

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA E CONSERVAÇÃO NOS TRÓPICOS

DANIELLE MACHADO PAGANI

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À ZOANTIDEOS
MARINHOS (CNIDARIA) EM AMBIENTE TROPICAL**

Maceió, AL
Fevereiro, 2016.

DANIELLE MACHADO PAGANI

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À ZOANTIDEOS
MARINHOS (CNIDARIA) EM AMBIENTE TROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Melissa Fontes Landell
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Monica Dorigo Correia

Maceió, AL

Fevereiro, 2016

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

P129d Pagani, Danielle Machado.
Diversidade de leveduras associadas à Zoantideos marinhos
(Cnidaria)
Em ambiente tropical / Danielle Machado Pagani. – 2016.
110 f. : il.

Orientadora: Melissa Fontes Landell.
Coorientadora: Monica Dorigo Correia.
Dissertação (mestrado em Diversidade Biológica e
Conservação nos Trópicos) – Universidade Federal de Alagoas.
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos
Trópicos. Maceió, 2016.

Inclui Bibliografia.
Anexos: f. 81-110.

1. Leveduras. 2. Cnidários. 3. Zona costeira. 4. Trópicos. I.
Título.

CDU: 593.5

Folha de aprovação

Danielle Machado Pagani

**DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ASSOCIADAS À ZOANTIDEOS
MARINHOS (CNIDARIA) EM AMBIENTE TROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, área de concentração em Conservação da Biodiversidade Tropical.

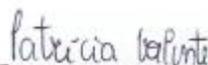
Dissertação aprovada em 26 de fevereiro de 2016.



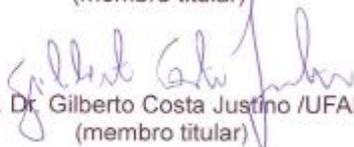
Profa. Dra. Melissa Fontes Landell/UFAL
Orientadora



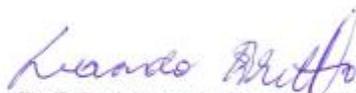
Profa. Dra. Mônica Dorigo Correia
Co-orientadora



Profa. Dra. Patricia Valente da Silva/UFRGS
(membro titular)



Prof. Dr. Gilberto Costa Justino /UFAL
(membro titular)



Prof. Dr. Leonardo Broetto/UFAL
(membro titular)

MACEIÓ - AL

Fevereiro / 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora e amiga Melissa F. Landell por todo suporte técnico, científico e empenho na minha formação. Por ter acreditado em mim. Assim como a amizade que foi muito importante durante este período de mudanças e adaptações. Assim como a minha co-orientadora Monica D. Correia que me orientou e proporcionou coletas divertidíssimas! Agradeço ao Leonardo Broetto por todos os ensinamentos e amizade!

Aos meus pais Jorge Pagani e Marione M. Pagani que nesses dois anos maravilhosos de estudo e pesquisa estiveram sempre presentes e me amparando de todas as formas, assim como meu irmão Maikon M. Pagani. Se não fosse pelo amor e respeito que recebo de vocês em cada decisão, talvez meu caminho fosse mais árduo sem vocês. Aos meus avós, Cinira Z. Machado, Mário S. Machado e Josefa B. Pagani pelo amor e carinho que recebi em cada ligação telefônica. Aos meus filhos caninos: Troll, Lia, Udisson, Ozzy, Dexter e Brenice. E aos felinos: Piuí, Glória e Palito. E principalmente ao Palito, meu filho alagoano que me acompanhou nestes dois anos de estudos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório que muito me ajudaram na bancada e na vida pessoal! Que sempre tornaram mais leves aqueles dias de aperto no peito, saudade de casa...Ciro, Anne, João, Gustavo, Willian, Adel e Anyelet foram e são os melhores amigos que se pode desejar, vou sentir muita saudade!

E agradeço ao CNPq, Capes e FAPEAL pelo suporte financeiro e a bolsa fornecida!

ABSTRACT

Microorganisms are the more successful life form in the oceans, but little is known about the Fungi kingdom. In this environment, marine invertebrates are considered important microorganisms reservoirs and half the wealth of yeast that have been isolated from these invertebrates are associated with their tissues. Knowledge about that diversity is important to investigate ecological relationships and the potential that yeasts may have in biotechnology. The objective of this study was to isolate and identify cultivable yeasts associated with cnidarians belonging to Zoanthidae family. Samples of three species of soft corals, *Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* and *Zoanthus sociatus*, were collected in the Ponta Verde coral reef and sandstone reef Sereia in 2014 and 2015. The samples were washed with steril sea water, macerated, diluted, plated on Wickerham's YM culture medium and incubated for up to 26 days at 22-25 °C. The yeasts were stored in inclined agar GYMP covered with mineral oil maintained at a temperature of -4 °C and in microtubes containing modified YM medium at a temperature of -20 °C. The isolates had genomic DNA extracted and the region D1 / D2 LSU rDNA sequenced. A hundred thirty-nine isolates were obtained, with a prevalence of 67,62% of yeast belonging to the phylum Ascomycota within this phylum, the order Saccharomycetales was the most represented among the isolated. Basidiomycetes had the prevalence of a single order for the sandstone reef Sereia, already in Ponta Verde main orders were Microbotryomycetes and Tremellomycetes. A total of 18 of the 38 yeast species were classified as a new occurrence for the marine environment. The prevalence of the ascomycetous subphylum Saccharomycotina can be explained by being more tolerant species to environmental stress caused by the large input of organic matter derived from the urban environment that the reef gets. And can be influencing the presence of yeast with human pathogenic potential, where 84% identified isolated have this potential. Through data analysis, it is concluded that there are more species of yeast in association with marine cnidarians to be reported, including new species. As the cultivation technique is not capable of scanning all yeast species associated with soft corals during the sampling period, the sampling should be continued. Thus, the sampling should be continued in order to know the real wealth of species of cultivated yeasts in this habitat.

Keywords: Yeast. Cnidaria. Coastal zone. Tropic.

RESUMO

Os micro-organismos são a forma de vida mais bem sucedidas dos oceanos, mas pouco é conhecido sobre o reino Fungi. Nesse ambiente, os invertebrados marinhos são considerados como importantes reservatórios de micro-organismos e metade da riqueza de leveduras que já foram isoladas desses invertebrados estão associadas ao seus tecidos. Conhecer essa diversidade é importante a fim de investigar relações ecológicas e o potencial que essas leveduras possam vir a ter na área de biotecnologia. O objetivo do trabalho foi isolar e identificar leveduras cultiváveis associadas a cnidários pertencentes a família Zoanthidae. Amostras de três espécies de corais moles: *Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* e *Zoanthus sociathus*, foram coletadas no recife de coral da Ponta Verde e no recife de arenito da Sereia entre os anos de 2014 e 2015. As amostras foram lavadas com água do mar estéril, maceradas, diluídas, semeadas em meio de cultura Wickerham's YM e incubadas por até 26 dias a 22-25°C. As leveduras foram estocadas em meio Ágar GYMP inclinado coberto com óleo mineral mantidas a uma temperatura de -4 °C e também em meio YM modificado a uma temperatura de -20 °C. Os isolados tiveram o DNA genômico extraído e a região D1/D2 LSU rDNA sequenciada. Foram obtidos 139 isolados, com prevalência de 67,62% de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota, dentro desse filo a ordem Saccharomycetales foi a mais representada entre os isolados dos dois pontos. Quanto aos basidiomicetos não houve a prevalência de uma única ordem para o recife de arenito da Sereia, já na Ponta Verde as principais ordens foram Microbotryomycetes e Tremellomycetes. Um total de 18 das 38 espécies de leveduras encontradas foram classificadas como nova ocorrência para o ambiente marinho. A prevalência de ascomicetos do subfilo Saccharomycotina pode ser explicada por serem espécies mais tolerantes ao estresse ambiental causado pelo grande aporte de matéria orgânica oriundo do ambiente urbano que o recife recebe. O que pode influenciar na presença de leveduras com potencial patogênico humano, onde 84% dos isolados identificados apresentam esse potencial. Através da análise dos dados, concluiu-se que existem mais espécies de leveduras em associação aos cnidários marinhos a serem relatadas. A técnica de cultivo não foi capaz de inventariar todas as espécies de leveduras associadas aos corais moles durante o período de amostragem. Sendo assim, a amostragem deve ser continuada a fim de conhecer a real riqueza de espécies de leveduras cultiváveis nesse habitat.

Palavras-chave: Leveduras. Cnidários. Zona costeira. Trópicos.

“E que a minha loucura seja perdoada porque metade de mim é amor e a outra metade também”

Metade – Oswaldo Montenegro

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1-** ESQUEMATIZAÇÃO DOS GENES 18S, 5.8S E 26S DO rDNA.....24
- FIGURA 2-** ABUNDÂNCIA DE GÊNEROS DE LEVEDURAS NO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE.....40
- FIGURA 3-** CURVA DE RAREFAÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS ASSOCIADAS AOS ZOANTÍDEOS AMOSTRADOS NO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE.....41
- FIGURA 4-** RIQUEZA DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS E DE PREVALÊNCIA DE DOIS FILOS ASSOCIADOS ENTRE AS ESPÉCIES DE CNIDÁRIOS DA FAMÍLIA ZOANTHIDAE AMOSTRADOS NO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE.....42
- FIGURA 5-** ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA (LSU) DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO FILO ASCOMYCOTA OBTIDOS NO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE. OS VALORES DE BOOTSTRAP (1000 RÉPLICAS) EXIBIDOS NAS ÁRVORES SÃO AQUELES MAIORES QUE 50%. BARRA INDICA 0.05 SUBSTITUIÇÕES POR POSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEO.....43
- FIGURA 6-** ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA (LSU) DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO FILO BASIDIOMYCOTA OBTIDOS NO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE. OS VALORES DE BOOTSTRAP (1000 RÉPLICAS) EXIBIDOS NAS ÁRVORES SÃO AQUELES MAIORES QUE 50%. BARRA INDICA 0.05 SUBSTITUIÇÕES POR POSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEO.....44
- FIGURA 7-** ABUNDÂNCIA DE GÊNEROS DE LEVEDURAS NO RECIFE DE ARENITO DA SEREIA.....48
- FIGURA 8-** CURVA DE RAREFAÇÃO DAS ESPÉCIES DE LEVEDURA ASSOCIADAS AOS ZOANTÍDEOS AMOSTRADOS NO RECIFE DE ARENITO DA SEREIA.....48
- FIGURA 9-** RIQUEZA DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS E DE PREVALÊNCIA DE FILO ASSOCIADOS ENTRE AS ESPÉCIES DE CNIDÁRIOS DA FAMÍLIA ZOANTHIDAE NO RECIFE DE ARENITO DA SEREIA.....49
- FIGURA 10-** ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DA ANÁLISE DE NEIGHBOR-JOINING DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA (LSU) DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO FILO ASCOMYCOTA OBTIDOS NO RECIFE DE ARENITO DA SEREIA. OS VALORES DE BOOTSTRAP (1000 RÉPLICAS) EXIBIDOS NAS

ÁRVORES SÃO AQUELES MAIORES QUE 50%. BARRA INDICA 0.05
SUBSTITUIÇÕES POR POSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEO.....51

FIGURA 11- ÁRVORE FILOGENÉTICA CONSTRUÍDA A PARTIR DA ANÁLISE DE
NEIGHBOR-JOINING DA REGIÃO D1/D2 DO rDNA (LSU) DOS ISOLADOS DE
LEVEDURAS DO FILO ASCOMYCOTA OBTIDOS NO RECIFE DE CORAL DA PONTA
VERDE. OS VALORES DE BOOTSTRAP (1000 RÉPLICAS) EXIBIDOS NAS ÁRVORES
SÃO AQUELES MAIORES QUE 50%. BARRA INDICA 0.05 SUBSTITUIÇÕES POR
POSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEO.....53

FIGURA 12- ANÁLISE ESTATÍSTICA DA RIQUEZA DE LEVEDURAS ENCONTRADAS
EM AMBOS RECIFES DURANTE O MESMO PERÍODO DE COLETA.....55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ISOLADOS DE LEVEDURAS PERTENCENTES AO FILO ASCOMYCOTA DO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE.....	38
TABELA 2- ISOLADOS DE LEVEDURAS PERTENCENTES AO FILO BASIDIOMYCOTA DO RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE.....	39
TABELA 3- ISOLADOS DE LEVEDURAS PERTENCENTES AO FILO ASCOMYCOTA DO RECIFE DE ARENITO DA SEREIA.....	45
TABELA 4- ISOLADOS DE LEVEDURAS PERTENCENTES AO FILO BASIDIOMYCOTA DO RECIFE DE ARENITO DA SEREIA.....	47
TABELA 5- ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LINHAGENS PERTENCENTES AS ESPÉCIES <i>Candida haemulonii</i> E <i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	57
TABELA 6- SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS DE <i>Candida haemulonii</i> E <i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	59
TABELA 7- REGISTROS DE OCORRÊNCIA DAS ESPÉCIES DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A CNIDÁRIOS DA FAMÍLIA Zoanthidae EM ECOSSISTEMAS RECIFAIS DE MACEIÓ (AL) PARA O AMBIENTE MARINHO.....	79
TABELA 8- DADOS DE BALNEABILIDADE ANTES (-) E DURANTE OS MESES DE COLETA.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: American Type Culture Collection

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holanda

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CFM: Concentração Fungicida Mínima

cm: Centímetro

DBB: Diazonium Blue B

DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)

ITS: *Internal Transcribed Spacer* (Espaçador Interno Transcrito)

M: Molar

mL: Mililitro

NCBI: National Center for Biotechnology Information

µL: Microlitro

NRRL: Coleção de cultura ARS, National Center for Agricultural Utilization Research,
USA

pH: Potencial hidrogeniônico

RNA: Ácido ribonucleico

x g: Força g

SUMÁRIO

1 Apresentação	15
2 Introdução	17
3 Revisão da literatura	18
3.1 Ambientes recifais	18
3.2 Família zoanthidae	19
3.3 Leveduras marinhas	21
3.4 Isolamento e taxonomia de leveduras	22
3.4.1 Filo Ascomycota	24
3.4.2 Filo Basidiomycota	26
4 Material e Métodos	28
4.1 Coleta das amostras	28
4.2 Isolamento de leveduras	29
4.3 Identificação molecular	30
4.4 Análise filogenética	32
4.5 Análise estatística	32
4.6 Testes de atividade enzimática e crescimento	32
4.6.1 Amilase.....	33
4.6.2 Celulase	33
4.6.3 Esterase	33
4.6.4 Lipase.....	3e
4.6.5 Pectinase.....	34
4.6.6 Proteases	34
4.6.7 Fosfolipase	35
4.6.8 DNase	35
4.6.9 Tolerância a salinidade.....	35
4.6.10 Crescimento a 37° C e 39° C.....	36
4.7 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	36
5 Resultados	37
5.1 Diversidade e riqueza de espécies: recife de coral da Ponta Verde	37
5.1.1 Análise filogenética dos isolados de leveduras obtidos no recife de coral da Ponta Verde	42
5.2 Diversidade e riqueza de espécies: recife de arenito da Sereia	45
5.2.1 Análise filogenética dos isolados de leveduras obtidos no recife de arenito da Sereia.....	50
5.3 Diversidade e riqueza: recife de coral da Ponta Verde e recife de arenito da Sereia.....	54
5.3.1 Riqueza de espécies de leveduras entre espécies de zoantídeos	55
5.4 Produção enzimática e crescimento.....	56
5.5 Susceptibilidade aos antifúngicos	58
6 Discussão	60
7 Conclusões	64
Referências	65
Anexos	78

Parte 2: Artigo científico	90
Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of <i>Candida haemulonii</i> and <i>Cutaneotrichosporon dermatis</i> isolated from soft corals on the Brazilian reefs	

1 APRESENTAÇÃO

Os invertebrados marinhos são conhecidos por sua importância como reservatório de micro-organismos. Segundo Kutty e Philip (2008), metade das espécies de leveduras isoladas de invertebrados marinhos encontram-se associadas internamente aos organismos. Através de revisão de literatura percebe-se que poucos pesquisadores dedicam-se ao estudo da biodiversidade de leveduras em zonas tropicais. E por isso, faz-se necessário ressaltar a importância de evidências crescentes que simbioses microbianas são uma verdadeira fonte de muitos compostos derivados de organismos marinhos, o que os torna um *hotspot* no campo da microbiologia marinha e de produtos naturais marinhos (Li, 2009).

A costa brasileira que em sua maior parte está situada na região tropical, desponta um grande interesse em ampliar os conhecimentos sobre leveduras em ambiente marinho, uma vez que poucas são as espécies referidas para o nosso país. O número de espécies de leveduras já descritas em todo o mundo pode representar apenas cerca de 1% de espécies na natureza (Sunnerhagen *et al.*, 2006). Com relação ao ambiente marinho, as leveduras associadas podem apresentar aplicações biotecnológicas e também pode ser possível encontrar espécies novas. Algumas espécies já têm sido descritas neste ambiente como *Cryptococcus adeliensis* (Scorzetti *et al.*, 2000), *Lachancea meyersii* (Fell, Statzell-Tallman e Kurtzman, 2004), *Candida rhizophorensis* e *Candida sharkensis* (Fell *et al.*, 2011), *Glacyozima litorale* (Kachalkin, 2014), *Starmerella syriaca* (Sipiczki, 2015) entre outras leveduras novas e reclassificadas.

O ambiente marinho vem sendo alterado pela poluição, decorrente dos impactos causados pelo desenvolvimento imobiliário, resultando em alteração na diversidade tanto de macro-organismos quanto de micro-organismos. Além disso, mudanças climáticas antropogênicas representam um perigo real aos ecossistemas marinhos. Estima-se que 20% dos recifes de coral do mundo foram perdidos, 24% estão sob risco iminente de colapso e outros 26% em grave perigo (Riegl *et al.*, 2009). Mudanças químicas no ciclo

de carbonatos dos oceanos já foram constatadas e com a previsão de continuidade do aumento de CO₂, o pH da superfície deve diminuir (Ellis *et al.*, 2014). Essa mudança de pH atinge os macro-organismos negativamente quanto ao seu desenvolvimento e reprodução (Correia e Sovierzoski, 2009). Entretanto, sabe-se que geralmente os micro-organismos tendem a se favorecer em ambientes com pH baixo (Krause *et al.*, 2013). Todas essas alterações nas quais o ambiente marinho e costeiro vêm sofrendo tornam evidente a necessidade de estudos para pesquisar e monitorar a biodiversidade.

Embora estudos de leveduras marinhas já sejam desenvolvidos (Elbandy *et al.*, 2008; Burgaud *et al.*, 2010), pesquisas que envolvam a diversidade de leveduras associadas a organismos marinhos ainda são uma novidade. Nenhum dos trabalhos citados anteriormente foi realizado no Brasil, enfatizando a importância do presente trabalho.

2 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas costeiros incluem alguns dos ambientes mais produtivos e valorizados do mundo. Entretanto, com o aumento da pressão antropogênica, também estão entre os ecossistemas mais degradados. Junto com a crescente população humana costeira vêm as inúmeras atividades humanas, tanto em terra quanto no mar que podem impactar negativamente ou ameaçar os ambientes marinhos costeiros (Crain *et al.*, 2009).

A descarga de águas residuais não tratadas, por exemplo, vem sendo uma atividade antropogênica comum em zona tropical costeira. A abundante quantidade de matéria orgânica aumenta o número de micro-organismos patogênicos e pode diminuir a diversidade de micro-organismos saprófitas e benéficos que tem papel central no funcionamento dos ecossistemas, atuando principalmente na ciclagem de nutrientes em lagos, rios e oceanos (Jones e Pang, 2012). Esses micro-organismos são também um importante recurso alimentar para organismos filtradores, zooplâncton e diversos outros invertebrados. Além disso, mudanças químicas na água ocorrem e podem acarretar estresse fisiológico nos corais que reflete no microbioma residente do hospedeiro. O fato foi comprovado nas comunidades microbianas presentes em colônias de corais branqueadas quando comparadas com outro coral saudável. Entretanto, pouco se conhece ainda sobre a associação entre comunidades microbianas e corais (Ainsworth, Thurber e Gates, 2010).

Tendo em vista a importância do ecossistema recifal e baixo número de pesquisas realizadas nesse ambiente com fungos e principalmente de leveduras associadas a invertebrados marinhos, o objetivo do presente trabalho foi isolar, identificar e analisar a diversidade de espécies de leveduras que ocorrem em associação com três espécies de cnidários pertencentes a família Zoanthidae (*Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* e *Zoanthus sociatus*) em um ambiente marinho tropical.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 AMBIENTES RECIFAIS

Os recifes de corais, formados principalmente por cnidários da ordem Scleractinia, representam uma das maiores estruturas produzidas por um organismo vivo. Esses ecossistemas possuem grande diversidade comparada as florestas tropicais, propiciando diversos nichos para o estabelecimento de diversas espécies (Rosenberg *et al.*, 2007). O valor econômico estimado para os recifes de corais é de cerca de US\$ 29,8 bilhões por ano, tudo isso contabilizando turismo, pesca e proteção que os recifes fornecem as zonas costeiras (Conservation International, 2008). Trabalhos recentes que catalogaram o estado funcional dos recifes de coral estimaram uma perda de cerca 25% e um terço de todas as espécies de corais foram consideradas ameaçadas de extinção. A revisão das principais ameaças identificadas para os ecossistemas recifais (Reefs at Risk Revisited/RRR) inclui a pesca, a poluição, a urbanização costeira e as alterações climáticas (Wear e Thurber, 2015). Em particular, resíduos urbanos despejados nos mares tropicais apresentaram centenas de compostos diferentes. Mais comumente estão a água doce, nutrientes inorgânico, desreguladores endócrinos, sólidos suspensos, sedimentos, metais pesados e diversas outras substâncias. Junto a elas estão os micro-organismos patogênicos (Wear e Thurber, 2015).

