupo heterogêneo de gêneros.

Tabela 2. Gêneros fúngicos e respectivas Unidades formadoras de Colônias (UFC) encontradas em amostras do ar de cinco dos laboratórios analisados conforme a sazonalidade

GÊNEROS	LABORATÓRIO 1					LABORATÓRIO 2					LABORATÓRIO 3					LABORATÓRIO 4					LABORATÓRIO 5				
	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T
<i>Absidia</i>	1	3	0	0	4	2	0	3	3	8	0	0	0	3	3	0	2	2	1	5	0	0	4	1	5
<i>Acremonium</i>	3	7	0	1	11	3	8	0	3	14	5	1	0	4	10	3	9	0	3	15	2	6	0	2	10
<i>Alternaria</i>	1	19	0	0	20	8	19	1	4	32	6	15	7	5	33	12	11	6	5	34	5	10	10	3	28
<i>Aspergillus</i>	10	6	11	6	33	2	1	8	1	12	3	5	14	8	30	17	4	11	5	37	2	0	18	6	26
<i>Aureobasidium</i>	1	5	0	1	7	1	6	0	0	7	1	1	0	1	3	0	1	0	1	2	1	1	0	1	3
<i>Bipolaris</i>	0	3	0	0	3	5	0	0	0	5	1	8	0	1	10	4	5	0	2	11	1	8	0	0	9
<i>Cladosporium</i>	21	23	27	18	89*	43	32	16	33	124*	52	58	19	29	158*	13	34	20	26	93*	57	67	34	44	202*
<i>Curvularia</i>	11	18	1	1	31	10	22	1	6	39	24	14	5	0	43	20	24	7	5	56	9	7	9	5	30
<i>Epicoccum</i>	2	2	0	1	5	5	0	1	3	9	3	6	0	3	12	2	5	1	3	11	3	1	0	1	5
<i>Fusarium</i>	2	18	2	1	23	9	14	1	0	24	4	10	5	2	21	7	10	5	4	26	2	2	5	3	12
<i>Mucor</i>	4	15	5	2	26	9	20	5	5	39	5	18	6	8	37	10	19	3	8	40	17	10	14	5	46
<i>Nigrospora</i>	15	1	0	0	16	7	2	0	1	10	2	2	0	1	5	5	2	0	1	8	1	2	0	0	3
<i>Paecilomyces</i>	2	12	3	11	28	5	27	8	6	46	3	6	5	10	24	4	0	3	0	7	6	7	14	14	41
<i>Penicillium</i>	51	16	26	16	109	30	30	9	19	88	114	33	20	16	183	7	24	26	14	71	13	27	27	20	87
<i>Rhizopus</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	6
<i>Rhodotorula</i>	1	4	2	7	14	10	5	3	9	27	4	2	1	18	25	0	0	0	10	10	7	1	9	13	30
MAE	23	20	17	16	76	22	52	18	18	110	24	39	10	30	103	30	38	13	37	118	23	32	22	38	115
TOTAL	148	172	95	81	496	171	238	74	111	594	251	218	92	139	700	134	188	97	125	544	149	181	172	156	658

V= Verão; O= Outono; I= Inverno; P=Primavera; T= Total; MAE= Micélio Aéreo Estéril * p=0,000

Tabela 3. Gêneros fúngicos e respectivas Unidades formadoras de Colônia (UFC) encontradas em amostras do ar de quatro dos laboratórios analisados conforme a sazonalidade