O Estado de Alagoas possui um litoral com 230 km, tendo as principais áreas recifais localizadas no centro e no norte do estado, incluindo os recifes de corais e os recifes de arenito. Os recifes de corais são predominantemente constituídos por corais hermatípicos, associados a algas calcáreas e briozoários, além das outras estruturas de outros invertebrados como conchas e carapaças. Juntamente com os recifes do sul do Estado de Pernambuco, os corais ao norte de Alagoas pertencem à Área de Proteção Ambiental conhecida como "APA Costa dos Corais" (Correia e Sovierzoski, 2009; Correia, 2011).

Os recifes de arenito, comuns em regiões tropicais e subtropicais, normalmente estão em linhas paralelas à costa e próximos a desembocaduras de rios e estuários, ligado a evolução costeira no holoceno. A formação desses recifes foi através da formação de antigos bancos de areia que se solidificaram a partir de reações químicas com carbonato de cálcio ou óxido de ferro a partir do período quaternário (Correia e Sovierzski, 2009; Correia, 2011; Danjo e Kawasaki, 2014). Definidos pela composição granulométrica, correspondem a antigas praias consolidadas. A composição deste substrato variam entre seixos, restos de conchas e fragmentos de seres vivos como os corais, por exemplo (Baptista, 2010). Estes ambientes rochosos estão entre os mais produtivos, abrigam uma grande diversidade de espécies com importância ecológica e econômica (Coutinho, 2002).

3.2 FAMÍLIA ZOANTHIDAE

A sistemática de zoantídeos vem sendo considerada confusa, pois a morfologia de colônia e pólipos pode variar dentro de uma mesma espécie. Entretanto, com estudos sobre a biologia molecular tem-se descoberto que muitas espécies nomeadas diferentemente com base na taxonomia tradicional, passaram a ser sinônimas. Os membros da ordem Zoanthidae incluem organismos coloniais e muito comuns nas zonas tropicais costeiras (Burnett *et al.*, 1997; Boscolo e Silveira, 2005; Reimer *et al.* 2012).

Zoanthídeos formam grupos dominantes de macroinvertebrados coloniais sésseis em recifes. Além disso, podem predominar em locais onde as condições de estresse levam a uma diminuição dos corais escleractínios (Silva *et al.*, 2015). A família Zoanthidae, alvo do presente estudo, pertence ao filo Cnidaria, classe Anthozoa, ordem Zoanthidea. Estão distribuídos entre a região entremarés e infralitoral em latitudes maiores que 30° Norte e Sul. Apesar da importância ecológica dos representantes da fauna de Anthozoa juntos aos ecossistemas recifais ainda pouco se conhece no nordeste do Brasil (Barradas *et al.* 2010; Neves *et al.* 2010).

As espécies *Palythoa variabilis*, *Palythoa caribaeorum* e *Zoanthus sociatus* são conhecidas como corais moles, ocorrem comumente na costa oeste do Atlântico sul. Segundo o estudo realizado por (Rabelo, Soares e Matthews-Cascon, 2013), no nordeste do Brasil, *Z. sociatus* e *P. caribaeorum* foram consideradas espécies competidoras por espaço, além de apresentarem taxas de crescimento médios bastante similares (11 cm² e 10,6 cm² por mês, respectivamente). Entretanto, *P. variabilis* cresce mais lentamente, em média 5,74 cm² por mês.

Z. sociatus Ellis, 1767 possui coloração verde claro a azulada, com pólipos normalmente expandidos quando emergem na maré baixa, sendo mais comum em zona entremares e apresentando alta resistência a distúrbios no ambiente (Reimer, Foord e Irei, 2012).

P. caribaeorum (Duchassaing e Michelotti, 1860) possui os pólipos aderidos a um tecido (coenenquima) que cresce cobrindo o substrato, sendo um forte competidor por espaço, no entanto, apresenta pouca resistência à dessecação. Possui coloração creme e ocorre comumente no limite superior do infralitoral (Soares *et al.* 2011). Muito abundante na maioria dos recifes costeiros no nordeste brasileiro (De Santana *et al.*, 2015). *P. caribaeorum* foi considerado o principal alimento de quatro espécies de peixes recifais os quais servem de presa para grandes peixes de interesse comercial no Brasil (Francini-Filho e Moura, 2010). Essa parece ser uma espécie-chave no funcionamento dos recifes no nordeste do Brasil, na qualidade de uma junção de transferência de energia e que têm funções semelhantes às de diferentes corais escleractínios em outros recifes ao redor do mundo (De Santana *et al.*, 2015).

Já *P. variabilis* para alguns pesquisadores pode ser conhecido também como *Protopalythoa variabilis*, pois a classificação taxonômica dessa espécie permanece incerta. O gênero *Protopalythoa* caracteriza-se pelo crescimento de pólipos solitários, embora no caso de *P. variabilis*, possa ser encontrado em pequenos grupos. Entretanto, o gênero *Palythoa* possui pólipos conectados por uma matriz de tecido, o coenenquima (Soares *et al.* 2011). Possui coloração verde a marrom estando distribuído desde o Caribe até a costa do Atlântico Sul (Reimer *et al.* 2012).

3.3 LEVEDURAS MARINHAS

Embora seja uma das formas de vida mais bem sucedidas nos oceanos, a diversidade de fungos marinhos é pouco estudada quando comparada a outros habitats. As leveduras podem ser encontradas ocupando diferentes nichos no ambiente marinho costeiro em associação com diferentes substratos (Wang *et al.* 2008). As leveduras são micro-organismos eucariontes, unicelulares, produzem esporos e não formam corpos de frutificação. São classificadas em dois filos: Ascomycota e Basidiomycota (Hittinger *et al.*, 2015). Existem fungos leveduriformes ou *yeast-like* que são fungos filamentosos que se comportam morfológicamente como leveduras em meio abundante em açúcares. A reprodução das leveduras pode se dar principalmente por brotamento ou fissão binária. No grupo das leveduras marinhas, são conhecidos cerca de 35 gêneros e 138 espécies pertencentes ao filo Ascomycota, já o filo Basidiomycota contém 26 gêneros e 75 espécies (Jones *et al.*, 2015).

Os principais representantes de leveduras marinhas e costeiras pertencem ao filo Ascomycota e *Candida* é um dos gêneros mais comuns em zonas costeiras. Além dele, gêneros pertencentes ao filo Basidiomycota também podem ser encontrados como *Rhodotorula* e *Cryptococcus* (Kachalkin, 2014). As leveduras marinhas são divididas em facultativas ou obrigatórias quanto ao seu desenvolvimento no habitat em questão (Kutty e Philip, 2008). Leveduras marinhas são aquelas que sobrevivem melhor em água do mar do que em água doce, assim como quando isoladas, crescem melhor em meio de cultura contendo água do mar (Chi *et al.*, 2009).

Ocorrem comumente nas zonas costeiras, pois existem áreas com elevadas concentrações de matéria orgânica, essa disponibilidade de material orgânico em geral pode afetar a composição das populações de leveduras. Assim como as condições ambientais, tais como a temperatura, luz, pressão e pH também afetam o coral e os micro-organismos associados. A temperatura desempenha o papel principal na distribuição geográfica dos fungos marinhos entre as espécies tipicamente tropicais, como também a salinidade que é outro fator impactante na composição das espécies (Péter, Rosa e Deak, 2006; Fell e Van Uden, 1963).

Jones *et al.* (2015) levantam a questão sobre fungos marinhos facultativos e obrigatórios, quando detectaram que diversos fungos conhecidamente terrestres são amplamente distribuídos e concentrados no ambiente marinho, e devem ser considerados como tal. Deve-se ter cuidado ao afirmar que uma levedura seja verdadeiramente marinha, pois podem ter se originado de diversas fontes terrestres. Alguns autores afirmam que leveduras marinhas são aquelas capazes de crescer em ou sobre um substrato marinho. Sendo a concentração salina no meio não pode ser usada para distinguir espécies marinhas e terrestres. Grande parte das leveduras marinhas podem crescer em meios hipersalinos. Existem alguns indicativos fenotípicos, os quais consideram normalmente as leveduras como asporogênicas, oxidativas ou com baixa capacidade de fermentação (Kutty e Philip, 2008).

Em uma relação de simbiose, os micro-organismos podem beneficiar seus hospedeiros prevenindo-os de doenças (por exemplo, através da produção de toxinas *killer* pelas leveduras) e provendo nutrientes. Em condições de estresse, os micro-organismos podem causar doenças e o branqueamento em corais (Rosenberg *et al.*, 2007; Krediet *et al.*, 2013). Grande parte dos trabalhos e revisões de literatura não abordam a relação entre leveduras e corais, mas foi possível encontrar trabalhos sobre a relação entre leveduras associadas as plantas e invertebrados de manguezal (De Araujo *et al.*, 1995; Brysch-Herzberg, 2004; Mestre *et al.*, 2011). As leveduras marinhas em simbiose com animais marinhos podem ser imuno-estimulante ao animal que a hospeda, fazendo com que eles produzam anticorpos específicos contra patógenos. As células das leveduras marinhas são ricas em aminoácidos essenciais e proteínas, contribuindo também com a nutrição desses animais (Chi *et al.*, 2009)

3.4 ISOLAMENTO E TAXONOMIA DE LEVEDURAS

A classificação taxonômica de leveduras iniciou-se baseada na presença ou ausência de estado sexual, tipo de divisão celular, presença de hifas ou pseudo-hifas e caracteres bioquímicos (Barnett, 2004). Porém, essa forma de classificação acarreta dúvidas, pois uma ou mais espécies podem apresentar a mesma morfologia e mesma

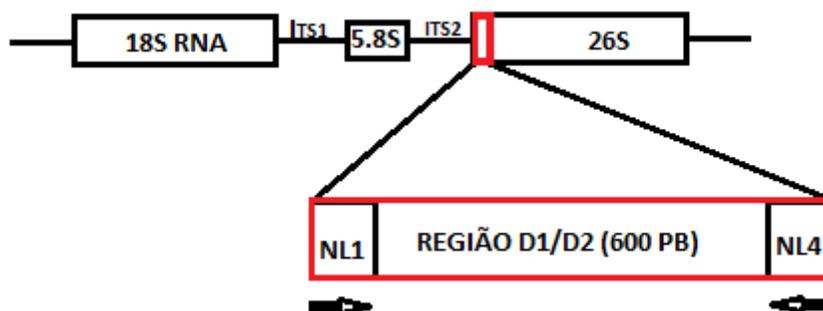
expressão fisiológica quando submetida a testes bioquímicos. Dessa forma, a atenção voltou-se para a biologia molecular, quando passou a ser levada em conta na identificação molecular o conteúdo GC. Definiu-se que Ascomycota possuem um conteúdo GC entre 28-50 mol% e Basidiomycota um conteúdo GC entre 50-78 mol%. Utilizando-se a técnica de hibridização de DNA-DNA, uma obtenção de 70% de re-associação era suficiente para considerar os dois indivíduos hibridizados membros de uma mesma espécie, o que deixa uma margem muito grande na diferenciação entre espécies. A fim de agilizar o processo os esforços voltaram-se para o sequenciamento do DNA, por ser um processo rápido e com resolução mais alta (Suh *et al.*, 2006). Uma diferença de 1% da região D1/D2 da LSU do rDNA quando compara-se duas ou mais sequências, já seria o suficiente para a distinção entre espécies (Kurtzman *et al.*, 2011; Kurtzman, 2014).

Existem diversas formas de medir a diversidade microbiana em ambientes naturais como diversidade de nucleotídeos, diversidade de genes, diversidade de genótipos, diversidade de espécies, diversidade filogenética, entre outras. A unidade fundamental de classificação biológica é a espécie, sendo essa essencial para a descrição, compreensão e comparação de diversidade biológica em diferentes níveis (Xu, 2006).

O isolamento de leveduras e fungos cultiváveis utilizando meios de cultura a fim de fazer uma identificação pioneira de diferentes substratos e testar o potencial biotecnológico tornou-se uma prática atual e amplamente aceita no meio científico (Kachalkin e Yurkov, 2012; Duarte *et al.*, 2013; Vaca *et al.*, 2013; Limtong *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2015).

A identificação de leveduras tem sido realizada através do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA (LSU) (Figura 1). Essa região do genoma das leveduras é altamente conservada, mas apresenta diferenças suficientes para diferenciar indivíduos ao nível de espécie (Fell *et al.*, 2000).

Figura 1- Esquematisação dos genes 18S, 5.8S e 26S do rDNA.



A importância de um sistema de identificação a partir de um único gene é que o banco de dados sofre uma expansão contínua e fornece a informações de todas as espécies já descritas. A segunda região amplamente utilizada é o espaçador intergênico (ITS), localizado entre os genes de rRNA SSU e LSU. A sequência ITS é dividida em duas seções (ITS1, ITS2) pelo gene 5.8S. A região ITS é eficaz para estimar distância filogenética entre os principais grupos de fungos, é uma região que varia entre espécies e pode ser utilizada a fim de apurar a identificação de leveduras, uma vez que a região D1/D2 pode ser idêntica ou muito semelhante em espécies diferentes (Fell *et al.*, 2000; Lindahl *et al.*, 2013; Kurtzman *et al.*, 2015).

3.4.1 Filo Ascomycota

Os ascomicetos compõem um grupo monofilético, incluindo os fungos dimórficos conhecidos como *yeast-like* pertencentes ao filo Ascomycota. É considerado o maior filo do reino Fungi, mais diverso e cosmopolita filo de eucariotos, podendo ser encontrado em ambientes extremos. Atuam na decomposição de diversos substratos e, podem ser encontrados em mutualismo, parasitismo e também agir como patógenos em outros organismos. A sinapormofia que diferencia os ascomicetos dos demais fillos baseia-se na formação de ascósporo, onde esporos são produzidos através de meiose. O filo Ascomycota é composto pelos subfilos Taphrinomycotina, Saccharomycotina e Pezizomycotina (Schoch *et al.*, 2009).

As leveduras marinhas dentro desse filo correspondem a 138 espécies e 35 gêneros. É o filo mais abundante em ambientes marinhos e costeiros (Jones *et al.*, 2015).

3.4.1.1 Subfilo Saccharomycotina

O subfilo Saccharomycotina é composto por uma única ordem Saccharomycetales, representa os micro-organismos utilizados em atividades humanas, como fermentação de bebidas. Possui gêneros como *Kluyveromyces*, *Kodamea*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Yarrowia*, *Candida* e *Cyberlindnera*. Possuem crescimento unicelular e podem apresentar pseudohifa ou hifa verdadeira, reprodução assexuada por fissão binária, brotamento ou por conidia. Nesse subfilo são classificadas as chamadas leveduras verdadeiras (James *et al.*, 2006; Hibbett *et al.*, 2007). Membros do subfilo ocupam ambientes que possuem alta concentração de matéria orgânica (Blackwell *et al.*, 2009)

3.4.1.2 Subfilo Pezizomycotina

Pezizomycotina é o maior subfilo dentro de Ascomycota e inclui a maioria dos fungos filamentosos. Apresenta elevada diversidade ecológica, tendo espécies que exibem função em diversos processos ecológicos e relações de simbiose (Spatafora *et al.*, 2006). Também inclui as chamadas *black yeasts*, como *Hortaea werneckii* e espécies do gênero *Aureobasidium* (James *et al.*, 2006).

3.4.1.3 Subfilo Taphrinomycotina

Taphrinomycotina é considerado o mais antigo clado a divergir evolutivamente dentro do filo Ascomycota. Inclui grupos diversificados de espécies de leveduras, *yeast-like* e fungos filamentosos. O grupo inclui táxons que tem sido centrais para as teorias evolutivas da origem de Ascomycota e Basidiomycota (James *et al.*, 2006; Sugiyama, Hosaka e Suh, 2006)

3.4.2 Filo Basidiomycota

O filo Basidiomycota contém uma grande diversidade de fungos e leveduras, estando dividido em três subfilos: Ustilaginomycotina, Pucciniomycotina e Agaricomycotina. A relação entre os três subfilos ainda pode ser considerada incerta. A característica individualizante do filo baseia-se na formação de esporos sexuais, os basidiósporos (Ortiz-Castellanos e Ruiz-Herrera, 2015). Basidiomycota é o filo menos representativo no ambiente marinho, mas é capaz de colonizar uma ampla gama de substratos (Jones e Choeyklin, 2008). Existem 75 espécies e 26 gêneros de leveduras marinhas conhecidas pertencentes a esse filo (Jones *et al.*, 2015).

3.4.2.1 Subfilo Pucciniomycotina

O subfilo Pucciniomycotina engloba principalmente leveduras produtoras de compostos carotenóides, como por exemplo espécies do gênero *Rhodotorula*. Foi considerado o subfilo ancestral de Agaricomycotina e Ustilaginomycotina. Possui o menor número de leveduras verdadeiras. A maioria das espécies são caracterizadas como parasitas, tanto de plantas e insetos, como mycoparasitas. Entretanto, a forma de vida sapróbia também é encontrada em linhagens como Microbotryomycetes. Como exemplo, existem as espécies *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula mucilaginosa* e *Sterigmatomyces halophilus* (Aime *et al.*, 2006).

3.4.2.2 Subfilo Agaricomycotina

O subfilo Agaricomycotina é composto por espécies nutricionalmente distintas como: saprófitas, parasitas e espécies fungícolas. A grande maioria das espécies são dimórficas, mas existem algumas exceções anamórficas como *Cryptococcus*, *Bullera*, *Trichosporon* e *Fellomyces*. Algumas leveduras ocorrem como parasitas de animais e humanos, podendo causar infecções severas (Millanes *et al.*, 2011).

3.4.2.3 Subfilo Ustilaginomycotina

O subfilo Ustilaginomycotina apresenta-se composto principalmente por patógenos de plantas. Ainda existem espécies sapróbias dentro do subfilo (Boekhout *et al.*, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram realizadas sete coletas no recife de coral da Ponta Verde (9°39'59.15"S, 35°41'46.11"W) e outras sete coletas no recife de arenito da Sereia (9°33'54"S, 35°38'39"W), ambos recifes localizado no litoral de Maceió, Estado de Alagoas, nordeste do Brasil. As espécies de cnidários coletados pertencem à família Zoanthidae: *Palythoa carbaeorum*, *Palythoa variabilis* e *Zoanthus sociatus*. As coletas foram realizadas nos anos de 2014 e 2015 sendo que em cada coleta, foram amostrados de forma aleatória três indivíduos de cada espécie (10 cm²). Obteve-se um total de 63 amostras: 21 amostras para cada uma das espécies de zoantídeo em cada local de coleta. As coletas no recife de coral da Ponta Verde iniciaram em abril de 2014 e finalizaram em março de 2015, enquanto as coletas no recife de arenito da Sereia iniciaram em setembro de 2014 e encerraram em setembro de 2015. Ao todo, 4 coletas foram realizadas em um mesmo período (setembro/2014 a março/2015) no recife da Ponta Verde e no recife da Sereia.

Após a identificação das espécies de zoantídeos em campo, fragmentos dos organismos foram transferidos diretamente para sacos plásticos estéreis e transportados até o laboratório sob refrigeração. As amostras foram processadas no Laboratório de Diversidade Molecular da UFAL. Foram coletados dados físico-químicos da água como pH, temperatura e salinidade, através da utilização de aparelho multiparâmetro Hanna HI 9828.

4.2 ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS

A abordagem adotada neste trabalho foi descritiva, onde foi realizado um levantamento das espécies de leveduras cultiváveis em associação com as três espécies da família Zoanthidae (*P. variabilis*, *P. caribaeorum* e *Z. sociatus*). No laboratório, durante o processamento, os animais foram lavados com água marinha estéril para remoção de fragmentos visíveis exógenos ao coral (Newell, 1974).

Após a limpeza da superfície dos organismos, as amostras foram maceradas com a ajuda de pistilo e graal. Com o caldo resultante foi realizada a diluição seriada (até 10^{-3}) em tubos de ensaio contendo 9 mL de água do mar estéril. Um volume de 100 μ l foi semeado com auxílio de alça de drigalski através da técnica de espalhamento em superfície, utilizando Wickerhan's YM (extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, ágar 2%, glicose 1%, cloranfenicol 0,04%) como meio de cultura para o isolamento em duplicata, seguido de incubação a 22-25 °C por até 26 dias. Após esse período, as células das colônias suspeitas de serem leveduras foram analisadas por microscopia óptica nos aumentos de 40X e 100X para verificar a morfologia celular e selecionar apenas os isolados desejados. Colônias puras foram obtidas por passos de purificações sucessivas e preservadas em caldo YM (1% glicose, 0,5% peptona, 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de levedura) adicionado de glicerol 30%, sendo estocadas à temperatura de - 20 °C e em meio GYMP (2% glicose, 2% extrato de malte, 0,5% extrato de levedura, 0,2% fosfato de sódio monobásico, 2% ágar) inclinado, coberto com óleo mineral estéril e mantidos à 4 °C.

Para o teste de produção de urease e coloração por *Diazonium Blue B* (DBB) dos isolados, assim como os controles positivo *Cryptococcus neoformans* ATCC 20882 e negativo *Candida albicans* ATCC 2001, estes foram cultivados em tubos contendo meio YCB-uréia (1,17% Yeast Carbon Base, fucsina ácida, 2% ágar, uréia 10%). A fucsina ácida é adicionada até a obtenção de uma coloração rosa escuro para o meio. As culturas foram incubadas a 22-25 °C por 72 horas. A capacidade de produzir urease foi conferida através da alteração da coloração do meio para a cor branca. Para o teste de coloração por *DBB*, os tubos foram incubados a 60 °C por até 16 horas. O reagente

DBB foi solubilizado em uma solução de 0,25 M de Tris-HCl. Ao adicionar o reagente nos tubos, o contato com as colônias de afinidade basidiomicéticas fez com que tornassem rosa-*pink*. Aquelas que não adquirem coloração rosada foram classificadas como pertencentes ao filo Ascomycota. Esse teste foi validado em 1991 por Hagler e Mendonça-Hagler, o qual ainda hoje vem sendo utilizado, como no trabalho de Formoso *et al.* (2015).

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

O DNA genômico total foi obtido a partir da incubação das leveduras em tubo de ensaio contendo 2 mL de caldo Sabouraud por 72 horas a 22-25 °C. A cultura foi transferida para tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL e as células foram recuperadas por centrifugação (8100 x g, 5 minutos). Cerca de 1 mL de água destilada estéril foi adicionado em seguida para ressuspender as células e uma nova centrifugação foi realizada. O sobrenadante foi retirado, as células foram ressuspendidas em 600 uL de tampão de lise (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2% SDS pH 8,0) e incubadas a 65°C por 1 hora. Após, 200 uL de acetato de potássio (5 M, pH 4,8) foi imediatamente adicionados e incubados por 30 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 14100 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e centrifugado novamente. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL e a fim de precipitar o DNA genômico, cerca de 1 volume de isopropanol absoluto foi adicionado as amostras e incubadas por pelo menos 30 minutos. Após, realizou-se uma centrifugação a 14100 x g durante 20 minutos, seguida de lavagem do DNA álcool 70%. O álcool foi retirado e o DNA genômico foi seco a temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, em seguida foi adicionado 50 uL de tampão TE (Tris-EDTA pH 7,4) para ressuspender o material. Foi realizada eletroforese com o material, utilizando gel de agarose 1% confeccionado com solução tampão TBE (Tris, Borato e EDTA) a uma concentração de 0,5 X e corado com 0,5 uL de SYBR Safe (Invitrogen).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi baseada na amplificação da região D1/D2 e utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (O'Donnell, 1993). Para a reação de amplificação em um volume final de 25µL, utilizou-se 12,5 uL de Master Mix (Invitrogen), 0,6 uL de cada oligonucleotídeo (20 pmol/uL) iniciador e 10,3 uL de água ultra-pura. O programa utilizado no termociclador foi composto de um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de um passo de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto durante 30 ciclos, e adicionalmente um passo de extensão final de 72 °C por 6 minutos. A qualidade da amplificação foi averiguada por eletroforese, utilizando gel de agarose 1% corado com corante SYBR Safe (Invitrogen).

O protocolo de purificação utilizado foi por precipitação com isopropanol. Em uma alíquota entre 15-20 µL do produto de PCR, adicionou-se 72µL de isopropanol 65%. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e mantidas em repouso por 20 minutos, sendo então centrifugadas a 14100 x g por 15 minutos. Após esse procedimento, descartou-se o sobrenadante e 250 µL de etanol 70% foi adicionado aos tubos, centrifugados durante 5 minutos a 14000 x g, o precipitado foi seco a uma temperatura de 37 °C e ressuspenso em 15 µL água ultrapura, adaptado de Figueiredo *et al.*, 2003. O sequenciamento das amostras foi realizado empregando sequenciador automático.

Para aquelas espécies consideradas novas ou com identificação dúbia através da região D1/D2 do LSU rDNA, realizou-se o sequenciamento da região ITS. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação foram ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Péter, Tornai-Lehoczki e Dlačny, 2009) e os passos para a amplificação foram os mesmos para a região D1/D2 do LSU rDNA. A amplificação consistiu de um passo de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56 °C e 1 minuto a 72 °C e extensão final com duração de 7 minutos a 72 °C.

4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências foram analisadas através do programa Staden Package (Staden, Judge e Bonfield, 2003) comparadas com as sequencias das linhagens “tipo” no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990), alinhadas e as árvores filogenéticas foram geradas através do algoritmo de Neighbor-joining, utilizando kimura-2-parâmetros e correção gama através do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 6) (Tamura *et al.*, 2013).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram empregadas para elucidar questões como diferença na riqueza de espécies entre pontos amostrados e entre as espécies de zoantídeos. Utilizou-se o índice de Simpson a fim de averiguar equitabilidade e diversidade dos locais, assim como o índice de Shannon-Weaver para detectar a diversidade e comparar os locais amostrados (Shannon e Weaver, 1949; Simpson, 1949). A fim de comparar a semelhança entre os locais de coleta, utilizando os dados do mesmo período de amostragem, a diversidade beta foi calculada utilizando o coeficiente de Whittaker (Whittaker, 1960). Os dados foram analisados utilizando o programa de cálculos estatísticos PAST v.3 (Hammer, Harper e Ryan, 2001).

4.6 TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CRESCIMENTO

Os isolados LMPV100 (*Hortaea werneckii*), LMS03, LMS04, LMS40, LMS54, LMS60, LMS66, LMS67 e LMS55 (*Candida haemulonii*) e LMPV109, LMPV90, LMS02 e LMS38 (*Cutaneotrichosporon dermatis*) foram submetidos a testes enzimáticos, de crescimento em meio hipersalino e a altas temperaturas. Os isolados foram cultivados em meio Ágar Sabouraud e/ou YEPD (2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 2% ágar) durante 48 horas a uma temperatura de 25 °C. Após, cerca de 10 µL de uma suspensão padrão (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células / mL), cada isolado foi

inoculado em meio de cultura específico para cada enzima a ser testada e incubados durante 7 dias a 25 °C.

Para a obtenção de um resultado padronizado, utilizou-se o cálculo de zona de precipitação (Pz). O Pz é a razão entre o diâmetro médio da colônia e o diâmetro médio da colônia mais halo de degradação (Hankin e Anagnostakis 1975; Buzzini e Martini, 2002).

4.6.1 Amilase

Os isolados foram inoculados em meio sólido com 0,2% amido solúvel, 0,67% YNB (Yeast Nitrogen Base) e 2% ágar. Após incubação, uma solução de lugol foi adicionada às placas, e o resultado positivo foi visualizado como halos claros de degradação ao redor das colônias de leveduras produtoras da enzima (Hankin e Anagnostakis, 1975).

4.6.2 Celulase

Para testar a atividade de celulase, o meio usado foi composto de 0,5% carboximetilcelulose, 0,1% AgNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 0,1% KCl, 0,05% MgSO₄, 0,05%, extrato de levedura, 0,1% glicose e 1,7% ágar (Buzzini e Martini, 2002). O meio foi revelado com a adição da solução vermelho Congo 0,1% e posterior lavagem com NaCl 1 M. Os isolados positivos exibiram um halo de degradação laranja em torno de suas colônias.

4.6.3 Esterase

O meio utilizado foi composto de 2,5% Tween 80, 1% peptona, 0,5% NaCl, 0,01% CaCl₂, 0,1% glicose e 2% ágar (Slifkin, 2000). A leitura do meio é realizada através da visualização de um halo esbranquiçado ao redor das colônias.

4.6.4 Lipase

O meio de cultura para a atividade de lipase continha 1% tributirina, 0,5% peptona, 0,3% extrato de levedura e 2% ágar (Atlas e Parks, 1993). A presença de halos

de degradação translúcidos foi observada ao redor das colônias produtoras de enzima. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle positivo.

4.6.5 Pectinase

A atividade de pectinase foi testada em meio contendo 0,67% YNB, 1% pectina, 1% glicose e 1,8% ágar (pH 7,0). As placas foram cobertas com brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) a 1%, e a atividade positiva foi indicada por um halo claro em torno das colônias (Buzzini e Martini, 2002).

4.6.6 Proteases

Para a atividade de protease foram testados quatro substratos diferentes: caseína, gelatina, albumina e queratina. O meio para o ensaio de degradação de caseína consistia de 0,5% caseína, 0,5% glicose, 0,67% YNB e 2% ágar (pH 7,0), com uma preparação de caseína de acordo com Montville (1983). Após a incubação durante 7 dias a 25 °C, a presença dos halos de degradação ao redor das colônias produtoras pode ser observado por adição de HCl 1 N e incubação durante 1 h.

O meio para gelatinase seguiu a metodologia proposta por Smith e Goodner (1958), com o meio constituído por 1,2% gelatina, 0,4% peptona, 0,1% extrato de levedura e 1,5%. Ágar. Para a visualização dos halos de degradação, as culturas foram lavadas com uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. *Nocardia caviae* foi utilizada como controle positivo.

O ensaio para a produção de albuminase foi realizado como descrito por Rüchel *et al.* (1982). O meio consistiu de YCB (*Yeast Carbon Base*) 1,17%, albumina bovina fração V 0,2% e Protovit 2,5 mL em água destilada. Os isolados foram inoculados seguido de incubação a 30°C durante 14 dias. As placas foram coradas com amido preto 1% em solução de ácido acético a 20%, e o excesso de corante foi removido por lavagem com solução de ácido acético a 5%. *Candida albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo.

O teste para a produção de queratinase foi padronizado em meio contendo queratina azure de acordo com Scott *et al.* (2004), e a quantificação enzimática foi

realizada de acordo com Giudice *et al.* (2012). Cerca de 100 μ L de uma suspensão de cada isolado contendo $1-5 \times 10^6$ UFC / mL foi inoculada em meio basal líquido com 4 mg / ml queratina azure em triplicata e incubadas sob agitação a 30°C durante 14 dias. As células das culturas foram centrifugadas e o sobrenadante medido em espectrofotômetro a $\lambda = 595$ nm e a variação na absorbância de 0,01 em comparação com o ensaio em branco (sem o inóculo) foi considerado como 1 U de queratinase. O dermatófito *Microspoum canis* foi utilizado como controle positivo.

4.6.7 Fosfolipase

A atividade de fosfolipase foi determinada de acordo com Price *et al.* (1982). O meio de cultura consistiu de 1% peptona, 2% glicose, 5,73% cloreto de sódio, 0,05% cloreto de cálcio e 2% ágar. O meio foi autoclavado e arrefecido a aproximadamente 50°C antes da adição de gema de ovo estéril a uma concentração final de 4%. *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo.

4.6.8 DNAse

A atividade de DNAse foi determinada de acordo com Lopez-Martinez *et al.* (1994). O teste foi considerado positivo quando um halo de degradação foi visualizado ao redor das colônias após a adição de HCl a 37%. *Sporothrix schenckii* ATCC 201679 foi utilizado como controle positivo.

4.6.9 Tolerância a salinidade

Para o teste de tolerância à salinidade, aproximadamente 100 μ L de suspensão padrão de células das leveduras foram semeadas sobre a superfície de placas contendo meio Ágar YEPD adicionado de NaCl a 10 e 30% e incubadas durante 3 semanas a 25°C. O resultado positivo foi obtido através do crescimento colonial sobre o meio de cultura (Formoso *et al.*, 2015).

4.6.10 Crescimento a 37 °C e 39 °C

Tubos de ensaio contendo caldo YEPD foram inoculados em triplicata para testar o crescimento a 37 °C e a 39 °C, por um período de cinco dias. Para a leitura do crescimento (turbidez do meio), utilizou-se o cartão de Wickerham para realizar as leituras.

4.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas através da técnica de microdiluição de acordo com o protocolo de M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Os isolados foram cultivados em Ágar Sabouraud, durante 6 dias a 30 °C. Os inóculos foram preparados a partir de suspensão de células em solução salina estéril (0,85%). O número de células foi contado com hemocítômetro, e a concentração foi ajustada de modo que o intervalo de concentração obtidos em cada poço ficasse em torno de 2.5×10^3 .CFU/mL.

Os agentes antifúngicos itraconazol, cetoconazol, voriconazol, posaconazol, tioconazol, terbinafina e anfotericina B foram utilizados na gama de concentração final de 0,03 -16 ug/mL, enquanto que fluconazol foi testado na gama de 0,125-64 mg/mL. A incubação foi a 30°C durante 48 horas. As CIMs foram determinadas visualmente por comparação do crescimento nos poços contendo o antifúngico com o controle isento de antifúngico. Após a leitura da CIM, foi determinada a concentração fungicida mínima (CFM). Uma alíquota de 50 µL dos poços em que não se observou crescimento foi transferido para placas onde cada poço continha 800µL de caldo Sabouraud Dextrose e incubou-se durante 7 dias a 30 °C.

O crescimento foi observado visualmente. CFM foi definida como a concentração mínima em que não ocorreu crescimento de fungos (Stopiglia *et al.*, 2011). Estes ensaios foram realizados em triplicata, e como controle padrão para atividade antifúngica foi utilizada uma linhagem de *Candida krusei* ATCC 6258.

5 RESULTADOS

Foram obtidos 139 isolados de leveduras em um total de 14 coletas, a partir das três espécies de zoantídeos analisadas. Para o recife de coral da Ponta Verde foram obtidos um total de 51 isolados de leveduras e para o recife de arenito da Sereia, obtiveram-se 88 isolados. Foi constatada uma riqueza de 38 espécies no total, sendo 67,62% dos isolados pertencem ao filo Ascomycota e 32,37% ao filo Basidiomycota. Foi extraído o DNA genômico total de todos os isolados. Entretanto, dos 51 isolados obtidos do recife de coral da Ponta Verde, foi possível identificar através do sequenciamento da região D1/D2 LSU rDNA 48 isolados. Assim como para os 88 isolados obtidos no recife de arenito da Sereia, foram identificados 76 isolados. Os dados físico-químicos medidos durante as coletas (pH, temperatura e salinidade) comportaram-se de maneira homogênea e não foram utilizados a fim de encontrar influência sobre a distribuição de leveduras. No recife de coral da Ponta Verde as médias foram: pH = 7,73; temperatura = 29°C; salinidade = 36. Já no recife de arenito da Sereia a média dos parâmetros foram: pH = 8,52; temperatura = 30°C; salinidade = 36.

Através da análise filogenética foi possível agrupar os isolados de leveduras e verificar os principais grupos presentes nas amostras estudadas. Foram geradas duas árvores filogenéticas através do algoritmo de Neighbor-joining utilizando o modelo kimura-2-parametros e correção gama, uma para o filo Ascomycota e outro para Basidiomycota, tanto para os isolados de leveduras do recife de coral da Ponta Verde como para os isolados do recife de arenito da Sereia.

5.1 DIVERSIDADE E RIQUEZA DE ESPÉCIES NO RECIFE DA PONTA VERDE

Foram obtidos 51 isolados de leveduras a partir de sete coletas realizadas no recife de coral da Ponta Verde. Os isolados pertencentes ao filo Ascomycota representaram aproximadamente 52,95% (Tabela 1) das leveduras isoladas e as leveduras do filo Basidiomycota representaram aproximadamente 47,05% (Tabela 2).

Ao todo, 48 isolados tiveram o região D1/D2 LSU do rDNA sequenciados, resultando em uma riqueza de 22 espécies, pertencentes a 20 gêneros. O gênero com maior número de espécies foi *Candida* (Figura 2), com 11 espécies. Dentro desse gênero, a espécie mais prevalente foi *Candida parapsilosis* (n= 9), tendo-se ainda a segunda espécie mais isolada *Sterigmatomyces halophilus* com sete isolados (Tabela 2).

Tabela 1- Isolados de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota do recife de coral da Ponta Verde.

Coleta	Época	Amostra	Espécie (Amostra)	Leveduras	Identificação molecular
16/04/2014	Chuvosa	AM 16	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV79	<i>Candida parapsilosis</i>
16/04/2014	Chuvosa	AM 16	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV82	<i>Candida metapsilosis</i>
24/04/2014	Chuvosa	AM 16	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV83	<i>Candida parapsilosis</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV84	<i>Candida metapsilosis</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV87	<i>Candida</i> sp.
31/05/2014	Chuvosa	AM 13	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV88	<i>Aureobasidium pullulans</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV93	<i>Candida parapsilosis</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 12	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV94	<i>Candida metapsilosis</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 14	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV95	<i>Aureobasidium melanogenum</i>
30/07/2014	Chuvosa	AM 08	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV99	<i>Candida etchellsii</i>
30/07/2014	Chuvosa	AM 10	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV100	<i>Hortaea werneckii</i>
30/07/2014	Chuvosa	AM 15	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV103	<i>Candida parapsilosis</i>
22/09/2014	Seca	AM 05	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV110	<i>Hortaea werneckii</i>
22/09/2014	Seca	AM 04	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV112	<i>Candida haemulonii</i>
22/09/2014	Seca	AM 02	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV113	<i>Candida parapsilosis</i>
22/09/2014	Seca	AM 07	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV114	<i>Candida haemulonii</i>
22/09/2014	Seca	AM 07	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV115	<i>Debaryomyces nepalensis</i>
07/11/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV121	<i>Candida parapsilosis</i>
07/11/2014	Seca	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV122	<i>Candida orthopsilosis</i>
07/11/2014	Seca	AM 02	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV126	<i>Candida glabrata</i>
21/01/2015	Seca	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV127	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
21/01/2015	Seca	AM 04	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV128	<i>Kodamaea ohmeri</i>
21/01/2015	Seca	AM 07	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV129	<i>Candida orthopsilosis</i>
21/01/2015	Seca	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV132	<i>Candida parapsilosis</i>
18/03/2015	Seca	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV136	<i>Wickerhamiella</i> sp.
18/03/2015	Seca	AM 08	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV138	<i>Candida parapsilosis</i>
18/03/2015	Seca	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV139	<i>Candida parapsilosis</i>

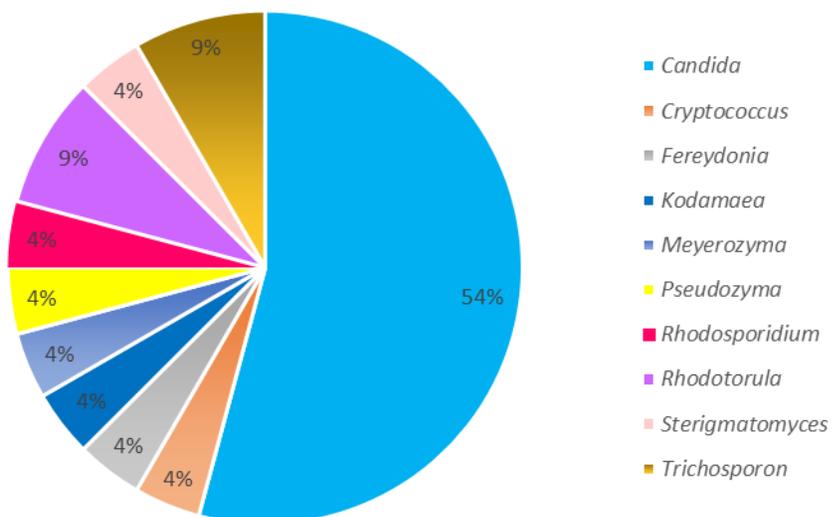
*NI = não identificado

Tabela 2- Isolados de leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota do recife de coral da Ponta Verde.

Coleta	Época	Amostra	Espécie (Amostra)	Leveduras	Identificação molecular
16/04/2014	Chuvosa	AM 04	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV02	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
16/04/2014	Chuvosa	AM 07	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV08	NI*
16/04/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV33	<i>Pseudozyma jejuensis</i>
16/04/2014	Chuvosa	AM 16	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV80	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
16/04/2014	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV81	<i>Trichosporon insectorum</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV85	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV86	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 14	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV90	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 14	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV91	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
31/05/2014	Chuvosa	AM 11	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV92	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
30/07/2014	Chuvosa	AM 10	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV101	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
30/07/2014	Chuvosa	AM 12	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV102	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
30/07/2014	Chuvosa	AM 12	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV104	<i>Rhodotorula</i> sp.
22/09/2014	Seca	AM 8	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV109	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
22/09/2014	Seca	AM 8	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV111	NI*
22/09/2014	Seca	AM 2	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV116	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
22/09/2014	Seca	AM 2	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV118	<i>Fereydounia khargensis</i>
22/09/2014	Seca	AM 1	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV119	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
07/11/2014	Seca	AM 06	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV120	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
07/11/2014	Seca	AM 07	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMPV123	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
07/11/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV124	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
07/11/2014	Seca	AM 01	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMPV125	NI*
21/01/2015	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV130	<i>Cryptococcus nemorosus</i>
18/03/2015	Seca	AM 04	<i>Palythoa variabilis</i>	LMPV137	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>

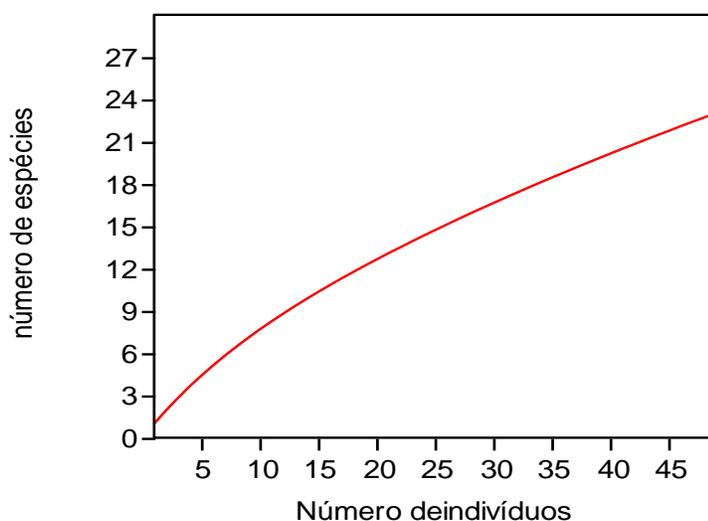
*NI = Não identificado

Figura 2- Abundância de gêneros de leveduras no recife de coral da Ponta Verde.