GÊNEROS	LABORATÓRIO 6					LABORATÓRIO 7					LABORATÓRIO 8					LABORATÓRIO 9				
	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T	V	O	I	P	T
<i>Absidia</i>	0	0	2	3	5	2	0	1	3	6	0	1	1	2	4	0	3	1	1	5
<i>Acremonium</i>	1	0	0	1	2	0	1	0	2	3	1	1	0	0	2	5	4	0	2	11
<i>Alternaria</i>	2	1	4	3	10	4	9	4	2	19	1	1	1	0	3	6	18	3	1	28
<i>Aspergillus</i>	38	1	11	3	53	4	173	12	2	191	4	4	6	1	15	6	5	9	4	24
<i>Aureobasidium</i>	0	0	0	2	2	2	9	0	1	12	1	1	0	0	2	0	0	0	1	1
<i>Bipolaris</i>	3	4	0	0	7	5	6	0	0	11	3	2	0	2	7	5	8	2	0	15
<i>Cladosporium</i>	46	50	13	36	145*	41	31	23	27	122*	10	26	22	33	91*	43	49	19	27	138*
<i>Curvularia</i>	10	2	5	5	22	9	6	2	2	19	4	3	4	4	15	8	15	7	5	35
<i>Epicoccum</i>	2	1	0	2	5	1	3	0	0	4	0	0	0	1	1	1	1	0	2	4
<i>Fusarium</i>	0	0	8	3	11	2	5	7	2	16	1	1	0	3	5	2	9	5	1	17
<i>Mucor</i>	4	1	7	6	18	5	12	3	7	27	5	4	5	5	19	7	14	6	1	28
<i>Nigrospora</i>	7	0	0	0	7	11	0	0	0	11	8	3	0	0	11	4	6	0	0	10
<i>Paecilomyces</i>	10	15	5	3	33	2	17	3	8	30	1	5	8	4	18	4	10	5	5	24
<i>Penicillium</i>	60	19	27	6	112	13	107	25	17	162	4	24	11	14	53	8	29	12	11	60
<i>Rhizopus</i>	0	0	1	0	1	0	3	2	0	5	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0
<i>Rhodotorula</i>	7	7	3	20	37	8	1	0	31	40	1	0	0	12	13	5	1	0	19	25
MAE	4	8	10	27	49	6	36	11	30	83	7	6	18	24	55	16	29	17	25	87
TOTAL	194	109	96	120	519	115	419	93	134	761	51	82	79	105	317	120	201	86	105	512

V= Verão; O= Outono; I= Inverno; P=Primavera; T= Total; MAE= Micélio Aéreo Estéril * p=0,000

A concentração dos fungos no ambiente variou conforme a estação climática ($p=0,000$). Entre todos os gêneros identificados *Cladosporium* foi predominante em todas as estações ($p=0,000$), seguido por *Penicillium*, *Aspergillus* e *Curvularia*. A maior concentração de UFCs ocorreu no período entre o final do verão e início do outono (Figura 1).

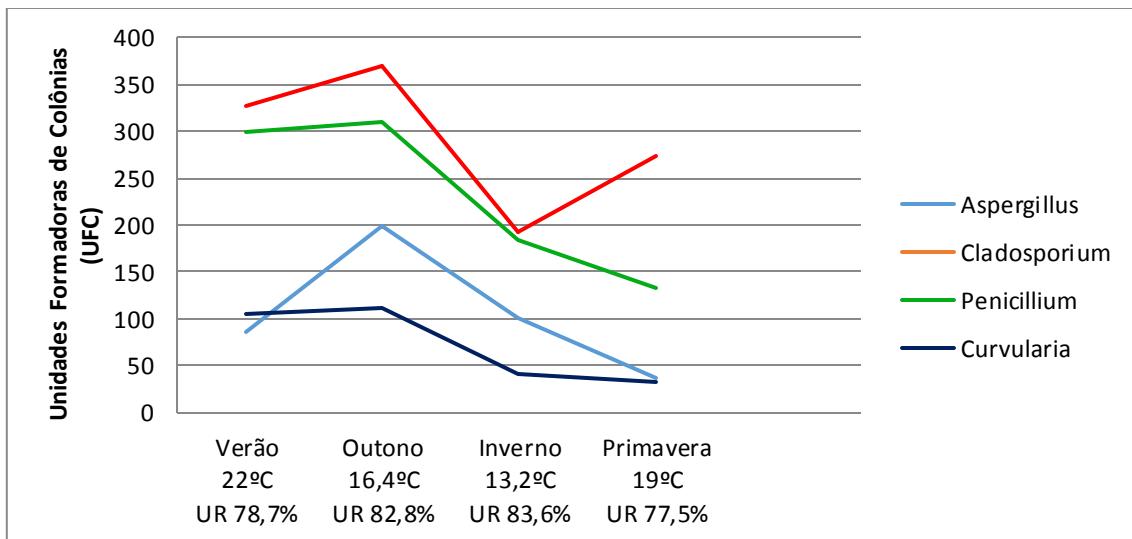


Figura 1. Variação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos quatro principais gêneros fúngicos isolados nos laboratórios de microbiologia de uma Instituição de Ensino Superior, conforme as estações climáticas e suas respectivas médias de temperaturas e umidade relativa do ar.

Discussão

A exposição aos fungos ocorre primariamente em ambientes externos, contudo, conídios podem penetrar ambientes internos e colonizar materiais e o ar atmosférico [12]. Em estudo realizado, na mesma região, sobre fungos em ambiente externo foi encontrado uma diversidade de fungos semelhantes à encontrada no presente estudo [13].

Cladosporium spp., *Penicillium* spp. e *Aspergillus* foram os gêneros mais prevalentes, em conformidade com outros estudos [14; 15; 16; 4]. A predominância de *Cladosporium* em relação a outros fungos anemófilos é bem documentada, de

forma semelhante outros pesquisadores encontraram taxas de predominância em torno de 50% deste gênero sobre o total de fungos isolados. Dados obtidos independentemente de o local das análises ser em ambientes internos ou externos, rurais ou urbanos, sendo este considerado o fungo atmosférico mais abundante [5].

Por suas características morfológicas, como alta taxa de produção e liberação de conídios em todas as fases de seu desenvolvimento e baixa biomassa, *Cladosporium* se torna um excelente dispersor [17]. Podendo contaminar ambientes internos e, em concentrações elevadas, causar alergias respiratórias [13]. Porém, este fungo também classifica-se como um saprófita raramente associado a casos de patologias, sendo uma delas a cladosporiose, uma micose do sistema nervoso central com porta de entrada e fatores de virulência desconhecidos [18].

Penicillium e *Aspergillus*, diferentemente de *Cladosporium*, se caracterizam por uma maior concentração em ambientes internos que externos, muito provavelmente por serem xerófilicos tendo um bom crescimento e liberação de conídios em ambientes com baixa umidade, como poeira e materiais utilizados na construção de prédios [19; 20]. Esses fungos podem causar aumento no risco de infecções respiratórias, irritação das vias aéreas e asma, alergias, problemas graves em imunossuprimidos e riscos para quem manipula fitoterápicos contaminados, tendo em vista a possível inalação durante o processo de manipulação [21; 18; 22]. Ainda é necessário considerar que esses fungos são potentes produtores de micotoxinas e compostos orgânicos voláteis [18; 19; 23].

Considera-se que quase 100% as partículas de bioaerosóis presentes no interior dos ambientes variam conforme o meio externo [24], o que explicaria a maior ocorrência de UFCs registrada no final do verão e inicio do outono, estações que registram respectivamente temperaturas médias máximas e mínimas variando entre 27,8 a 12,4°C e umidade relativa do ar entre 78,7% e 82,8%. Estas condições são consideradas boas para ocorrência de esporulação, que tem como temperatura ótima entre 25 e 30°C, do mesmo modo a liberação de conídios é favorecida pela alta umidade relativa do ar [21].

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível comprovar a grande ocorrência de fungos anemófilos nos nove laboratórios analisados durante as quatro estações climáticas (verão, outono, inverno e primavera), com o isolamento e identificação de 16 gêneros fúngicos, além do grupo heterogêneo com micélio aéreo estéril. Outono foi a estação em que teve uma maior incidência de crescimento de

fungos anemófilos, enquanto que no inverno houve o menor número de crescimento de colônias. Os gêneros mais frequentes foram *Cladosporium* spp.e *Penicillium*.