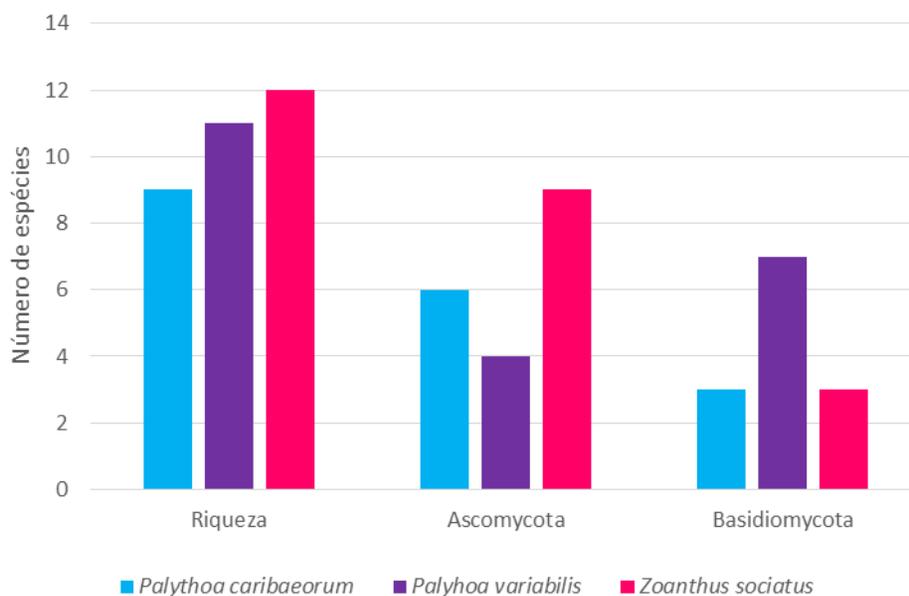
Foram recuperadas 21 linhagens de leveduras associadas a espécie de coral *P. caribaeorum*. Ao todo, 52,3% dos isolados pertencem ao filo Ascomycota e 48,7% ao grupo das leveduras basidiomicéticas. Foi possível recuperar 17 linhagens associadas a *P. variabilis*, sendo que 41,2% pertencem ao filo Ascomycota e 58,8% aos basidiomicetos. Para as 13 linhagens que foram isoladas de *Z. sociatus*, obteve-se 61,5% de ascomicetos e 38,5% basidiomicetos. Ao analisar as espécies encontradas e o número de indivíduos recuperados, foi possível observar através da curva de rarefação que o platô ainda não foi obtido (Figura 3).

Figura 3- Curva de rarefação das espécies de leveduras associadas aos zoantídeos amostrados no recife de coral da Ponta Verde.



Com base nas análises das espécies de zoantídeos, foi constatado que *P. variabilis* e *Z. sociatus* obtiveram quase a mesma riqueza de espécies de leveduras (Figura 4), além de apresentarem em comum três espécies: *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Não foi possível encontrar diferenças ao nível de riqueza entre as épocas chuvosa e seca, pois foram identificadas 13 espécies durante a época de chuvas (março-agosto) e 12 espécies durante a época seca (setembro-fevereiro), sendo que cinco espécies foram encontradas em ambas estações: *Candida parapsilosis*, *Hortaea werneckii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sterigmatomyces halophilus* e *Cutaneotrichosporon dermatis*.

Figura 4- Riqueza das espécies de leveduras e de prevalência de dois filós associados entre as espécies de cnidários da família Zoanthidae amostrados no recife de coral da Ponta Verde.



5.1.1 Análise filogenética dos isolados de leveduras obtidos no recife de coral da Ponta Verde

Através da análise filogenética, os isolados foram agrupados e verificou-se os principais grupos presentes nas amostras. Foram geradas duas árvores, uma para o filo Ascomycota (Figura 5) e outra para o filo Basidiomycota (Figura 6). Saccharomycetes (Subfilo Saccharomycotina) foi o principal grupo encontrado dentro de Ascomycota. Enquanto que no grupo de isolados pertencentes ao filo Basidiomycota, foram registrados quatro grupos que estavam homogeneamente distribuídos: Microbotryomycetes, Ustilaginomycetes, Tremellomycetes e Agaricostilbomycetes.

Figura 5- Árvore filogenética construída a partir da análise de neighbor-joining da região D1/D2 do rDNA (LSU) dos isolados de leveduras do filo Ascomycota obtidos no recife de coral da Ponta Verde. Os valores de bootstrap (1000 réplicas) exibidos nas árvores são aqueles maiores que 50%. Barra indica 0.05 substituições por posição de nucleotídeo.

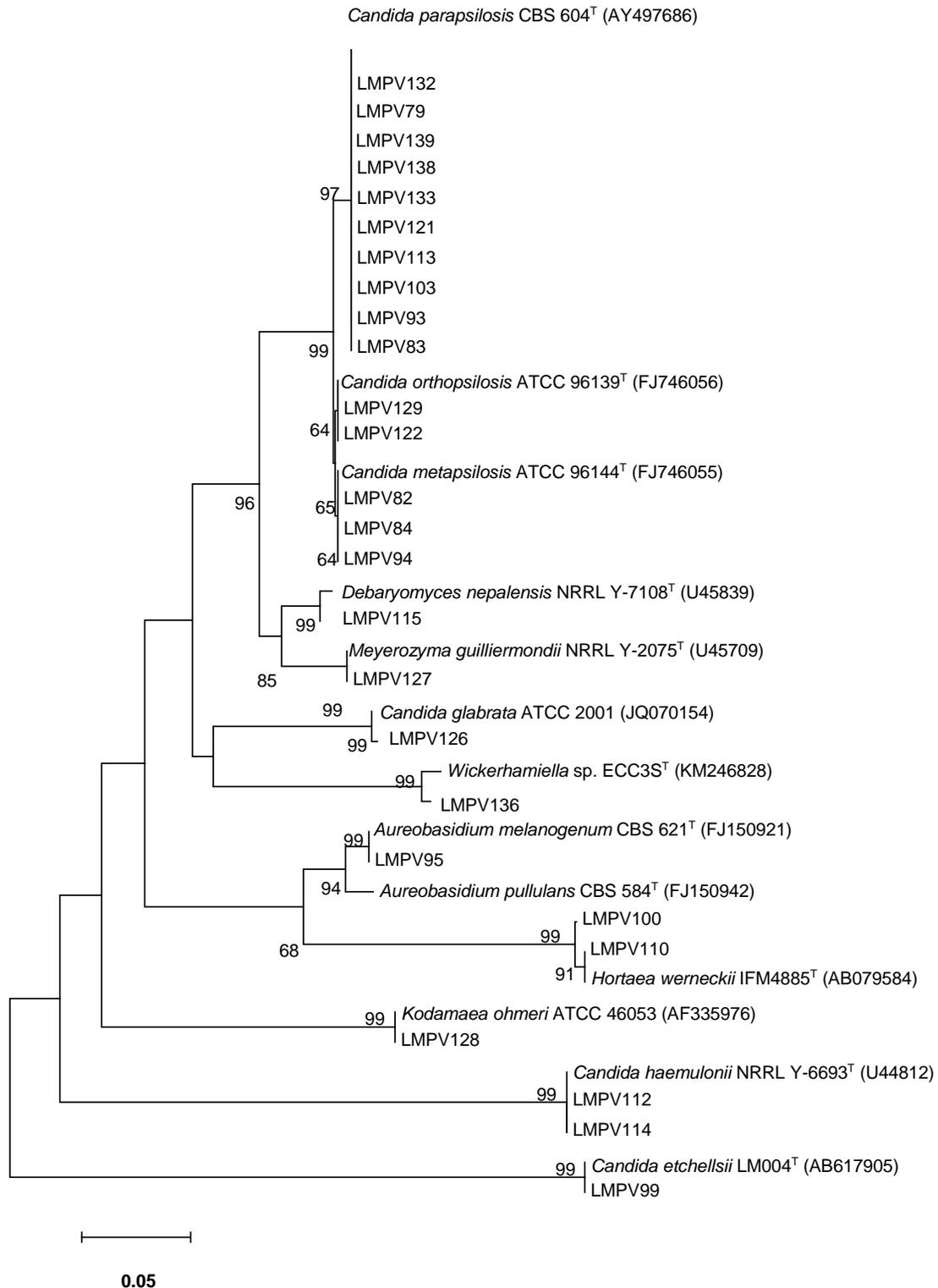
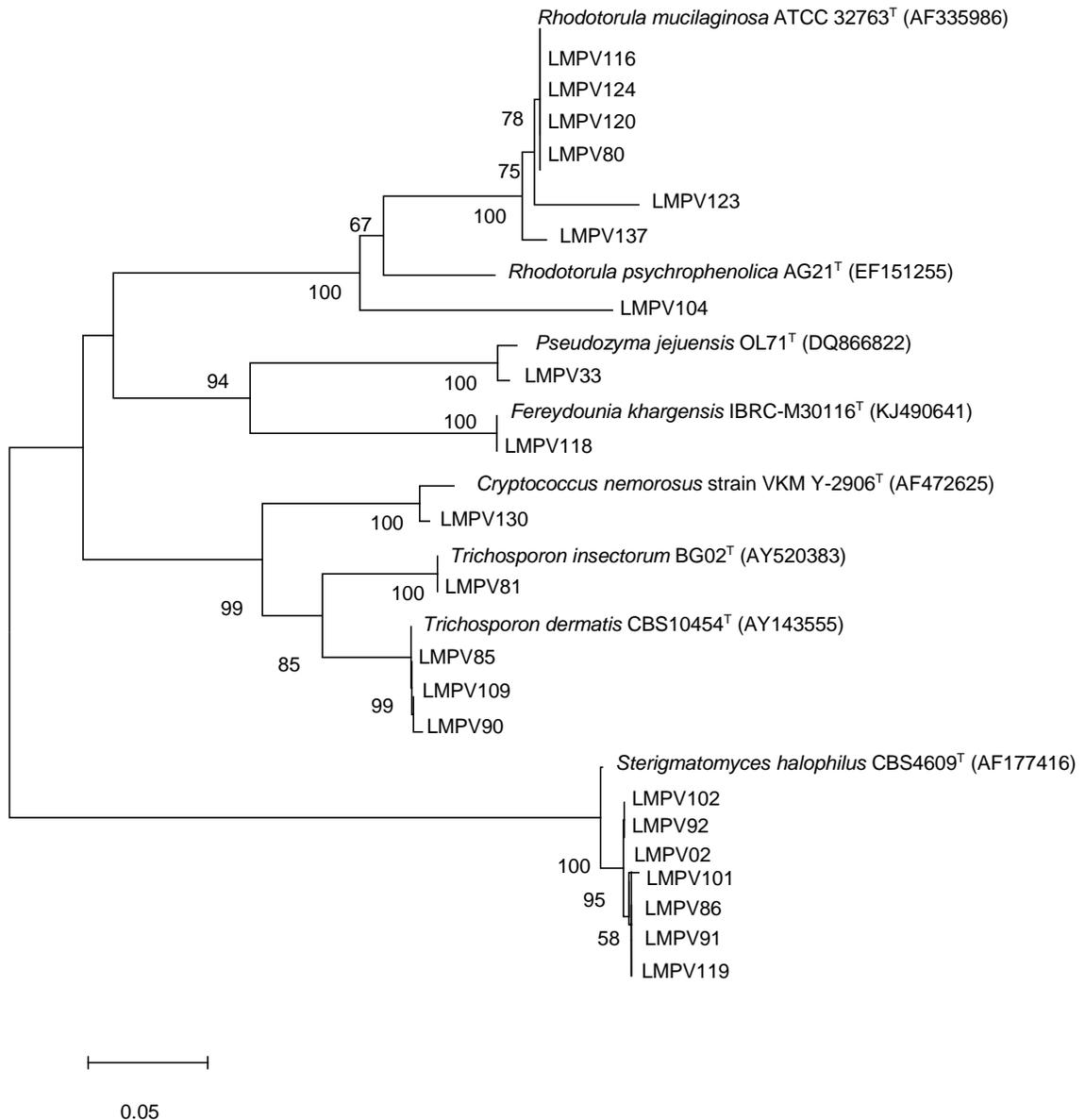


Figura 6- Árvore filogenética construída a partir da análise de Neighbor-joining da região D1/D2 do rDNA (LSU) dos isolados de leveduras do filo Basidiomycota obtidos no recife de coral da ponta verde. os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) exibidos nas árvores são aqueles maiores que 50%. Barra indica 0.05 substituições por posição de nucleotídeo.



5.2 DIVERSIDADE E RIQUEZA DE ESPÉCIES NO RECIFE DA SEREIA

Foram obtidos 88 isolados de leveduras, sendo aproximadamente 76,13% pertencentes ao filo Ascomycota (Tabela 3) e 23,86% ao filo Basidiomycota (Tabela 4). A espécie *P. caribaeorum* apresentou 24 isolados, sendo 70,8% ascomicetos e 29,2% basidiomicetos. Para *P. variabilis* foram registrados 46 isolados, sendo 76% ascomicetos e 24% basidiomicetos. Com relação a *Z. sociatus* foram encontrados 18 isolados de leveduras, sendo 83,3% de ascomicetos e outros 16,7% basidiomicetos.

Cerca de 76 isolados foram sequenciados, resultando na identificação de 10 gêneros e 27 espécies. O gênero mais representativo foi *Candida* (Figura 7) com 8 espécies e a espécie predominante foi *Candida haemulonii* (n= 11). Assim como na Ponta Verde, o platô de diversidade ainda não foi atingido (Figura 8).

Tabela 3- Isolados de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota do recife de arenito da Sereia

Coleta	Época	Amostra	Espécie (Amostra)	Leveduras	Identificação molecular
24/09/2014	Seca	AM 05	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS01	<i>Yarrowia lipolytica</i>
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS03	<i>Candida haemulonii</i>
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS04	<i>Candida haemulonii</i>
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS05	<i>Candida haemulonii</i>
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS07	<i>Candida parapsilosis</i>
24/09/2014	Seca	AM 01	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS08	NI*
24/09/2014	Seca	AM 05	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS09	NI*
24/09/2014	Seca	AM 05	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS10	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
10/11/2014	Seca	AM 01	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS13	<i>Candida tropicalis</i>
10/11/2014	Seca	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS14	<i>Candida parapsilosis</i>
10/11/2014	Seca	AM 03	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS16	NI*
10/11/2014	Seca	AM 05	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS17	<i>Pichia kudriavzevii</i>
21/01/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS18	<i>Pichia kudriavzevii</i>
21/01/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS19	<i>Candida spencermartinsiae</i>
21/01/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS20	<i>Cyberlindnera fabianii</i>
21/01/2015	Seca	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS21	<i>Candida parapsilosis</i>
21/01/2015	Seca	AM 06	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS22	<i>Candida suratensis</i>
21/01/2015	Seca	AM 01	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS23	<i>Candida tropicalis</i>
21/01/2015	Seca	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS24	<i>Candida</i> sp.

Tabela 3- Continuação: Isolados de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota do recife de arenito da Sereia

21/01/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS25	<i>Pichia kudriavzevii</i>
21/01/2015	Seca	AM 05	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS26	<i>Pichia kudriavzevii</i>
21/01/2015	Seca	AM 05	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS27	<i>Pichia kudriavzevii</i>
21/01/2015	Seca	AM 04	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS29	<i>Candida</i> sp.
21/01/2015	Seca	AM 04	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS31	NI*
21/01/2015	Seca	AM 08	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS33	NI*
21/01/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS35	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
21/01/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS36	NI*
19/03/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS37	<i>Candida metapsilosis</i>
19/03/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS39	<i>Candida aaseri</i>
19/03/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS40	<i>Candida haemulonii</i>
19/03/2015	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS41	<i>Candida haemulonii</i>
19/03/2015	Seca	AM 06	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS42	<i>Candida metapsilosis</i>
19/03/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS45	<i>Candida metapsilosis</i>
19/03/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS48	<i>Candida aaseri</i>
19/03/2015	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS50	<i>Hortaea werneckii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS52	<i>Candida orthopsilosis</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS53	NI*
19/05/2015	Chuvosa	AM 03	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS54	<i>Candida haemulonii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 03	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS55	<i>Candida haemulonii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 04	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS56	NI*
19/05/2015	Chuvosa	AM 04	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS57	NI*
19/05/2015	Chuvosa	AM 04	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS58	<i>Hortaea werneckii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 05	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS59	<i>Candida metapsilosis</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 05	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS60	<i>Candida haemulonii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 05	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS61	<i>Hortaea werneckii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 06	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS62	<i>Candida tropicalis</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 07	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS63	<i>Meyerozyma caribbica</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS65	<i>Pichia kluyveri</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS66	<i>Candida haemulonii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS67	<i>Candida haemulonii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS71	<i>Hortaea werneckii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 07	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS72	<i>Hortaea werneckii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS73	<i>Hortaea werneckii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS74	<i>Candida</i> sp.
17/07/2015	Chuvosa	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS77	<i>Hortaea werneckii</i>

Tabela 3- Continuação: Isolados de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota do recife de arenito da Sereia

17/07/2015	Chuvosa	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS79	NI*
17/07/2015	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS80	<i>Candida atlantica</i>
17/07/2015	Chuvosa	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS82	<i>Hortaea werneckii</i>
17/07/2015	Chuvosa	AM 05	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS83	<i>Hortaea werneckii</i>
17/07/2015	Chuvosa	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS84	<i>Hortaea werneckii</i>
15/09/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS88	<i>Candida atlantica</i>
15/09/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS89	<i>Canida haemulonii</i>
15/09/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS90	<i>Canida parapsilosis</i>
15/09/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS91	<i>Candida sp.</i>
15/09/2015	Seca	AM 01	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS93	<i>Candida atlantica</i>
15/09/2015	Seca	AM 01	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS94	<i>Candida spencermartinsiae</i>
15/09/2015	Seca	AM 01	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS96	<i>Candida atlantica</i>

*NI = Não Identificado

Tabela 4- Isolados de leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota do recife de arenito da Sereia.

Coleta	Época	Amostra	Espécie (Amostra)	Leveduras	Identificação molecular
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS02	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS06	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
24/09/2014	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS12	<i>Pseudozyma prolifica</i>
10/11/2014	Seca	AM 06	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS15	<i>Cryptococcus arboriformis</i>
21/01/2015	Seca	AM 07	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS28	*NI
21/01/2015	Seca	AM 04	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS30	<i>Rhodotorula sp.</i>
21/01/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS32	<i>Rhodotorula sp.</i>
21/01/2015	Seca	AM 06	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS34	<i>Rhodotorula sp.</i>
19/03/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS38	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
19/03/2015	Seca	AM 06	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS43	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
19/03/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS44	*NI
19/03/2015	Seca	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS46	<i>Rhodospidium fluviale</i>
19/03/2015	Seca	AM 03	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS47	<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>
19/03/2015	Seca	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS49	<i>Sporobolomyces nylandii</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 01	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS51	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS68	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS69	<i>Hannaella phetchabunensis</i>
19/05/2015	Chuvosa	AM 09	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS70	<i>Rodothorula mucilaginosa</i>
17/07/2015	Chuvosa	AM 08	<i>Palythoa variabilis</i>	LMS76	<i>Rhodospidium fluviale</i>
17/07/2015	Chuvosa	AM 02	<i>Zoanthus sociatus</i>	LMS81	<i>Rhodotorula sp.</i>
17/07/2015	Chuvosa	AM 01	<i>Palythoa caribaeorum</i>	LMS85	<i>Sterigmatomyces halophilus</i>

*NI = Não Identificado

Figura 7- Abundância de gênero de leveduras no recife de arenito da Sereia.

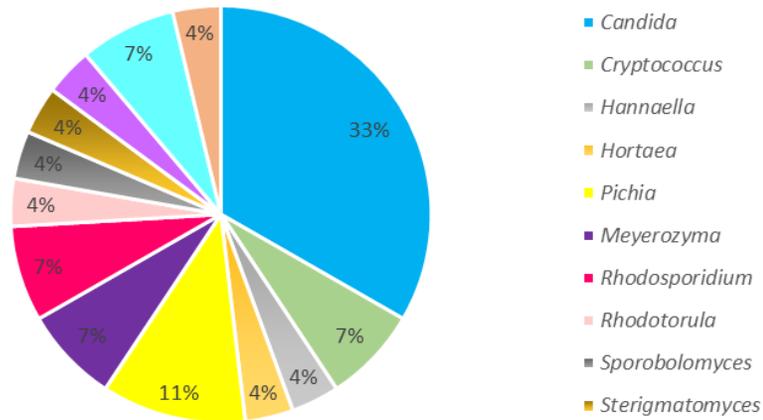
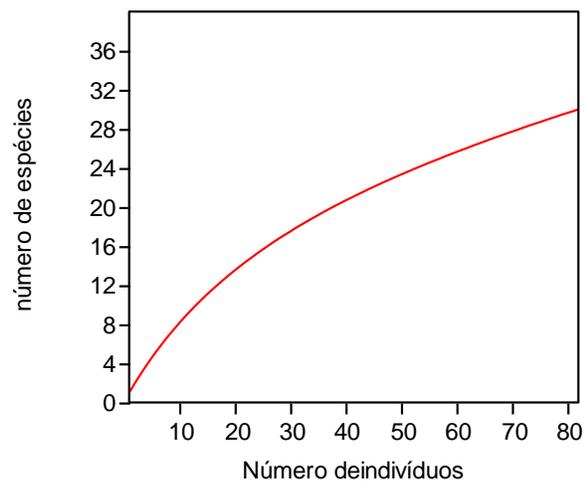


Figura 8- Curva de rarefação das espécies de levedura dos corais amostrados no recife de arenito da Sereia.

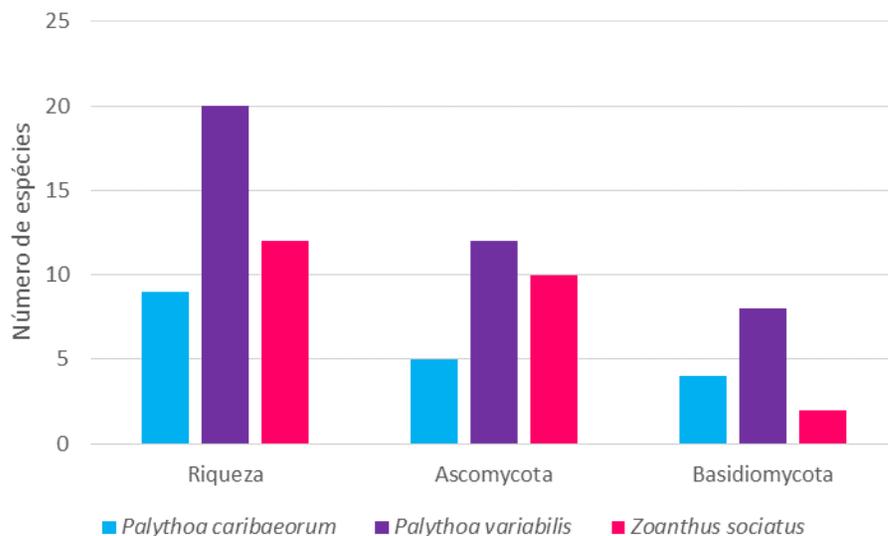


Ao analisar as espécies de zoantídeos, constatou-se que *P. variabilis* apresentou maior riqueza, com 20 espécies de leveduras (Figura 9). *P. caribaeorum* apresentou 9 espécies e *Z. sociatus* apresentou 12 espécies de leveduras. As três espécies de zoantídeos apresentam em comum apenas 3 espécies de leveduras: *Candida*

metapsilosis, *Hortaea werneckii* e *Rhodotorula* sp.. Quando comparada a riqueza de espécies de *P. caribaeorum* com *P. variabilis*, três espécies foram encontradas em ambos os cnidários: *Candida spencermartinsiae*, *Meyerozima guilliermondii* e *Sterigmatomyces halophilus*. Porém, quando compara-se *P. variabilis* com *Z. sociatus*, três espécies foram compartilhadas: *Candida haemulonii*, *Candida* sp. e *Candida atlantica*.

Ainda foi possível encontrar diferença ao nível de riqueza entre as épocas chuvosa e seca, onde foram identificadas 12 espécies durante a época de chuvas (março-agosto) e 20 espécies para a época seca (setembro-fevereiro). Constatou-se também que cinco espécies foram encontradas em ambas estações: *Candida atlantica*, *Candida haemulonii*, *Candida metapsilosis*, *Hortaea werneckii* e *Rhodotorula* sp.

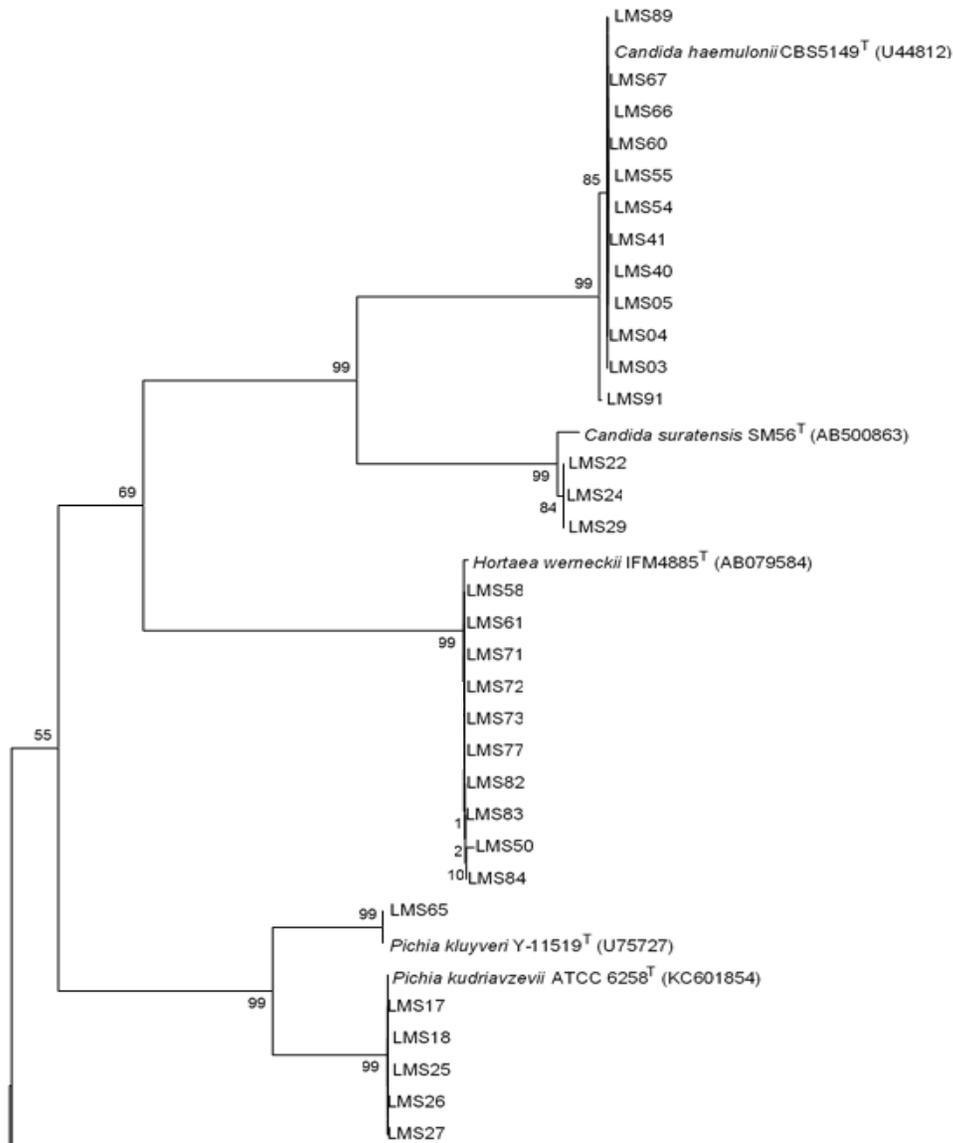
Figura 9- Riqueza das espécies de leveduras e de prevalência de filo associados entre as espécies de cnidários da família Zoanthidae no recife de arenito da Sereia.



5.2.1 Árvore filogenética dos isolados de leveduras obtidos no recife de arenito da Sereia

A predominância de isolados pertencentes ao filo Ascomycota, subfilo Saccharomycotina e ordem Saccharomycetes foi também mantida no recife de arenito da Sereia (Figura 10). A árvore obtida para o filo Basidiomycota apresentou a predominância de duas ordens: Microbotryomycetes e Tremellomycetes (Figura 11).

Figura 10- Árvore filogenética construída a partir da análise de neighbor-joining da região D1/D2 do rDNA (LSU) dos isolados de leveduras do filo Ascomycota obtidos no recife de arenito da Sereia. os valores de bootstrap (1000 réplicas) exibidos nas árvores são aqueles maiores que 50%. barra, 0.05 substituições por posição de nucleotídeo.



Continuação. **Figura 10-** Árvore filogenética construída a partir da análise de neighbor-joining da região D1/D2 do rDNA (LSU) dos isolados de leveduras do filo Ascomycota obtidos no recife de arenito da Sereia. os valores de bootstrap (1000 réplicas) exibidos nas árvores são aqueles maiores que 50%. barra, 0.05 substituições por posição de nucleotídeo.

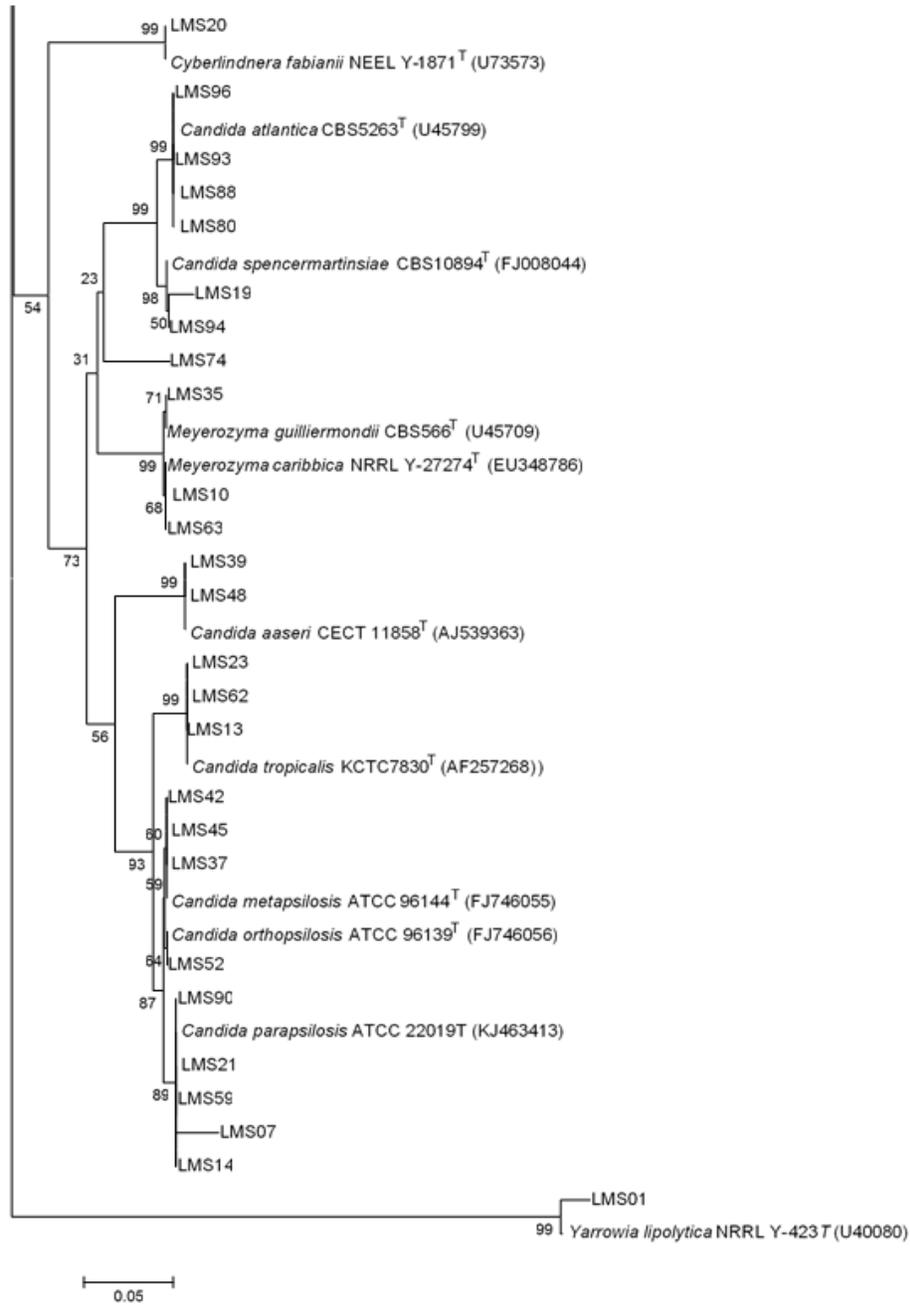
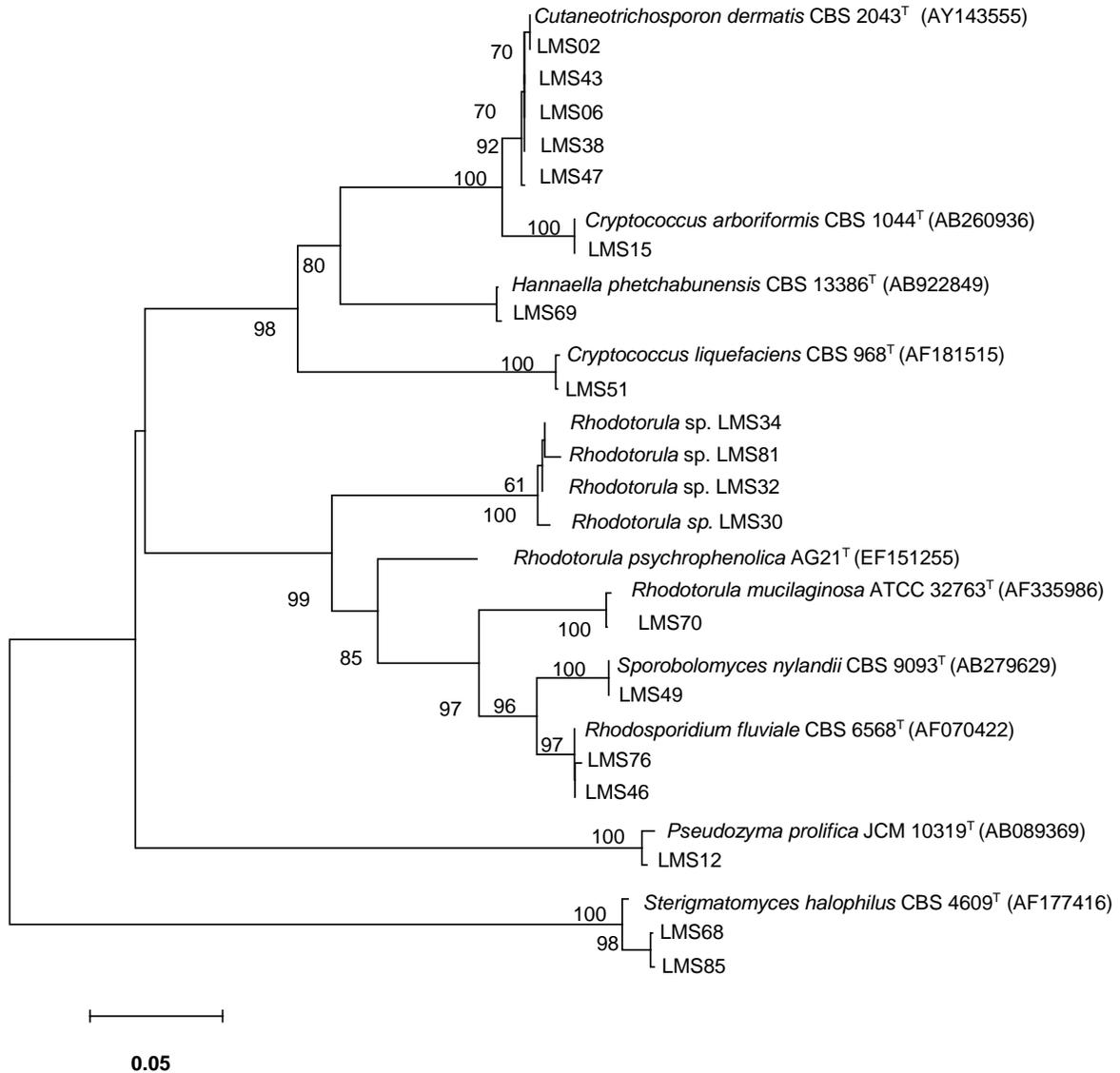


Figura 11- Árvore filogenética construída a partir da análise de Neighbor-joining da região D1/D2 do rDNA (LSU) dos isolados de leveduras do filo Basidiomycota obtidos no recife de arenito da Sereia. Os valores de *bootstrap* (1000 réplicas) exibidos nas árvores são aqueles maiores que 50%. A barra indica 0.05 substituições por posição de nucleotídeo.

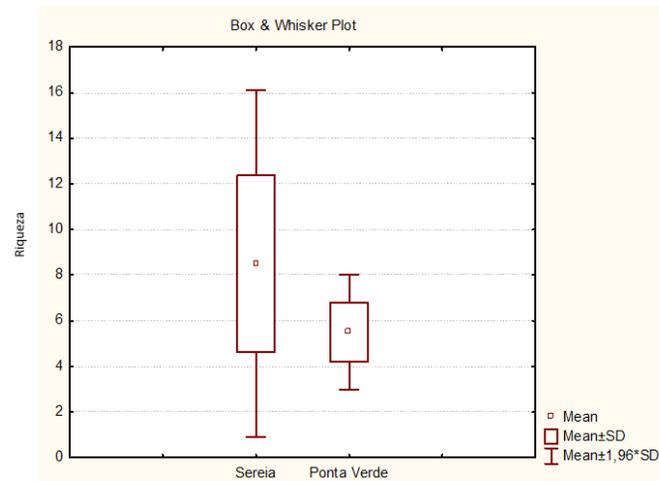


5.3 DIVERSIDADE E RIQUEZA: RECIFE DE CORAL DA PONTA VERDE x RECIFE DE ARENITO DA SEREIA

O recife de coral da Ponta Verde apresentou uma riqueza de 22 espécies de leveduras, enquanto que o recife de arenito da Sereia apresentou 27 espécies. Foram compartilhadas 11 espécies entre os recifes estudados: *Candida haemulonii*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Cutaneotrichosporon dermatis*, *Hortaea werneckii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodosporidium fluviale*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula* sp. e *Sterigmatomyces halophilus*.

A análise estatística da riqueza de espécies nos locais de coleta durante o mesmo período de amostragem (setembro/2014, novembro/2014, janeiro/2015 e março/2015), indicou que ambos os recifes foram igualmente ricos (Figura 12). Porém, as espécies encontradas entre os dois pontos diferiram, pois foram encontradas 9 espécies para o recife da Ponta Verde (26 isolados de leveduras) e 19 espécies para o recife da Sereia (49 isolados de leveduras). Constatou-se que os isolados pertencentes ao filo Ascomycota corresponderam a 50% na Ponta Verde e 50% no recife da Sereia. O índice de Simpson para o recife de coral da Ponta Verde foi $S=0,91$. Para a Sereia foi $S=0,92$ o que indica que não há uma equitabilidade entre as espécies, existindo sim predominância de espécies para ambos locais. Quando calculado o índice Shannon-Weaver para os dois locais, a diversidade é semelhante com $S=2,74$ para o recife da Ponta Verde e $S=2,88$ para o recife da Sereia. A diversidade beta foi aplicada utilizando o coeficiente de Whittaker (Whittaker, 1960) tendo sido encontrada uma similaridade de 58% entre a riqueza dos ecossistemas recifais da Ponta Verde e da Sereia, sendo que ambos se localizam no litoral de Maceió, região típica da costa tropical brasileira.

Figura 12- Análise estatística da riqueza encontrada em ambos recifes durante o mesmo período de coleta.



5.3.1 Riqueza entre espécies de zoantídeos

Ao comparar as espécies de zoantídeos amostrados e a partir dos dados obtidos, percebeu-se que algumas espécies foram exclusivas de cada local. Para *Z. sociatus* foi constatada a presença de 12 espécies pertencentes ao recife da Ponta verde e 5 ao recife da Sereia, com apenas uma espécie compartilhada, *Candida orthopsilosis*. Com relação a *P. variabilis*, foram encontradas 11 espécies no recife da Ponta Verde e 18 para o recife da Sereia, tendo ainda 4 espécies em comum: *Candida parapsilosis*, *Hortaea werneckii*, *Rhodotorula* sp. e *Sterigmatomyces halophilus*. Já para *P. caribaeorum* foram registradas 9 espécies no recife da Ponta Verde e 8 espécies no recife da Sereia, entre as quais foram compartilhadas 3 espécies: *Hortaea werneckii*, *Rhodotorula* sp. e *Cutaneotrichosporon dermatis*.

Entre as três espécies de zoantídeos, foram compartilhadas 7 espécies de leveduras: *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Hortaea werneckii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Rhodotorula* sp. e *Sterigmatomyces halophilus*

5.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E CRESCIMENTO A ALTAS TEMPERATURAS

Todos os isolados testados (Tabela 5) foram capazes de crescer a temperatura próximas a do corpo humano e os isolados de *Cutaneotrichosporon dermatis* foram capazes de crescer a 39 °C. Assim como apresentaram capacidade de crescer em meio hipersalino (NaCl 10%). As enzimas esterase e lipase também foram expressas por todos os isolados (Tabela 5). *Candida haemulonii* foi capaz ainda de produzir enzimas fosfolipase, gelatinase, albuminase e queratinase. Já *C. dermatis* não foi capaz de produzir nenhuma dessas enzimas, mas os isolados LMS38 e LMPV109 foram capazes de expressar a enzima DNase.

Tabela 5- Atividade enzimática de linhagens pertencentes as espécies *Candida haemulonii* e *Cutaneotrichosporon dermatis*

Enzimas	Zona de precipitação ou resultado (PZ) ^a											
	<i>Candida haemulonii</i>								<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>			
	LMS 03	LMS 04	LMS 40	LMS 54	LMS 55	LMS 60	LMPV 66	LMPV 67	LMS 02	LMS38	LMPV 90	LMPV 109
Lipase	0,60	0,70	0,77	0,68	0,74	0,61	0,64	0,68	0,245	0,36	0,35	0,32
Esterase	0,30	0,31	0,33	0,31	0,31	0,32	0,93	0,28	0,32	0,35	0,37	0,285
Pectinase	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Amilase	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cellulase	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	0,375	0,375	0,345
Urease	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Fosfolipase	0,99	0,99	0,96	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	1	1	1	1
Urease	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	3	3	3	3
DNase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,8	1	0,79
Protease												
Caseinase	0,34	Negativo	0,38	0,38	Negativo	0,38	0,37	0,39	0,22	Negativo	Negativo	Negativo
Gelatinase	0,33	0,35	0,43	0,44	0,40	0,41	0,57	0,41	1	1	1	1
Albuminase	0,51	0,59	0,41	0,49	0,56	0,44	0,63	0,48	0,34	1	1	0,57
Queratinase	0,120	0,172	0,252	0,019	0,101	0,163	0,115	0,084	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

^a PZ = 1 (Negativo) / PZ < 1 (positivo) / PZ < 0,5 (fortemente positivo)

5.5 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

Quanto a susceptibilidade aos antifúngicos, as linhagens de *C. haemulonii* foram consideradas resistentes apenas ao cetoconazol e tioconazol (CIM= 2 µg/mL) (Tabela 6). Já *C. dermatis*, quando comparamos resultados percebemos que as linhagens LMPV90 e LMS38 foram menos suscetíveis a quase todos os agentes antifúngicos com exceções para itraconazol e anfotericina B, para o qual todas as linhagens apresentaram CIMs similares (intervalo 0,5 a 2,0 µg/mL). Os CFMs de todos os agentes antifúngicos foram altos (intervalo de 2,0 a >64,0 µg/mL). Os CFMs mais baixos foram para anfotericina B com média geométrica igual a 4,0 (intervalo de 2,0 a 8,0 µg/mL).