Conflito de interesse

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

Agradecimentos

Às fontes finanziadoras da pesquisa CNPq, CAPES e FAPERGS.

Aos laboratórios, que se disponibilizaram e contribuíram para a realização da pesquisa.

Referências

- [1] DIX, N.J.; WEBSTER, J. **Fungal Ecology**, London, Chapman and Hall, 1995.
- [2] HAWKSWORTH, David L. **The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited**. *Mycological Research*, Volume 105, Issue 12, December 2001, p. 1422–1432.
- [3] CHAO, H.J.; SCHWARTZ, J.; MILTON, D.K.; BURGE, H.A. Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environ Health Perspect*, 2002; 110:777-82.
- [4] MOLINA, R. T.; GARIJOB, M. A. G.; RODRIGUEZ, A. F. M.; PALACIOS, I. S. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergol Immunopathol* 30:232-8, 2002.
- [5] CABRAL, J.P.S. / **Science of the Total Environment** 408, 2010 p. 4285–4295.
- [6] NEVALAINEN, A.; TÄUBEL, M.; HYVÄRINEN, A. **Indoor fungi: companions and contaminants**. *Indoor Air* 2015; 25: 125–156.

- [7] SHELTON, B.G.; KIRKLAND, K.H.; FLANDERS, W.D.; MORRIS, G.K. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(4) 1743-53.
- [8] ESQUIVEL, P.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G.; SOSA, M.A. Microhongos anemófilos em ambientes abiertos de dos ciudades del noreste argentino. *Bol Micol.* 2003; 18:21-8.
- [9] JAWETZ, E. ; MELNICK, J.I.; ADELBERG, E. **Microbiología médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 24.
- [10] MAGESTE, J. O.; PEREIRA, T. C. D.; SILVA, G. A.; BARROS, R. A. M. Estudo da Microbiota Fúngica Anemófila de uma Indústria Farmacêutica de Juiz de Fora – MG. **FACIDER- Revista Científica**, vol 1, nº1, 2012.
- [11] CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; approved standard-third edition. CLSI document M27-A3. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- [12] BURGE, Harriet A. **An update on pollen and fungal spore Aerobiology**. J ALLERGY CLIN IMMUNOL VOLUME 110, NUMBER 4, p.544-552, 2002.
- [13] BERNARDI, Eduardo; COSTA, Elton Luiz Guimarães da; NASCIMENTO, José Soares do. Fungos anemófilos e suas relações com fatores abióticos, na praia do Laranjal, Pelotas, RS. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, ISSN 1519-5228 V. 6 (1). Rio Grande do Sul, 2006.
- [14] EBNER, M.R.; HASELWANDTER, K.; FRANK, A. **Seasonal fluctuations of airborne fungal allergens**. Mycol Res 1989;92(2):170–6.
- [15] EBNER, M.R.; HASELWANDTER, K.; FRANK, A. **Indoor and outdoor incidence of airborne fungal allergens at low and high-altitude alpine environments**. Mycol Res 1992; 96(2): 117–24.