Tabela 6- Sucetibilidade antifúngica de isolados de *Candida haemulonii* e *Cutaneotrichosporon dermatis*

	Antifúngico	Cetoconazol	Tioconazol	Posaconazol	Anfotericina B	Itraconazol	Voriconazol	Terbinafina	Fluconazol
CIM / CFM (µg/mL)									
<i>C. haemulonii</i>	LMS 03	0,5 / >16	2 / 16	4 / >16	8 / 8	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	64 / >64
	LMS 04	0,5 / >16	1 / >16	2 / >16	4 / 8	8 / >16	16 / >16	>16 / >16	64 / >64
	LMS 40	1 / >16	2 / >16	>16 / >16	16 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 54	4 / >16	2 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 60	4 / >16	2 / >16	>16 / >16	16 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 66	1 / 16	2 / 16	4 / >16	8 / 8	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	64 / >64
	LMS 67	1 / >16	2 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 55	4 / >16	4 / 16	>16 / >16	8 / 8	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	Média geométrica (min-max)	2,0 (0,5 - 4) / >16 (16 - >16)	2,0 (1 - 4) / >16 (16 - >16)	>8,7 (2- >16,0) / >16	>10,4 (4 - >16) / >11,3 (8 - >16)	>16 (8 - >16) / >16	>16 / >16	>16 (>16) / >16	>64 (64 - >64) / >64
<i>C. dermatis</i>	LMPV 109	0,125 / 8,0	0,125 / 16,0	0,25 / 4	2,0 / 8,0	0,5 / >16,0	0,062 / 8,0	0,5 / >16,0	2,0 / >64,0
	LMPV 90	1,0 / 4,0	8,0 / 8,0	4,0 / 8,0	1,0 / 4,0	1,0 / 4,0	2,0 / 8,0	4,0 / >16,0	64,0 / >64,0
	LMS 02	0,125 / 8,0	0,25 / 8,0	0,5 / >16,0 >16,0 /	0,5 / 2,0	0,5 / >16,0	0,125 / 16,0	1,0 / 16,0	4,0 / 8,0
	LMS 38	8,0 / >16,0	4,0 / 8,0	>16,0	2,0 / 4,0	2,0 / >16,0	>16,0 / >16,0	4,0 / >16,0	64,0 / >64,0
	Media geométrica (min-max)	0,595 (0,125-8,0) / >8,0 (4,0- >16,0)	>0,706 (0,062- >16,0) / >11,314 (8,0->16,0)	0,841 (0,5-2,0) / 11,314 (4,0->16,0)	1,0 (0,125-8,0) / 9,514 (8,0-16,0)	1,189 (0,5-2,0) / 4,0 (2,0-8,0)	1,682 (0,5-4,0) / >16,0 (16,0->16,0)	>1.682 (0.25->16.0) / 9.514 (4.0->16.0)	13,454 (2,0-64,0) / >38,055 (8,0->64,0)

CIM = concentração mínima inibitória

CFM = concentração mínima fungicida

6 DISCUSSÃO

A prevalência de membros do filo Ascomycota em ambiente costeiro foi relatado em diversos trabalhos (Vogel *et al.*, 2007; Jones e Pang, 2012; Zhang *et al.*, 2015), mas pouco foi discutido sobre qual seria o motivo que influenciaria essa prevalência. Em meio terrestre, sabe-se que leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota possuem maior capacidade de dispersão do que Ascomycota. As leveduras podem ser transportadas passivamente por vetores e também possuem uma estrutura chamada de balistoconídia que lança os balistisporos para serem transportados pelo ar o que possibilitando a colonização de novos substratos (Starmer e Lachance, 2011).

A diversidade marinha encontrada de espécies ascomicéticas pode ter sido influenciada pela disponibilidade de matéria orgânica presente nas zonas costeiras, onde a matéria orgânica ocorre em composição simples o que permite a proliferação de representantes desse filo, especialista em degradar compostos simples presentes principalmente em ambientes ricos em carbono orgânico e açúcares (Suh *et al.*, 2006).

Jones *et al.* (2015) fez uma revisão de fungos marinhos já registrados e de novas ocorrências desde 2008. Comparando com os dados obtidos constatou-se que 18 espécies das 39 encontradas no presente trabalho apresentaram nova ocorrência para o ambiente marinho (Anexo A). Os resultados encontrados novamente corroboram com a literatura, pois a maior parte das leveduras em nova ocorrência para o ambiente marinho pertencem ao filo Ascomycota.

Os gêneros mais relatados pela literatura foram *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Nas regiões costeiras foram principalmente encontradas com maior frequência espécies do gênero *Candida*, o que foi especulado ser devido a exposição a contaminação urbana (Kutty e Philip, 2008). Além disso, a predominância de espécies pertencentes ao filo Ascomycota pode estar ligada ao fato de que esse filo foi considerado mais rico quando comparado com o filo Basidiomycota. Essa característica foi baseada na taxa evolutiva dos ascomicetos por ser maior do que em leveduras basidiomicéticas, o que levou ao acúmulo de mutações neutras em populações e posterior divergência de espécies (Wang *et al.*, 2010). Além disso, a prevalência de

Saccharomycotina no recife de coral da Ponta Verde pode ser explicada em função do grande aporte de matéria orgânica oriundo do litoral urbano da cidade de Maceió. A ordem Saccharomycetales contém diversas espécies de interesse industrial e clínico do filo Ascomycota, como por exemplo as espécies do gênero *Candida* (Diezmann *et al.*, 2004). O que pode também ser aproveitado para a realização de um *screening* de isolados com potencial biotecnológico, como produção de enzimas e antifúngicos.

As informações sobre a qualidade da água próxima aos ecossistemas recifais onde foram coletadas as amostras de zoantídeos demonstraram existir um considerável aporte de matéria orgânica, tendo como base os dados de balneabilidade disponíveis do site do Instituto de Meio Ambiente de Alagoas (IMA/AL). Esses dados demonstraram que a taxa de coliformes termotolerantes em média manteve-se alta junto ao recife de coral da Ponta Verde (3502 NMP/100 mL) e baixa próximo ao recife de arenito da Sereia (464 NMP/100 mL). Porém, percebe-se que durante alguns meses a taxa elevou-se consideravelmente, indicando aumento do aporte de resíduos urbanos (Anexo B). Os ascomicetos parecem ser mais tolerantes ao estresse ambiental (Fernández *et al.*, 2012). Entretanto, a predominância de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota foi maior no recife de arenito da Sereia, o que deve ter sido provocado por algum outro fator influenciando nesta condição.

Segundo informações da literatura nos diz que a ocorrência de “leveduras vermelhas” foi considerada muito comum no ambiente marinho, principalmente do gênero *Rhodotorula*, mas também *Rhodospiridium* e *Sporobolomyces*. Alguns dos fatores que podem ter favorecido principalmente o gênero *Rhodotorula* foi a própria resistência osmótica. As espécies de leveduras pertencentes aos gêneros citados teriam origem da filosfera terrestre e muitas podem estar associadas a plantas marinhas (Starmer, Lachance e Boekhout, 2011).

Rhodotorula representa um gênero reportado como patógeno emergente, amplamente encontrado em diferentes ambientes em associação com mamíferos e plantas (Wirth e Goldani, 2012). Foram encontrados 13 isolados desse gênero associados aos cnidários, principalmente a *P. variabilis* com 7 isolados distribuídos em diferentes amostragens. Sendo 7 isolados recuperados das amostras obtidas no recife

de coral da Ponta Verde e 6 isolados obtidos nas amostras do recife de arenito da Sereia. Além de *Rhodotorula mucilaginosa*, conhecida como causadora de infecções em humanos (Fung *et al.*, 2009; Mohd Nor *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016), outras espécies com tal potencial foram encontradas nesse trabalho como: *Hortaea werneckii*, *Cutaneotrichosporon dermatitis* e *Candida haemulonii*. Entre os isolados encontrados em associação com os cnidários de ambos os pontos de amostragem, 84% foram considerados potenciais patógenos.

Esses possíveis patógenos podem estar presentes em associação com os cnidários devido ao aporte de água residual de origem urbana não tratada diretamente lançada na zona costeira, fazendo com que os zoantídeos (corais moles), incorporem essas leveduras e outras do ambiente. Nos últimos anos diversas espécies de leveduras ascomicéticas, classificadas anteriormente apenas como comensais ou como alimentares, vem emergido como agentes patogênicos importantes pois acometem principalmente pacientes imunodeprimidos (Johnson, 2009). Através dos testes enzimáticos, resistência antifúngica, crescimento em meio hipersalino e a altas temperaturas comprova-se o perfil de patógenos emergentes dessas leveduras. O que traz preocupações especialmente com relação a resistência a antifúngicos amplamente e comumente utilizados em tratamentos clínicos. Reforça a importância de identificar o patógeno e seu perfil de resistência antes de iniciar um tratamento.

Sabe-se que *H. werneckii* apresenta-se como halofílica e tolerante ao estresse, em parte por sua capacidade em produzir melanina, característica essa que dá o nome ao grupo ao qual pertencem “black yeasts”. Causadora de uma dermatomicose conhecida como “Tinea negra” encontrada principalmente em regiões subtropicais e tropicais. E que acomete principalmente as extremidades dos membros (Formoso *et al.*, 2015; Noguchi *et al.*, 2015). Um dos isolados obtidos neste trabalho foi testado quanto a osmotolerância em meio 30% de NaCl e obteve-se resultado positivo, além disso, apresentou alta concentração inibitória mínima (CIM) para os antifúngicos fluconazol e anfotericina B. Também foi testado para a produção enzimática de alguns substratos, sendo que foi fortemente produtor de esterase, lipase, amilase e celulase. Essas enzimas foram encontradas principalmente em leveduras conhecidamente

degradadoras de substrato vegetal (Formoso *et al.*, 2015) (Anexo C). *H. werneckii* pode a sua presença justificada em função da presença de material vegetal em suspensão na água do mar e posterior incorporação pelos cnidários. Esse é o primeiro relato dessa espécie em associação com invertebrados.

Candida haemulonii e *Cutaneotrichosporon dermatis* também foram avaliadas quanto a capacidade de produção enzimática e resistência a antifúngicos, além de crescimento em meio contendo altas concentrações de NaCl e a temperaturas de 37°C e 39°C. Esses isolados apresentaram uma forte produção (Pz) de lipase, esterase e todos os isolados de *C. haemulonii* apresentaram alto Pz para albuminase enquanto metade dos isolados de *C. dermatis* também foi capaz de produzir. Essas enzimas estão relacionadas a colonização de substrato animal, potenciais fatores de virulência para infecções em humanos. Assim como no trabalho com isolados clínicos de Ramos *et al.* (2014) todos os isolados testados de *C. haemulonii* foram fortes produtores de protease. Essa associação dos isolados e cnidários pode ser resultado de uma colonização recente, pois o que se sabe é que um forte arsenal enzimático apresentado pelos isolados pode ser indicativo de um “pool” de características ancestrais a fim de colonizar um novo hospedeiro (Chagas-Neto, Chaves e Colombo, 2008). O que poderia indicar a presença destas leveduras a partir uma fonte exógena, como o despejo de águas residuais urbanas não tratadas.

A utilização da técnica de cultivo usada não foi capaz de inventariar todas as espécies de leveduras presentes em associação aos cnidários da família Zoanthidae, o que sugere a continuação das amostragens em ambos os recifes, a fim de permitir conhecer a riqueza e estabelecer quais espécies sempre associadas a esses corais moles. Essa afirmação se dá com base na análise da curva de rarefação gerada a partir das espécies obtidas e do número de isolados, a qual indica que a diversidade de leveduras encontradas é ainda maior tanto para o recife de coral da Ponta Verde como para o recife de arenito da Sereia.

7 CONCLUSÕES

Constatou-se uma riqueza de espécies de leveduras que foram relatadas pela primeira vez para o ambiente marinho. Com base nos dados obtidos, pode-se concluir também que podem existir mais espécies de leveduras a serem inventariadas em associação com os cnidários. Como a utilização da técnica de cultivo não foi capaz de inventariar todas as espécies de leveduras presentes em associação aos cnidários da família Zoanthidae durante o período de amostragem, sugere-se a continuação das amostragens em ambos os recifes. A fim de permitir conhecer a riqueza e estabelecer quais espécies estão constantemente em associação aos cnidários e quais são temporárias.

Técnicas como metagenômica, proteômica, metabolômica e outras ferramentas a disposição, será possível conhecer melhor a riqueza das espécies presentes e tentar inferir o papel ecológico dessas leveduras no ambiente em questão. Além disso, sugere-se a amostragem das mesmas espécies de corais em locais não expostos a influências como despejo de águas residuais urbanas a fim de comparar a diversidade e avaliar possíveis alterações.

REFERÊNCIAS

AIME, M. C. et al. An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 896-905, 2006. Disponível em: < <http://www.mycologia.org/content/98/6/896.abstract> >.

AINSWORTH, T. D.; THURBER, R. V.; GATES, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. **Trends Ecol Evol**, v. 25, n. 4, p. 233-40, Apr 2010. ISSN 0169-5347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006405> >.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v. 215, n. 3, p. 403-10, 1990.

ATLAS, R. LC PARKS (1993) **Handbook of Microbiological Media**: CRC Press, Inc. London.

ARAUJO, F. V. et al. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 2, p. 91-9, Aug 1995. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8546456> >.

BAPTISTA, E. M. C. **Estudo morfossedimentar dos recifes de arenito da zona litorânea do estado do Piauí, Brasil**. 305f. Tese de Doutorado em Geografia. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis, SC, 2010.

BARNETT, J. A. A history of research on yeasts 8: taxonomy. **Yeast**, v. 21, n. 14, p. 1141-1193, 2004. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1154> >.

BARRADAS, J. I. et al. Spatial distribution of benthic macroorganisms on reef flats at Porto de Galinhas Beach (northeastern Brazil), with special focus on corals and calcified hydroids. **Biotemas**, v. 23, n. 2, p. 61-67, 2010. ISSN 2175-7925.

BOEKHOUT, T. et al. Chapter 100 - Discussion of Teleomorphic and Anamorphic Basidiomycetous Yeasts. In: (Ed.). **The Yeasts** (Fifth Edition). London: Elsevier, 2011. p.1339-1372. ISBN 978-0-444-52149-1.

BOSCOLO, H. K.; SILVEIRA, F. L. Reproductive biology of *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa valilbilis* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea) from the southeastern coast of Brazil. **Brazilian journal of biology** = Revista brasileira de biologia, v. 65, n. 1, p. 29-41, 2005.

BRYSCH-HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 50, n. 2, p. 87-100, Nov 2004. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712367> >.

BURGAUD, G. et al. Marine culturable yeasts in deep-sea hydrothermal vents: species richness and association with fauna. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 73, n. 1, p. 121-33, Jul 2010. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455940> >.

BURNETT, W. J. et al. Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. **Coral Reefs**, v. 16, n. 1, p. 55-68, 1997. ISSN 0722-4028. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s003380050060> >.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **J Appl Microbiol**, v. 93, n. 6, p. 1020-5, 2002. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12452958> >.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 121-132, 2008. ISSN 0301-486X.

CHI, Z. et al. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 236-255, 2009/6// 2009. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000147> >.

CLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. In, 3rd ed. edn. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, Approved Standard M27- A3., Wayne, PA

CORREIA, M. D.; SOVIERZOSKI H. H. ECOSISTEMAS COSTEIROS DE ALAGOAS – BRASIL. **Technical Books**, Rio de Janeiro, 144p., 2009.

CORREIA, M. D. Scleractinian corals (Cnidaria: Anthozoa) from reef ecosystems on the Alagoas coast, Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 91, n. 03, p. 659-668, 2011. ISSN 1469-7769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315410000858> >. Acesso em: 2011.

COUTINHO, R. Bentos de Costões Rochosos. In: **Biologia Marinha**, eds R. C. Pereira and A. Soares- Gomes. Interciência Press, Rio de Janeiro. p. 147-157. 2002

CRAIN, C. M. et al. Understanding and managing human threats to the coastal marine environment. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1162, p. 39-62, Apr 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19432644> >.

DANJO, T.; KAWASAKI, S. Characteristics of Beachrocks: A Review. **Geotechnical and Geological Engineering**, v. 32, n. 2, p. 215-246, 2014. ISSN 0960-3182. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10706-013-9712-9> >.

DIEZMANN, S. et al. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5624-35, Dec 2004. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15583292> >.

DUARTE, A. W. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023-35, Nov 2013. ISSN 1433-4909. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114281> >.

ELBANDY, M. et al. Furan metabolites from the sponge-derived yeast *Pichia membranifaciens*. **J Nat Prod**, v. 71, n. 5, p. 869-72, May 2008. ISSN 0163-3864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314959> >.

ELLIS, R. P. et al. (1)H NMR metabolomics reveals contrasting response by male and female mussels exposed to reduced seawater pH, increased temperature, and a pathogen. **Environ Sci Technol**, v. 48, n. 12, p. 7044-52, Jun 2014. ISSN 1520-5851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846475> >.

FELL, J. W.; VAN UDEN, N. Yeasts in Marine Environments. *In: Marine Microbiology*. C. H. Oppenheimer. Springfield Illinois, Thomas, Charles C., p.329-340, 1963.

FELL, J. W. et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1351-1371, 2000. Disponível em: < <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-50-3-1351> >.

FELL, J. W.; STATZELL-TALLMAN, A.; KURTZMAN, C. P. *Lachancea meyersii* sp. nov., an ascosporogenous yeast from mangrove regions in the Bahama Islands. **Studies in Mycology**, v. 50, n. 2, p. 359-363, 2004.

FELL, J. W. et al. Five new species of yeasts from fresh water and marine habitats in the Florida Everglades. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 533-49, Mar 2011. ISSN 1572-9699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967499> >.

FERNÁNDEZ, N. V. et al. Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 80, n. 1, p. 179-92, Apr 2012. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224476> >.

FIGUEIREDO, G. S. et al. Reação de sequenciamento de DNA e purificação: protocolos otimizados. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2003.

FORMOSO, A. et al. Enzymatic Activity and Susceptibility to Antifungal Agents of Brazilian Environmental Isolates of *Hortaea werneckii*. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 345-52, Dec 2015. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162643> >.

FRANCINI-FILHO, R. B.; MOURA, R. L. D. **Predation on the toxic zoanthid *Palythoa caribaeorum* by reef fishes in the abrolhos bank, eastern Brazil**. 2010, v. 58, n. 1,

2010-03-01 2010. ISSN 1982-436X. Disponível em: <
<http://www.revistas.usp.br/bjoce/article/view/39534> >.

FUNG, H. B. et al. *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. e27-e29, 2009. ISSN 1201-9712. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971208013672> >.

GIUDICE, M. C. et al. Isolation of *Microsporum gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 895-902, 2012. ISSN 1517-8382.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A *Diazonium Blue B* test for yeasts grown three days on yeast carbon base-urea agar. **Rev Microbiol**, v. 22, n. 1, p. 71-74, 1991.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. XIX-XX, 2001.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, p. 597-607, 1975. ISSN 0027-5514.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007. ISSN 0953-7562. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756207000615> >.

JAMES, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nature05110> >

HITTINGER, C. T. et al. Genomics and the making of yeast biodiversity. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 35, p. 100-109, 2015. ISSN 0959-437X. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X15001082> >.

JOHNSON, E. Rare and emerging *Candida* species. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, n. 3, p. 152-159, 2009. ISSN 1936-3761. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12281-009-0020-z> >.

JONES, E. B. G., CHOYEYKLIN, R. (2008). Ecology of marine and freshwater basidiomycetes. In: Boddy L, Frankland JC, van West P (eds) **Ecology of saprotrophic basidiomycetes**. Academic, London, pp 301–324.

JONES, E. B. G.; PANG, K.-L. Tropical aquatic fungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 21, n. 9, p. 2403-2423, 2012. ISSN 0960-3115. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10531-011-0198-6> >.

JONES, E. B. G. et al. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. **Fungal Diversity**, v. 73, n. 1, p. 1-72, 2015. ISSN 1560-2745. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-015-0339-4> >.

KACHALKIN, A.; YURKOV, A. Yeast communities in *Sphagnum phyllosphere* along the temperature-moisture ecocline in the boreal forest-swamp ecosystem and description of *Candida sphagnicola* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 1, p. 29-43, 2012. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-012-9710-6> >.

KACHALKIN, A. V. Yeasts of the White Sea intertidal zone and description of *Glaciozyma litorale* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 6, p. 1073-1083, 2014. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0165-9> >.

KRAUSE, E. et al. Study on the effects of near-future ocean acidification on marine yeasts: a microcosm approach. **Helgoland Marine Research**, v. 67, n. 4, p. 607-621, 2013. ISSN 1438-387X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10152-013-0348-1> >.

KREDIET, C. J. et al. Members of native coral microbiota inhibit glycosidases and thwart colonization of coral mucus by an opportunistic pathogen. **ISME J**, v. 7, n. 5, p. 980-90, May 2013. ISSN 1751-7370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23254513> >.

KURTZMAN, C.; ROBNETT, C. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 4, p. 331-371, 1998. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1023/A%3A1001761008817> >.

KURTZMAN, C. P. et al. Advances in yeast systematics and phylogeny and their use as predictors of biotechnologically important metabolic pathways. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 6, 2015-09-01 00:00:00 2015. Disponível em: < <http://femsyr.oxfordjournals.org/femsyr/15/6/fov050.full.pdf> >.

KURTZMAN, C. P. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. 2, p. 325-332, 2014. ISSN 1466-5034.

KURTZMAN, C. P. et al. Chapter 10 - Gene Sequence Analyses and other DNA-Based Methods for Yeast Species Recognition. In: (Ed.). **The Yeasts** (Fifth Edition). London: Elsevier, 2011. p.137-144. ISBN 978-0-444-52149-1.

KUTTY, S. N.; PHILIP, R. Marine yeasts—a review. **Yeast**, v. 25, n. 7, p. 465-483, 2008. ISSN 1097-0061. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1599> >.

LI, Z. Advances in marine microbial symbionts in the china sea and related pharmaceutical metabolites. **Mar Drugs**, v. 7, n. 2, p. 113-29, 2009. ISSN 1660-3397. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19597576> >.

LIMTONG, S. et al. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole-3-acetic acid. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 30, n. 6, p. 1785-96, Jun 2014. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24442819> >.

LINDAHL, B. D. et al. Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers--a user's guide. **New Phytol**, v. 199, n. 1, p. 288-99, Jul 2013. ISSN 1469-8137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23534863> >.

LOPEZ-MARTINEZ, R. et al. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 17-20, Jan-Mar 1994. ISSN 0187-4640/187-4640.

MESTRE, M. C. et al. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 78, n. 3, p. 531-41, Dec 2011. ISSN 1574-6941. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067034> >.

MILLANES, A. M. et al. Phylogeny and character evolution in the jelly fungi (Tremellomycetes, Basidiomycota, Fungi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, n. 1, p. 12-28, 2011. ISSN 1055-7903. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1055790311002569> >.

MOHD NOR, F. et al. Meningitis Caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in HIV-Infected Patient: A Case Report and Review of the Literature. **Mycopathologia**, v. 180, n. 1-2, p. 95-8, Aug 2015. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25739670> >.

MONTVILLE, T. J. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. **Applied and environmental microbiology**, v. 45, n. 1, p. 200-204, 1983. ISSN 0099-2240.

NEVES, E. G. et al. Cnidaria, Scleractinia, Siderastreidae, Siderastrea. **Check List**, v. 6, n. 4, 2010.

NEWELL, S. Y. **The Succession in the Mycoflora of Red Mangrove (*Rhizophora Mangle* L.) Seedlings.** 1974.

NOGUCHI, H. et al. Tinea nigra showing a parallel ridge pattern on dermoscopy. **The Journal of Dermatology**, v. 42, n. 5, p. 518-520, 2015. ISSN 1346-8138. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1346-8138.12830> >.

O'DONNELL, K. **Fusarium and its near relatives.** The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. 1992.

ORTIZ-CASTELLANOS, L.; RUIZ-HERRERA, J. Phylogenetic relationships of the wall-synthesizing enzymes of Basidiomycota confirm the phylogeny of their subphyla. **Folia Microbiologica**, v. 60, n. 2, p. 143-150, 2015. ISSN 0015-5632. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-014-0354-y> >.

PEREIRA, C. et al. *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia and Pleural Tuberculosis in an Immunocompetent Patient: An Uncommon Association. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 145-9, Feb 2016. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26369644> >.

PÉTER, G.; ROSA, C.; DEAK, T. Environmental Factors Influencing Yeasts. In: (Ed.). **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**: Springer Berlin Heidelberg, 2006. p.155-174. (The Yeast Handbook). ISBN 978-3-540-26100-1.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14, Mar 1982. ISSN 0036-2174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7038928> >.

QIN, X. Y. et al. Phylogenetic diversity and antibacterial activity of culturable fungi derived from the zoanthid *Palythoa haddoni* in the South China Sea. **Mar Biotechnol** (NY), v. 17, n. 1, p. 99-109, Feb 2015. ISSN 1436-2236. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117478> >.

RABELO, E. F.; SOARES, M. D. O.; MATTHEWS-CASCON, H. Competitive interactions among zoanthids (cnidaria: zoanthidae) in an intertidal zone of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, p. 35-42, 2013. ISSN 1679-8759. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-87592013000100004&nrm=iso >.

REIMER, J. D.; FOORD, C.; IREI, Y. Species Diversity of Shallow Water Zoanthids (Cnidaria: Anthozoa: Hexacorallia) in Florida. **Journal of Marine Biology**, v. 2012, p. 14, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1155/2012/856079> >.

RIEGL, B. et al. Coral Reefs. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1162, n. 1, p. 136-186, 2009. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04493.x> >.

ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nat Rev Micro**, v. 5, n. 5, p. 355-362, 2007. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1635> >.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, n. 3, p. 233-244, 1982. ISSN 0036-2174.

SANTANA, E. F. C. et al. Trophic ecology of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on tropical reefs. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 95, n. 02, p. 301-309, 2015. ISSN 1469-7769. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1017/S0025315414001726> >. Acesso em: 2015.

SCHOCH, C. L. et al. The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. **Systematic Biology**, v. 58, n. 2, p. 224-239, 2009.

SCORZETTI, G. et al. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 153-7, Feb 2000. ISSN 0003-6072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768474> >.

SCOTT, J.; UNTEREINER, W. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. **Medical Mycology**, v. 42, n. 3, p. 239-246, 2004. ISSN 1369-3786.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949.

SHEN, X. Y. et al. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from moso bamboo seeds. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95838, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759896> >.

SILVA, J. F. et al. Growth of the tropical zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria: Anthozoa) on reefs in northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 985-996, 2015. ISSN 0001-3765. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652015000200985&nrm=iso >.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, v. 163, n. 688, 1949.

SIPIKZKI, M. *Starmerella syriaca* f.a., sp. nov., an osmotolerant yeast species isolated from flowers in Syria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 4, p. 847-56, Apr 2015. ISSN 1572-9699. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25583140> >.

SLIFKIN, M. Tween 80 Opacity Test Responses of Various Candida Species. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4626-4628, 2000. ISSN 0095-1137.

SMITH JR, H. L.; GOODNER, K. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. **Journal of bacteriology**, v. 76, n. 6, p. 662, 1958.

SOARES, M. O.; RABELO, E. F.; MATHEWS-CASCON, H. Intertidal anthozoans from the coast of Ceará, Brazil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 437, 2011. ISSN 1980-4849.

SPATAFORA, J. W. et al. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1018-1028, 2006. Disponível em: < <http://www.mycologia.org/content/98/6/1018.abstract> >.

STARMER, W. T.; LACHANCE, M.-A.; BOEKHOUT, C. P. K. W. F. Chapter 6 - Yeast Ecology. In: (Ed.). **The Yeasts** (Fifth Edition). London: Elsevier, 2011. p.65-83. ISBN 978-0-444-52149-1.

STADEN, R.; JUDGE, D. P.; BONFIELD, J. K. Analyzing sequences using the Staden Package and EMBOSS. In: (Ed.). **Introduction to Bioinformatics**: Springer, 2003. p.393-410. ISBN 158829241X.

STOPIGLIA, C. D. O. et al. In vitro antifungal activity of dihydroxyacetone against causative agents of dermatomycosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, p. 267-271, 2011. ISSN 0301-486X.

SUGIYAMA, J.; HOSAKA, K.; SUH, S.-O. Early diverging Ascomycota: phylogenetic divergence and related evolutionary enigmas. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 996-1005, 2006. Disponível em: < <http://www.mycologia.org/content/98/6/996.abstract> >.

SUH, S. O. et al. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006-17, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0027-5514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486976> >.

SUNNERHAGEN, P. et al. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In: (Ed.). **Comparative Genomics**: Springer Berlin Heidelberg, v.15, 2006. p.29-46. (Topics in Current Genetics). ISBN 978-3-540-31480-6.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013. ISSN 0737-4038 1537-1719. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840312/> >.

VACA, I. et al. Cultivable psychrotolerant yeasts associated with Antarctic marine sponges. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n. 1, p. 183-9, Jan 2013. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22927015> >.

VOGEL, C. et al. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. **Water Research**, v. 41, n. 9, p. 1915-1920, 2007. ISSN 0043-1354. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313540700108X> >.

WANG, L. et al. Occurrence and diversity of *Candida* genus in marine environments. **Journal of Ocean University of China**, v. 7, n. 4, p. 416-420, 2008. ISSN 1993-5021. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11802-008-0416-3> >.

WANG, H. et al. Ascomycota has a faster evolutionary rate and higher species diversity than Basidiomycota. **Science China Life Sciences**, v. 53, n. 10, p. 1163-1169, 2010. ISSN 1674-7305. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11427-010-4063-8> >.

WEAR, S. L.; THURBER, R. V. Sewage pollution: mitigation is key for coral reef stewardship. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1355, n. 1, p. 15-30, 2015. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12785> >.

WHITTAKER, R. H. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. **Ecological Monographs**, v. 30, n. 3, p. 279-338, 2015/12/11 1960. ISSN 0012-9615. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2307/1943563> >.

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, v. 2012, p. 465717, 2012. ISSN 1687-7098. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23091485> >.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Mol Ecol**, v. 15, n. 7, p. 1713-31, Jun 2006. ISSN 0962-1083. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16689892> >.

ZHANG, T. et al. Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic). **Scientific reports**, v. 5, 2015.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela 7- Registros de ocorrência das espécies de leveduras associadas a cnidários Zoanthidae em ecossistemas recifais de Maceió (AL) para o ambiente marinho

Espécies	Sereia	Ponta Verde	Jones <i>et al.</i> 2015
<i>Aureobasidium melanogenum</i>		X	PR
<i>Aureobasidium pullulans</i>		X	X
<i>Candida spencermartinsiae</i>	X		X
<i>Candida atlantica</i>	X		X
<i>Candida etchellsii</i>		X	PR
<i>Candida aaseri</i>	X		X
<i>Candida glabrata</i>		X	X
<i>Candida haemulonii</i>	X	X	X
<i>Candida metapsilosis</i>	X	X	PR
<i>Candida orthopsilosis</i>	X	X	PR
<i>Candida parapsilosis</i>	X	X	X
<i>Candida sp.</i>	X	X	PR
<i>Candida suratensis</i>	X		PR
<i>Candida tropicalis</i>	X		X
<i>Cryptococcus arboriformis</i>	X		PR
<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	X		X
<i>Cryptococcus nemorosus</i>		X	PR
<i>Cyberlindnera fabiani</i>	X		X
<i>Debaryomyces nepalensis</i>		X	X
<i>Fereydounia khargensis</i>		X	PR
<i>Hannaella phetchabunensis</i>	X		PR
<i>Hortaea werneckii</i>	X	X	PR
<i>Kodamaea ohmeri</i>		X	X
<i>Meyerozyma caribbica</i>	X		X
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	X	X	X
<i>Pichia kluyveri</i>	X		X
<i>Pichia kudriavzevii</i>	X		X
<i>Pseudozyma jejuensis</i>		X	PR
<i>Rhodospiridium fluviale</i>	X	X	X
<i>Rhodotorula sp.</i>	X	X	PR
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	X	X	X

Continuação. **Tabela 7-** Registros de ocorrência das espécies de leveduras associadas a cnidários Zoanthidae em ecossistemas recifais de Maceió (AL) para o ambiente marinho

<i>Sporobolomyces nylandii</i>	X		PR
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	X	X	X
<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	X	X	PR
<i>Trichosporon insectorum</i>		X	PR
<i>Trichosporon</i> sp.	X		PR
<i>Wickerhamiella</i> sp.		X	PR
<i>Yarrowia lipolytica</i>	X		X

PR: Primeiro registro para o ambiente marinho

ANEXO B

Tabela 8. Dados de balneabilidade antes (-) e durante os meses de coleta. Fonte: Instituto do Meio Ambiente de Alagoas.

Recife	Data de coleta	Data de amostragem de água	Termotolerantes (NMP/100 mL)
Ponta Verde	-	11/03/2014	16000
Ponta Verde	16/04/2014	14/04/2014	45
Ponta Verde	31/05/2014	28/05/2014	5400
Ponta Verde	30/07/2014	28/07/2014	110
Ponta Verde	22/09/2014	23/09/2014	16000
Ponta Verde	08/11/2014	10/11/2014	2400
Ponta Verde	21/01/2015	27/01/2015	230
Ponta Verde	18/03/2015	23/03/2015	330
Média			3502
Praia da Sereia	-	19/03/2014	3500
Praia da Sereia	-	21/05/2014	18
Praia da Sereia	-	23/07/2014	18
Praia da Sereia	24/09/2014	24/09/2014	220
Praia da Sereia	10/11/2014	10/11/2014	790
Praia da Sereia	23/01/2015	27/01/2015	18
Praia da Sereia	19/03/2015	22/03/2015	20
Praia da Sereia	19/05/2015	19/05/2015	18
Praia da Sereia	17/07/2015	15/07/2015	18
Praia da Sereia	15/09/2015	13/09/2015	20
Média			464

ANEXO C

Mycopathologia (2015) 180:345–352
 DOI 10.1007/s11046-015-9920-3



Enzymatic Activity and Susceptibility to Antifungal Agents of Brazilian Environmental Isolates of *Hortaea werneckii*

Andrea Formoso · Daiane Heidrich · Ciro Ramón Felix ·
 Anne Carolyne Tenório · Belize R. Leite · Danielle M. Pagani ·
 Santiago Ortiz-Monsalve · Mauricio Ramírez-Castrillón · Melissa Fontes Landell ·
 Maria L. Scroferneker · Patricia Valente

Received: 26 February 2015 / Accepted: 30 June 2015 / Published online: 11 July 2015
 © Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract Four strains of *Hortaea werneckii* were isolated from different substrates in Brazil (a salt marsh macrophyte, a bromeliad and a marine zoanthid) and had their identification confirmed by sequencing of the 26S rDNA D1/D2 domain or ITS region. Most of the strains were able to express amylase, lipase, esterase, pectinase and/or cellulase, enzymes that recognize components of plant cells as substrates, but did not express albuminase, keratinase, phospholipase and DNase, whose substrates are animal-related. Urease production was positive for all isolates, while caseinase, gelatinase and laccase

production were variable among the strains. All the strains grew in media containing up to 30 % NaCl. We propose that the primary substrate associated with *H. werneckii* is plant-related, in special in saline environments, where the fungus may live as a saprophyte and decomposer. Infection of animal-associated substrates would be secondary, with the fungus acting as an opportunistic animal pathogen. All strains were resistant to fluconazole and presented high MIC for amphotericin B, while they were susceptible to all the other antifungal agents tested.

Keywords *Hortaea werneckii* · Enzyme production · Antifungal susceptibility · Environmental isolates

Andrea Formoso and Daiane Heidrich have contributed equally for the manuscript.

A. Formoso · B. R. Leite · P. Valente
 Programa de Pós-graduação em Microbiologia
 Agrícola e do Ambiente, Universidade
 Federal do Rio Grande do Sul,
 Porto Alegre, RS, Brazil

A. Formoso · D. Heidrich · B. R. Leite ·
 M. L. Scroferneker · P. Valente (✉)
 Departamento de Microbiologia, Imunologia e
 Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande
 do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 210, Porto Alegre,
 RS CEP 90050-170, Brazil
 e-mail: patricia.valente@ufrgs.br

D. Heidrich · M. L. Scroferneker
 Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências
 Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
 Porto Alegre, RS, Brazil

C. R. Felix · A. C. Tenório · D. M. Pagani ·
 M. F. Landell
 Setor de Genética, ICBS, Universidade Federal de
 Alagoas, Maceió, Brazil

D. M. Pagani · M. F. Landell
 Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e
 Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de
 Alagoas, Maceió, Brazil

S. Ortiz-Monsalve
 Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química,
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
 RS, Brazil

Introduction

Hortaea werneckii is the etiologic agent of *Tinea nigra*, an uncommon superficial dermatomycosis. This mycosis was originally observed in 1891 [1] and has since being reported from several places in South America [2–8] and other countries [9, 10], including cases from infants [7, 11]. The clinical presentation is generally a single hyperchromic macule, not symptomatic, in palms and soles, but there is a report of isolation of *H. werneckii* from blood and splenic abscess [12]. Treatment is usually done by topic or oral administration of antifungal agents [7, 13–18]. Although there are few reports of antifungal resistance, in vitro antifungal susceptibility testing showed that some isolates were resistant to amphotericin B and flucytosine [12], and one case of *Tinea nigra* failed to respond to treatment with systemic terbinafine [18].

Many characteristics of *H. werneckii* explain its adaptation and survival at hypersaline environments. Melanin was shown to protect the yeast against the effects of the high NaCl concentrations [19]. The genomic sequencing of a strain isolated from hypersaline water revealed a large genetic redundancy, probably due to a recent whole genome duplication, and the expansion of genes encoding metal cation transporters, traits that may be related to the halotolerant lifestyle [20]. *H. werneckii* is considered the most halotolerant fungus so far described and became a model organism for studying the mechanisms of extreme salt tolerance [21, 22]. The species is also highly tolerant against other environmental stresses [23].

The isolation of *H. werneckii* is reported from high-salinity-related environments and represents 70–80 % of the isolates from salterns [22]. Some unusual reports include isolation from a guinea pig [24], scuba diving equipment [25], and rock surfaces [23]. Chen et al. [26] isolated *H. werneckii* from a medicinal mangrove plant in China, but were not able to explain their ecological interaction. We report the isolation of four strains of *H. werneckii* from environmental substrates in Brazil and discuss their possible saprophytic role in the association with plants based on the enzymatic arsenal these strains possess for

decomposition of plant material. Potential enzymatic virulence factors and susceptibility to several antifungal agents were also evaluated because of the pathogenic nature of the fungus.

Materials and Methods

Fungal Isolation

Spartina alterniflora was collected in a salt marsh area at a small island situated on the estuary of Lagoa dos Patos (31°57'S/52°06'W, Brazil), in January 2013. The bromeliad *Portea leptantha* was collected in Serra da Barriga, located at the city of União dos Palmares (09°14'S/36°05'W, Brazil), in July 2013. The marine zoanthid *Palythoa caribaeorum* was collected at the low tide from Ponta Verde beach (9°39'S/35°41'W, Brazil), in July 2014. The samples were stored in plastic bags, taken to the laboratory and processed within 24 h.

Plant leaves and stems were cut into small pieces, placed inside Erlenmeyers flasks and washed with 30 mL 0.5 % Tween 20. The flasks were incubated for 30 min at 200 rpm. Decimal dilutions were inoculated in modified YM agar (1 % glucose, 0.3 % malt extract, 0.3 % yeast extract, 0.5 % peptone, 2 % agar, pH 4.0, supplemented with 0.04 % chloramphenicol and 0.01 % biphenyl) and incubated at 25 °C for 7 days. *P. caribaeorum* was washed with sterile seawater to remove the debris, cut into small pieces and pounded with a mortar and pestle. Decimal dilutions were inoculated in Wickerham's YM medium prepared with seawater, supplemented with 0.04 % chloramphenicol and incubated at 22 °C for up to 28 days. Representatives of each morphotype were purified in YEPD agar (2 % dextrose, 1 % peptone, 0.5 % yeast extract and 2 % agar). For conservation, the isolates were kept in vials with YEPD media covered with sterile mineral oil at 4 °C.

Molecular Identification

Genomic DNA was extracted according to [27]. Sequencing of the ITS region and D1/D2 domains of the LSU rRNA gene was performed using the universal primers ITS1/ITS4 and NL1/NL4, respectively. The amplification conditions were 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 15 s, 55 °C for 45 s, 72 °C for

M. Ramírez-Castrillón
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil

90 s and a final extension at 72 °C for 6 min. The PCR product was purified by Invisorb Fragment Clean Up (Invitek) and sequenced in the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The sequence was assembled and compared with sequences reported in GenBank using the BLAST algorithm.

Enzymatic Activity Assays

Fresh cultures of each isolate were obtained by cultivation in YEPD agar for 72 h at 25 °C and inoculated on the specific culture media for each enzyme to be assayed. Results were obtained after incubation at 25 °C for 7 days, and the precipitation zone (Pz) was calculated, unless specified otherwise. Pz was expressed as the ratio between the average diameter of the colony and the average diameter of the colony plus the degradation halo [28, 29]. All assays were performed in triplicate.

Amylase Activity

The isolates were inoculated in a medium with 0.2 % soluble starch, 0.67 % YNB (yeast nitrogen base) and 2 % agar. After incubation, a solution of iodine was added to the plates, and the positive result was visualized as clear halos around the enzyme-producing colonies [28].

Esterase Activity

The medium used was 2.5 % Tween 80, 1 % peptone, 0.5 % NaCl, 0.01 % CaCl₂, 0.1 % glucose and 2 % agar [30]. After incubation, the presence of whitish halos was observed surrounding the enzyme-producing colonies.

Lipase Activity

The medium consisted of 1 % tributyrin, 0.5 % peptone, 0.3 % yeast extract and 2 % agar [31]. The presence of degradation halos was observed around the enzyme-producing colonies.

Cellulase Activity

The medium was 0.5 % carboxymethylcellulose, 0.1 % NaNO₃, 0.1 % K₂HPO₄, 0.1 % KCl, 0.05 %

MgSO₄, 0.05 % yeast extract, 0.1 % glucose and 1.7 % agar [32]. The revelation was done by pouring 0.1 % red Congo solution onto the plates, followed by washing with 1 M NaCl. The cultures positive for cellulolytic activity presented a vivid orange halo around the colonies.

Pectinase Activity

The cells were grown in 0.67 % YNB medium containing 1 % pectin, 1 % glucose and 1.8 % agar (pH 7.0). The plates were flooded with 1 % hexadecyltrimethylammonium bromide, and the activity was indicated by a clear halo around the colony [33].

Protease Activity

Four different substrates were tested: casein, gelatin, albumin and keratin.

Caseinase: The medium consisted of 0.5 % casein, 0.5 % glucose, 0.67 % YNB and 2 % agar, pH 7.0, with casein preparation according to [34]. After incubation for 7 days at 25 °C, the presence of degradation halos around the producing colonies was observed by addition of HCl 1 N and incubation for 1 h.

Gelatinase: The methodology followed [35], with the medium consisting of 1.2 % gelatin, 0.4 % peptone, 0.1 % yeast extract and 1.5 % agar. For the visualization of the degradation halos, the cultures were washed with a saturated solution of (NH₄)₂SO₄.