- [16] CARMO ES, BELÉM LF, CATÃO RMR, et al. Microbiota Fúngica Presente em Diversos Setores de um Hospital Público em Campina Grande – PB. **Rev. Bras Anal Clin.** 2007;39(3):213-216.
- [17] MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, S. A. S.; BERN, L. A. G.; GESU, G. D. Os Fungos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Associação Médica.** São Paulo. Vol. 49, n 3, 2003.
- [18] LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCAU, E. M.; MELO, N. T. 9.ed. **Tratado de micologia médica.** São Paulo: Sarvier, 2002.
- [19] NIELSEN, K.F. Mycotoxin production by indoor molds. **Fungal Genet Biol** 2003; 39:103–77.
- [20] HORNER, W.E.; WORTHAN A.G.; MOREY, P.R. Air- and dustborne mycoflora in houses free of water damage and fungal growth. **Appl Environ Microbiol** 2004;70(11):6394–400.
- [21] PASANEN, A-L.; PASANEN, P.; JANTUNEN, M.J.; KALLIOOKSKI, P. Significance of air humidity for fungal spore release into the air. **Atmos Environ** 1991; 25(2): 459–62.
- [22] ROCHA, L. de O.; SOARES, M. M. S. R.; CORRÊA, C. L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Peumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-Chile) comercializadas na cidade de Campinas, Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm. Braz J. Pharm. Sci.** vol. 40, 2004.
- [23] MOULARAT, S.; ROBINE, E.; RAMALHO, O.; OTURAN, M.A. Detection of fungal development in a closed environment through the identification of specific VOC: demonstration of a specific VOC fingerprint for fungal development. **Sci Total Environ** 2008;407:139–46.
- [24] NAZAROFF, W.W. **Indoor bioaerosol dynamics.** Indoor Air. 2014. doi:10.1111/ina.12174.

5 Considerações Finais

Muitos dos fungos encontrados neste estudo podem ser fungos patogênicos aos seres humanos, causando alergias e intoxicações, além de serem importantes contaminantes de amostras. O que torna preocupante a sua presença em todos os ambientes estudados nos laboratórios de microbiologia.

A caracterização e identificação da microbiota fúngica anemófila, foi importante para alertar a responsabilidade dos laboratórios, e evitar problemas econômicos, de qualidade diagnóstica e relacionados a pesquisa, podendo também causar prejuízo à saúde das pessoas que trabalham no local.

Uma das dificuldades encontradas ao longo deste trabalho foi a falta de dados nas revisões de literatura. Havendo muitos trabalhos que fazem o levantamento da micobiota de hospitais, unidades de terapia intensiva, industrias e bibliotecas, enquanto que são insipientes os estudos acerca de contaminação de ambiente de laboratórios, principalmente de instituições de ensino, sendo inexistente o controle da microbiota fúngica.

Acredita-se que a quantidade e diversidade fúngica evidenciadas na pesquisa, se justifiquem pelo fato de serem laboratórios de pesquisa e extensão, intensamente frequentado pelos alunos e funcionários da Instituição. Além disso, a contaminação observada pode ser associada à falta de uma metodologia de limpeza. Por este motivo, sugere-se que sejam adotados métodos de desinfecção mais eficazes nos ambientes pesquisados para assim ter um adequado controle ambiental, além de fazer uso de normas de biossegurança. Assegurando, assim, boas condições higiênico-sanitárias no intuito de melhorar as práticas laboratoriais da Instituição pesquisada, bem como preservar a saúde dos alunos, professores e servidores que frequentam estes locais.

Referências

ANDERSEN, B.M.; RASCH, M.; KVIST, J.; TOLLEFSEN, T.; LUKKASSEN, R.; SANDVIK, L.; WELO, A. Floor cleaning: effect on bacteria and organic materials in hospital rooms. **Journal of Hospital Infection** v. 71, p. 57-65, 2009.

AYLIFFE, G; COLLINS, B.; LOWBURY, J. Cleaning and Disinfection of Hospital Floors. **British Medical Journal**. p. 442-445, 1966.

BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. (1994). Diagnostic Microbiology. 9. ed. St Louis: Mosby.

BERNARDI, Eduardo; COSTA, Elton Luiz Guimarães da; NASCIMENTO, José Soares do. Fungos anemófilos e suas relações com fatores abióticos, na praia do Laranjal, Pelotas, RS. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, ISSN 1519-5228 V. 6 (1). Rio Grande do Sul, 2006.

BIERMAN WC, VAN ARSDEL JR PP. **Clinical evaluation of the patient with allergic and immunologic disease.** In:Lockey RF, editor. Principles of Immunology and Allergy. Philadelphia: WB Saunders; 1987. p.1-26.

BOECHAT J.L.; RIOS J.L. Poluição de Ambientes Internos. **Rev. Bras. Aerg. Imunopatol.** 2011; 34,3, : 83-89.

BOFF, Cristiane. Monitoramento de fungos no ar de unidades de terapia intensiva, 2011. Dissertação mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul

BLEVINS, K.S. (1999). Micologia Médica: Texto e Atlas. 2. ed. São Paulo: Premier

BROOKS, Geo S. et al. **Microbiología médica.** 1998. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 524p.

BRUN, C. P. Monitoramento de fungos no ar: comparação da quantidade de elementos fúngicos viáveis em dois centros de transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) de Porto Alegre. 84f., 2011

CAMERON R. et al *Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites* - Nature 398, 701 - 704 (2009) © Macmillan Publishers Ltd

CARMO ES, BELÉM LF, CATÃO RMR, et al. Microbiota Fúngica Presente em Diversos Setores de um Hospital Público em Campina Grande – PB. **Rev. Bras Anal Clin.** 2007;39(3):213-216.

CORRÊA, B. Micotoxinas humanas e micetismos. In: ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M., eds. 1998. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: Medsi, cap. 27, p.339-346.

ESQUIVEL, P.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G.; SOSA, M.A. Microhongos anemófilos em ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. **Bol Micol.** 2003; 18:21-8.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FALVEY, D.; STREIFEL, A. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 67, p. 35-41, 2007.

FLORES L.H.; ONOFRE S.B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão. **Rev. Saúde Biol.** 2010; 5; 2:22-26

FREIRE, Francisco das Chagas Oliveira; et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2007.

FRISVAD, J.C. et al. New ochratoxin A producina species of *Aspergillus* section *Cirumdati*. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, p.23-43, 2004.

GRAVESEN S. **Microfungal contamination of damp buildings: biological aspects**. In: **Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins**. Ed Johanning E. New York: Eastern New York Occupational and Environmental Health Center;1999.p.505-11.

GREEN BJ, MITAKAKIS TZ, TOVEY ER. **Allergy detection from 11 fungal species before and after germination.** J Allerg Clin Immunol .2003;2:285-9

GREEN BJ, SERCOMBE JK, TOVEY ER. **Fungal fragments and undocumented conidia function as new Aeroallergen sources.** J Allerg Clin Immunol.2005;115:1043 -8.

JAWETZ, E. ; MELNICK, J.I.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica.** 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. 524 p.

JORGE, Antônio O. C. **Microbiologia e Imunologia Oral.** Elsevier, 2012.

KNEIFEL, W.; CZECH, E.; KOPP, B. 2001. Microbial contamination of medicinal plants – a review. **Planta Méd., v.68:** 5-15

KONEMAM. E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. M. (2001). Diagnóstico Microbiológico. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi.

KOZAK JR PP, GALLUP J, CUMMINS LH, GILLMAN AS. **Fatores de importância na determinação da prevalência de mofo.** Ann Alerg.1979;43: 88-94.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica.** 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991, p. 695.

LACAZ C.S., PORTO E., HEINS-VACCARI E.M., MELO N.T. **Fungos e Actinomicetos Oportunistas, Anemófilos ou não.** In: Guia para identificação de interesse médico – Fungos, Actinomicetos e Algas. São Paulo: Sarvier, 1998: 355-359

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS. J. E. C.; VASCCARI-HEINS, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica.** 2002. 9^a ed. São Paulo: SARVIER. 1104p.

LINDFORDS A, WICKMAN M. **Indoor environmental risk factors in young asthmatics : a case-control study.** Arch Dis Child.1995;73:408-12.

MATTEI, A. S. **Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar.** 2010.

83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MENEZES, E.A.; ALCANFOR, A.C.; CUNHA, F.A. Fungos anemófilos na sala de peródicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará. **RBAC**. 2006; 38; 3:155-158.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; SANTOS JR, S.A.; BERNS, L.A.G. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 2002, 44 (5)269-72.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JÚNIOR, S. A. S.; BERN, L. A. G.; GESU, G. D. 2003. Os Fungos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Associação Médica. São Paulo. Vol. 49, n 3.**

MILAN E.P., ZAROR L. **Leveduras: identificação laboratorial.** In: **Micologia à luz de autores contemporâneos.** Sidrim JJ, Rocha MF. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004: 89-101.

MOLINARO, Etelcia M.; CAPUTO, Fátima G.; AMENDOEIRA, Maria Regina R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** 1 ed. Vol.IV. EPSJV, IOC, Rio de Janeiro. 2009.

MORRIS, D. O. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 83-88, 2005.

PAGÁN ALEMÁN JA, ALVAREZ JMN, GARCIA JH, GARCIA FJS,. **Hipersensibilidad inmediata a hongos, valoración clínica y correlación de pruebas citáneas con test de liberación de histamina.** Comunicación al XIV Congreso Nacional del SEAIC.1984; 33:12.

PERDELLI F, CRISTINA ML, SARTINI M, SPAGNOLO AM, DALLERA M, OTTRIA G, et al. **Fungal Contamination in hospital environments.** **Infect Control Hosp Epidemiol** 2006;27:44-7.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PITT, J.I. **Toxigenic fungi and mycotoxins.** British Med. Bul. v.56, n.1, p. 184-192, 2000.

PORTNOY J, CHAPMAN J, BURGE H, MUILEMBERG M, SOLOMON W. ***Epicoccum* allergy: skin reaction patterns and spore/mycelium disparities recognized by IgG and IgE ELISA inhibition.** Ann Allergy. 1987;59:39-43.

QUADROS, M. E.; LISBOA, E. M.; OLIVEIRA, V. L.; SCHIRMER, W. N. 2009. Qualidade do ar interno em ambientes Hospitalares. **Rev. Tecnologia, Fortaleza, v.30 (1):** 38-52.

RAPPER KB, FENNEL DI. **The genus Aspergillus.** Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1965.

RAVEN, Peter H.; EVERET, RAY F.; EICHHORN, SUSAN E. **Biologia Vegetal.** 7 ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2007.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. (1993). Fungal infection: diagnosis and management. Blackwell Scientific Publications, p.1-2; 192- 195.

RICHARDSON M.D., WARNOCK D.W. **Fungal infection – diagnosis and management.** 3th ed. Blackwell Publishing, 2003

SAMSON, R.A.; HONG, S.B.; FRISVAD, J.C. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. **Medical Mycology**, Oxford, v. 44, n.1, p.133-148, 2006

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; TRUFEM, S.F.B.; GRANDI, R.A.P.; MILANEZ, A.I.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32. p.61-65, 2001.

SIDRIM, José J. Costa; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p. 171-190.

SIDRIM J.J.C., ROCHA M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

SIDRIM J.J., PAIXÃO G.C., BRILHANTE R.S., ROCHA M.F. **Principais fungos contaminantes em rotina de micologia médica.** In: *Micologia Médica à luz de*

autores contemporâneos. Sidrim JJ, Rocha MF. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004: 318-326.

SIDRIM J.J., CORDEIRO R.A., ROCHA M.F. **Aspergilose e Fusariose. In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.** Sidrim JJ, Rocha MF. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004: 275-282.

SIDRIM J.J.; ROCHA M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos.** 1ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. 2010. P41-49; 89-101

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos.** 2004. 105 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SHERLOCK, O.; O'CONNELL, N.; CREAMER, E.; HUMPHREYS, H. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness. **Journal of Hospital Infection.** Jun-Jul, p. 1-7, 2009.

STRAUSZ MC. Análise de um acidente fúngico na Biblioteca Central de Manguinhos: um caso de Síndrome do Edifício Doente [dissertação]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública: Fundação Oswaldo Cruz; 2001

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** 8 ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2009.

TRABULSI, Luís Rachid; et al. **Microbiologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 421-422.

VANDEWOODE K.H., BLOT S.I., DEPUYDT P., BENOIT D., TEMMERMANN W., COLARDYN F. et al. **Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients.** Crit Care. 2006; 10(1): R31.

VAN DER MERWE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L. **Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.** Nature, London, v. 205, p. 1112-1113, Mar. 1965.

VARGA, J. et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically importante mycotoxins. **Food Technology biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 30-32, Mar. 3003.

WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M. 2000. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p.153-158.

XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; CABANA, A.L., SILVA FILHO, R. P.; MEIRELES, M. C. A. . Contaminação do ar quanto ao gênero *Aspergillus* em ambiente de reabilitação de animais marinhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 174-179, 2008.

ZAITZ C.; MARQUES S.S.; RUIZ L.R.B.; SOUZA V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. 1ed. Medsi. Rio de Janeiro, 1998. P43-50, 113-121.

ZANATTA, F.B; RÖSING, C.K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. **Scientific-A** v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007.

ZHANG, Y. Indoor air quality engineering. Boca Raton.2004. **CRC Press**. 615 p.

ZOPPAS BCDA. **Caracterización del contenido fúngico atmosférico de Caxias di Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.** 461f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de León, Espanha, 2005.

Anexos

Anexo A

Modelo de termo de consentimento da participação dos laboratórios

Laboratório de Doenças Infecciosas - Setor Micologia



Faculdade de Veterinária – UFPel
Departamento de Veterinária Preventiva
CEP 96010-900 / Pelotas-RS
Telefone: (53) 3275-7140



Vimos por meio deste, apresentar pesquisa que é parte integrante do projeto de mestrado da aluna do programa de Pós Graduação em Veterinária-PPGV-UFPel- Otávia de Almeida Martins, estando esta sob orientação do Profº Dr. Mário Carlos Araújo Meireles e co- orientação da Profª Dra. Renata Osório de Faria. Tal projeto está sendo, desenvolvido no Departamento de Veterinária Preventiva, setor de Doenças Infecciosas- Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet).

O projeto tem por objetivo isolar e identificar a microbiota fungica presente em diferentes laboratórios da Universidade Federal de Pelotas durante o período de um ano, abrangendo as quatro estações climáticas diferentes. A presença desses fungos em tais ambientes pode causar grandes problemas econômicos, de qualidade diagnóstica e relacionados a pesquisa, podendo também causar prejuízo à saúde das pessoas que trabalham no local. Justifica-se o estudo uma vez que inexistem pesquisas semelhantes na Instituição que será avaliada. Ainda, os resultados da presente pesquisa serão utilizados de forma a propor medidas para um adequado controle ambiental, fazendo uso das normas de biossegurança, assegurando boas condições higiênico-sanitárias no intuito de melhorar as práticas laboratoriais da Instituição pesquisada.

O presente projeto intitulado: Isolamento e identificação de fungos anemófilos em diferentes laboratórios da Universidade Federal de Pelotas aguarda aprovação pelo COCEPE

A metodologia será baseada na técnica de sedimentação em placa de Petri (MINAMI, 2003) e posterior avaliação das unidades formadoras de colônia (UFC). Todas as informações colhidas e os resultados das coletas serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade dos dados e dos locais de coleta, em nenhum momento dados que identifiquem os locais de estudo e comprometam de alguma forma os locais estudados, serão divulgados. Após o término da pesquisa os resultados estarão a disposição para pesquisa e avaliação, tanto do Centro de diagnóstico e pesquisa em micologia veterinária como para os laboratórios que cederam o espaço e amostra para integrar esta pesquisa.

As coletas estão previstas para os meses de fevereiro, março, maio, agosto e novembro. Nas possíveis datas (05, 06, 12, 13, 26 e 27 de fevereiro; 05 e 06 de março; 07, 08, 14, 15, 21, 22, 28 e 29 de maio; 06, 07, 13, 14, 20, 21, 27 e 28 de agosto; 05, 06, 12, 13, 19, 20, 26 e 27 de novembro).

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG nº _____
declaro ter sido informado e concordo em participar do projeto de pesquisa acima descrito.