Albuminase: The assay was carried out as described by [36]. The medium consisted of 1.17 % yeast carbon base, 0.2 % bovine serum albumin fraction V and 2.5 mL of Protovit in distilled water. The isolates were inoculated on the plates and incubated at 30 °C for 14 days. The plates were stained with 1.0 % black starch in 20 % acetic acid solution, and excess stain was washed away with 5 % acetic acid solution. *Candida albicans* ATCC 10231 was used as positive control.

Keratinase: The assay was standardized in medium containing keratin azure [37], and the enzymatic quantification was performed according to [38]. One hundred microliters of a yeast suspension containing 4.3 × 10⁶ CFU/mL was inoculated into liquid medium with 4 mg/mL of keratin azure and incubated under agitation at 30 °C for 14 days. The cultures were centrifuged, the supernatant was measured in a

spectrophotometer at $\lambda = 595$ nm, and the variation in absorbance of 0.01 compared to the blank (non-inoculated tube) was considered as 1 U of keratinase. A clinical isolate of the dermatophyte *Microsporum canis* was used as a positive control.

Urease Activity

The cultures were inoculated in tubes containing YCB urea agar (1.17 % YCB, 0.02 % acid fuchsin, 2.0 % agar and 2.0 % urea) and incubated at 37 °C for 72 h. The tubes were examined every hour for a change of color to white, indicating urease activity [39].

Phospholipase Activity

Phospholipase activity was determined according to [29]. The medium consisted of 1 % peptone, 2 % glucose, 5.73 % sodium chloride, 0.05 % calcium chloride and 2 % agar. The medium was autoclaved and then cooled to approximately 50 °C before the addition of sterile egg yolk at a final concentration of 4 %. The isolates were inoculated on the plates and incubated at 30 °C for 14 days. *C. albicans* ATCC 10231 was used as positive control.

DNase Activity

DNase activity was determined according to [40]. The assay was considered positive when a degradation halo was visualized around the colonies after the addition of concentrated HCl. The isolates were inoculated on the plates and incubated at 30 °C for 14 days. *Sporothrix schenckii* ATCC 201679 was utilized as positive control.

Laccase Activity

Laccase production was measured after cultivation of the strains on YEPD agar plates containing 0.01 % ABTS, previously sterilized using 0.45 μ m filter membranes and incubated for 3 weeks at 25 °C. Laccase production was visualized as a dark green halo around the yeast growth [41].

Salinity Tolerance Experiments

Yeast cell suspensions were spread on the surface of YEPD agar plates containing 0–30 % NaCl and

incubated for 3 weeks at 25 °C. A positive result was visualized as a turbid mat growth over the culture medium.

In Vitro Antifungal Activity

The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by the microdilution technique according to the M27-A3 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute [42]. The isolates were cultured on Sabouraud dextrose agar for 6 days at 30 °C, and the inocula were prepared by suspension of colonies in sterile saline solution (0.85 %). Cell concentration was adjusted so that the concentration range obtained in each well was 2.5×10^3 CFU/mL. The antifungal agents itraconazole, ketoconazole, voriconazole, posaconazole, tioconazole, terbinafine and amphotericin B were used in the final concentration range of 0.03–16 μ g/mL, while fluconazole was tested in the range 0.0125–64 μ g/mL. The incubation was at 30 °C for 7 days. The MICs were determined visually by comparison of the growth in the wells containing the drug with the drug-free control and were defined as the lowest drug concentration preventing any visible growth (100 % inhibition). These assays were performed in triplicate, and the quality control was performed with *Candida krusei* ATCC 6258.

Results

Strains BEL110 and BEL109 were isolated from *S. alterniflora* in southern Brazil, while strains BSB 29 and LMPV 100 were isolated in northern Brazil from the bromeliad *P. leptantha* and the marine zoanthid *P. caribaeorum*, respectively (Table 1). Most of the strains were able to express amylase, lipase, esterase, pectinase and/or cellulase, enzymes that recognize components of plant cells as substrates, but did not express albuminase, keratinase, phospholipase and DNase, whose substrates are animal-related (Table 2). Urease production was positive for all isolates. The strains BEL 109 and BEL 110 were strong producers of caseinase, while the other strains did not express this enzyme. Finally, gelatinase and laccase were produced only by BEL 110. All the strains were able to grow in Sabouraud agar plates containing up to 30 % NaCl. All isolates were resistant to fluconazole and presented high MIC for

Table 1 *Hortaea werneckii* strains, their isolation sources, geographic origin and GenBank access number for the sequences used for the molecular identification

Strain	Source	Geographic origin	GenBank access number
BEL 110	Macrophyte <i>Spartina alterniflora</i>	South Brazil	KR261084 ^a
BEL 109	Macrophyte <i>Spartina alterniflora</i>	South Brazil	KR261085 ^b
BSB 29	Bromeliad <i>Portea leptantha</i>	Northern Brazil	KR610426 ^a
LMPV 100	Marine zoanthid <i>Palythoa caribaeorum</i>	Northern Brazil	KR610427 ^a

^a D1/D2 26S rDNA^b ITS**Table 2** Enzymatic activity for *H. werneckii* strains from Brazilian environments

Enzyme tested	Precipitation zone (PZ) ^a or result			
	Bel 110	Bel 109	LMPV 100	BSB29
Proteases				
Caseinase	0.35	0.43	1	1
Gelatinase	0.63	1	1	1
Albuminase	1	1	1	1
Keratinase	Negative	Negative	Negative	Negative
Amylase	0.53	0.34	0.36	1
Cellulase	0.33	0.20	0.33	1
Pectinase	–	–	Negative	Positive
Lipase	0.34	0.33	0.47	0.32
Esterase	0.60	0.69	0.78	0.71
Phospholipase	1	1	1	1
Urease	Positive	Positive	Positive	Positive
DNase	1	1	1	1

^a PZ = 1(negative)/PZ < 1(positive)/PZ < 0.5(strongly positive)/ – not tested

amphotericin B, while they were susceptible to all the other antifungal agents tested (Table 3).

Discussion

Although the relation of *H. werneckii* with high-salinity habitats is well established, to our knowledge the substrate where this fungus is found in the environment is not elucidated yet. We report the isolation of two strains of *H. werneckii* from the leaves of the macrophyte *S. alterniflora*: one strain from the leaves of a bromeliad and another one from a marine zoanthid. These strains were able to express enzymes that recognize components of plant cells as substrates. In fact, three of them were strong producers of cellulase. All the strains produced

urease, but none was able to express phospholipase, DNase, albuminase or keratinase, enzymes commonly regarded as potential virulence factors for human infection. The non-production of albuminase by *H. werneckii* was reported by Mok [43], and the non-production of keratinase was observed by Göttlich et al. [44]. The latter authors suggested that skin infection by *H. werneckii* cannot be supported by keratin, since this fungus is unable to degrade this compound. The urease, phospholipase and DNase activities, to our knowledge, have not been tested before in clinical or environmental samples of *H. werneckii*.

In view of the above-mentioned enzymatic arsenal expressed by *H. werneckii*, we suggest that the fungus is more adapted to the degradation of plant constituents than of animal-related substrates. We propose

Table 3 Antifungal susceptibility of *Hortaea werneckii* strains from Brazilian environments

Antifungal agent	<i>Spartina alterniflora</i>		<i>Palythoa caribaeorum</i> LMPV 100	<i>Portea leptantha</i> BSB29	Geometric median (min–max)
	Bel 110 MIC (µg/mL)	Bel 109			
Tioconazole	0.125	0.03	0.125	0.06	0.073 (0.03–0.125)
Posaconazole	0.125	0.062	0.125	0.062	0.088 (0.062–0.125)
Ketoconazole	0.25	0.062	0.25	0.125	0.148 (0.062–0.25)
Voriconazole	0.25	0.062	0.25	0.25	0.176 (0.062–0.25)
Terbinafine	0.5	0.125	0.125	0.125	0.177 (0.125–0.5)
Itraconazole	0.5	0.125	0.25	0.25	0.25 (0.125–0.5)
Amphotericin B	2	0.5	4	1	2 (0.5–4)
Fluconazole	>64	16	>64	>64	>64 (16–>64)

MIC Minimal inhibitory concentration

that the primary substrate associated with *H. werneckii* is plant-related, in special in saline environments, where the fungus may live as a saprophyte and decomposer. Infection of animal-associated substrates would be secondary, with the fungus acting as an opportunistic animal pathogen. Isolation of *H. werneckii* from plant surfaces in mangroves has already been reported [26].

Survival at hypersaline conditions and production of enzymes related to melanin production were also investigated due to the halotolerant nature of this black yeast. We did not observe any growth difference between the strains in the halotolerance tests, and their behavior was as expected for the species [21, 22]. Although all the strains formed black colonies, we observed laccase production only for BEL 110. We believe the methodology we applied was not sensitive enough to detect the low amounts of laccase possibly produced by the other strains. More sensitive methodologies should be applied before concluding that these strains do not produce laccase.

Due to the potential of *H. werneckii* to cause human infections, the susceptibility to several antifungal agents for human use was also evaluated in the present study. There are no such reports for environmental isolates of this fungus; however, studies concerning the in vitro antifungal activity of clinical isolates were found [12, 14, 45]. The isolates were sensitive to itraconazole [12, 14], ketoconazole [12, 45] and voriconazole [12], as we found for our isolates. Gupta et al. [14] found resistance to fluconazole, and Ng et al. [12] reported that two isolates from patients with acute

myeloid leukemia were sensitive to fluconazole and resistant to amphotericin B. In our study, the isolates were resistant to fluconazole and presented low sensitivity to amphotericin B, showing that resistance to these antifungal agents can be found in environmental isolates of *H. werneckii*; therefore, clinical administration of these agents should be viewed with care. Our environmental isolates were sensitive to posaconazole, terbinafine and tioconazole, which were not tested in vitro in previous studies, although terbinafine is used in the clinical practice [17].

Although *Tinea nigra* is the main disease associated with *H. werneckii*, and most cases resolve with keratinolytic agents [6, 7] or with topical antifungal agents [13, 15, 18, 46, 47], there are reports of immunocompromised patients with more severe infections [12, 48]. Therefore, in vitro antifungal susceptibility assays are important to find the ideal treatment for these severe infection conditions in view of the resistance profiles reported in the literature and in the present study.

Acknowledgments The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—process numbers 475378/2013-0 and 408718/2013-7) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) for the financial support and scholarships.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare they have no conflict of interest.

References

- Negróni R. Historical aspects of dermatomycoses. *Clin Dermatol.* 2010;28:125–32.
- Lima EO, Pontes ZBVS, Oliveira NMC, Carvalho MFP, Guerra MFL. *Tinea nigra*: relato de 11 casos diagnosticados em João Pessoa - Paraíba - Brasil. *Rev Patol Trop.* 2001;30:177–82.
- Nogueira NQ, Nahn-Júnior EP. *Tinea nigra* na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. *Rev Cient Fac Med Campos.* 2012;7:20–4.
- Rossetto AL, Corrêa PR, Cruz RCB, Pereira EF, Haddad-Júnior V. A case of *Tinea nigra* associated to a bite from a European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*, Leporidae): the role of dermoscopy in diagnosis. *An Bras Dermatol.* 2014;89:165–6.
- Rossetto AL, Cruz RCB, Haddad-Júnior V. *Tinea nigra* presenting speckled or “salt and pepper” pattern. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;90:981.
- Cabrera R, Sabatini N, Urrutia M, Sepúlveda R. *Tiña negra (tinea nigra)*: comunicación de un caso alóctono en Chile. *Rev Chil Infectol.* 2013;30:90–3.
- Bonifaz A, Badali H, de Hoog GS, Cruz M, Araiza J, Cruz MA, Fierro L, Ponce RM. *Tinea nigra* by *Hortaea werneckii*, a report of 22 cases from Mexico. *Stud Mycol.* 2008;61:77–82.
- Perez C, Colella MT, Olaizola C, de Capriles CH, Magaldi S, Mata-Essayag S. *Tinea nigra*: report of twelve cases in Venezuela. *Mycopathologia.* 2005;160:235–8.
- Khan A, McIver FA. A case of *tinea nigra palmaris* from Charleston, South Carolina. *J S C Med Assoc.* 1980;76:464–5.
- Sarangi G, Dash D, Chayani N, Patjoshi SK, Jena S. Bilateral *Tinea Nigra* of palm: a rare case report from Eastern India. *Indian J Med Microbiol.* 2014;32:86–8.
- Pegas JR, Criado PR, Lucena SK, de Oliveira MA. *Tinea nigra*: report of two cases in infants. *Pediatr Dermatol.* 2003;20:315–7.
- Ng KP, Soo-Hoo TS, Na SL, Tay ST, Hamimah H, Lim PC, Chong PP, Seow HF, Chavez AJ, Messer SA. The mycological and molecular study of *Hortaea werneckii* isolated from blood and splenic abscess. *Mycopathologia.* 2005;159:495–500.
- Burke WA. *Tinea nigra*: treatment with topical ketoconazole. *Cutis.* 1993;52:209–11.
- Gupta G, Burden AD, Shankland GS, Fallowfield ME, Richardson MD. *Tinea nigra* secondary to *Exophiala werneckii* responding to itraconazole. *Br J Dermatol.* 1997;137:483–4.
- Marks JG Jr, King RD, Davis BM. Treatment of *tinea nigra palmaris* with miconazole. *Arch Dermatol.* 1980;116:321–2.
- Rossetto AL, Cruz RC. *Tinea nigra*: successful treatment with topical butenafine. *An Bras Dermatol.* 2012;87:939–41.
- Rossetto AL, Cruz RCB, Haddad-Júnior V. Double-blind study with topical isconazole and terbinafine for the treatment of one patient with bilateral *Tinea nigra plantaris* and suggestions for new differential diagnosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2013;55:125–8.
- Shannon PL, Ramos-Caro FA, Cosgrove BF, Flowers FP. Treatment of *tinea nigra* with terbinafine. *Cutis.* 1999;64:199–201.
- Kejzar A, Gobec S, Plemenitas A, Lenassi M. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biol.* 2013;117:368–79.
- Lenassi M, Gostinčar C, Jackman S, Turk M, Sadowski I, Nislow C, Jones S, Birol I, Cimerman NG, Plemenitas A. Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by *de novo* genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. *PLoS One.* 2013;8:e71328.
- Gostinčar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A. Fungal adaptation to extremely high salt concentrations. *Adv Appl Microbiol.* 2011;77:71–96.
- Zajc J, Polona Zalar P, Plemenitas A, Gunde-Cimerman N. The mycobiota of the salterns. *Progr Mol Subcel Biol.* 2012;53:133–58.
- Sterflinger K. Temperature and NaCl-tolerance of rock-inhabiting meristematic fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;74:271–81.
- Sharmin S, Haritani K, Tanaka R, Abliz P, Takizawa K, Sano A, Fukushima K, Nishimura K, Makoto Miyaji M. The First Isolation of *Hortaea werneckii* from a Household Guinea Pig. *Jpn J Med Mycol.* 2002;43:175–80.
- Cabañes FJ, Bragulat MR, Castellá G. *Hortaea werneckii* isolated from silicone scuba diving equipment in Spain. *Med Mycol.* 2012;50:852–7.
- Chen J, Xing XK, Zhang LC, Xing YM, Guo SX. Identification of *Hortaea werneckii* isolated from mangrove plant *Aegiceras comiculatum* based on morphology and rDNA sequences. *Mycopathologia.* 2012;174:457–66.
- Osorio-Cadavid E, Ramírez M, López WA, Mambuscay LA. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev Colomb Biotechnol.* 2009;11:125–31.
- Hankin L, Anagnostakis SL. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia.* 1975;67:597–607.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982;20:7–14.
- Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4626–8.
- Atlas RM, Parks LC. Handbook of microbiological media. London: CRC Press; 1993.
- Baptista JC, Machado MA, Home RA, Torres OS, Vojnov AA, Amaral AM. Mutation in the *xpsD* gene of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* affects cellulose degradation and virulence. *Genet Mol Biol.* 2010;33:146–53.
- Buzzini P, Martini A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol.* 2002;93:1020–5.
- Montville TJ. Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45:200–4.
- Smith HL, Goodner K. Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *J Bacteriol.* 1958;76:662–5.

36. Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982;20:233–44.
37. Scott JA, Untereiner WA. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Med Mycol*. 2004;42:239–46.
38. Giudice MC, Reis-Menezes AA, Rittner GMG, Mota AJ, Gambale W. Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. *Braz J Microbiol*. 2012;43:895–902.
39. Maldonade IR, Scamparini ARP, Rodriguez-Amaya DB. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region Brazil. *Braz J Microbiol*. 2007;38:65–70.
40. Lopez-Martínez R, Manzano GP, Mier T, Mendez TLJ, Hemadéz HF. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Rev Latinoam Microbiol*. 1994;36:17–20.
41. Jarosz-Wilkolazka A, Malarczyk E, Pirszel J, Skowroński T, Leonowicz A. Uptake of cadmium ions in white-rot fungus *Trametes versicolor*: effect of cd (II) ions on the activity of laccase. *Cell Biol Int*. 2002;26:605–13.
42. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Approved Standard M27-A3; 2008.
43. Mok WJ. Nature and identification of *Exophiala werneckii*. *J Clin Microbiol*. 1982;16:976–8.
44. Göttlich E, de Hoog GS, Yoshida S, Takeo K, Nishimura K, Miyaji M. Cell-surface hydrophobicity and lipolysis as essential factors in human tinea nigra. *Mycoses*. 1995;38:489–94.
45. Shadomy S, Wang H, Shadomy HJ. Further in vitro studies with oxiconazole nitrate. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1988;9:231–7.
46. Uezato H, Gushi M, Hagiwara K, Kayo S, Hosokawa A, Nonaka S. A case of tinea nigra palmaris in Okinawa, Japan. *J Dermatol*. 2006;33:23–9.
47. Rosen T, Lingappan A. Rapid treatment of tinea nigra palmaris with ciclopirox olamine gel 0.77 %. *Skinmed*. 2006;5:201–3.
48. Huber CE, La Berge T, Schwiesow T, Carroll K, Bemstein PS, Mamalis N. *Exophiala werneckii* endophthalmitis following cataract surgery in an immunocompetent individual. *Ophthalmic Surg Lasers*. 2000;31:417–22.

Parte 2 – Artigo Científico

Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs

Danielle M. Pagani^{1,2}, Daiane Heidrich^{3,4}, Gustavo V. B. Paulino^{1,2}, Karine de O. Alves³, Paula T. Dalbem³,
Caroline F. de Oliveira³, Zélia M. M. Andrade³, Carolini Silva³, Monica D. Correia⁵, Maria Lúcia
Scroferneker^{3,4}, Patricia Valente³, Melissa Fontes Landell^{1*}

¹Setor de Genética, ICBS, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, CEP: 57072-900, Maceió – AL, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica e Conservação nos Trópicos, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, CEP: 57072-900, Maceió – AL, Brazil.

³Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500 – CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil.

⁴Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 – CEP: 90035-003, Porto Alegre – RS, Brazil.

⁵Setor de Comunidades Bentonicas, ICBS/LABMAR, Universidade Federal de Alagoas. Rua Aristeu de Andrade, 452 – 2º andar, Farol, CEP: 57051.090, Maceió – AL, Brazil.

*Correspondence: Melissa Fontes Landell, Setor de Genética - ICBS, Universidade Federal de Alagoas, Campus A. C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, CEP: 57072-900, Maceió - AL, Brazil, Tel. (+55) 82-3214-1995 (e-mail: melissa.landell@gmail.com)

Compliance with Ethical Standards

Ethical approval: not applicable

Informed consent: not applicable

Abstract

In this research, we reported on eight *Candida haemulonii* and four *Cutaneotrichosporon dermatis* strains isolated from three marine cnidarian Zoanthidae species (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus sociatus*) collected on the Brazilian reefs. We confirmed their identification by sequencing of the D1/D2 domain LSU rDNA and ITS region. We tested isolates for their capacity to grow in media with increasing

concentration of NaCl, capacity to grow in different temperatures, enzymatic activity and antifungal susceptibility. For *C. haemulonii* species, all strains were strong producer of gelatinase, esterase and albuminase and they were either able to express lipase, phospholipase and keratinase, but not express urease and DNase. The strains grow up at 37 °C but not in 39 °C and, except for LMS40, all of them grow up in 10% NaCl medium. All isolates can be considered resistant to all antifungals tested, with exception for ketoconazole and tioconazole (MIC=2µg/mL). For *C. dermatis*, all strains could grow up at 39 °C and could not express phospholipase, keratinase or gelatinase. However, all were capable to express urease, lipase and esterase. Three of four strains grew in NaCl 10% medium, but none grew in NaCl 30% medium. The strains showed high values of minimal inhibitory concentration (MIC). LMPV90 was considered resistant to tioconazole, terbinafine, fluconazole, and posaconazole and LMS 38 was resistant to all antifungal agents tested. We discuss the characterization of *C. haemulonii* and *C. dermatis* as possible emerging pathogen due to the animal-related enzymatic arsenal and its antifungal resistance.

Keywords: *Candida haemulonii*, *Cutaneotrichosporon dermatis*, invertebrates, antifungal susceptibility, enzyme production.

Introduction

Candida is an ascomycetous yeast genus and some species are recognized as one of the most pathogenic opportunistic yeast (Diezmann et al. 2004). *Candida haemulonii* was described for the first time in 1962 from a marine fish gut and was called *Torullopsis haemulonii* (van Uden and Kolipinski 1962; Cendejas-Bueno et al. 2012). Besides fish, *C. haemulonii* was isolated from cassava roots (Ferreira et al. 2010) and used to be classified in a complex: *C. haemulonii* group I and *C. haemulonii* group II. But (Cendejas-Bueno et al. 2012) identify *C. haemulonii* II as a new species: *Candida duobushaemulonii* and a new variety in *C. haemulonii* I: *C. haemulonii* var. *vulnera*. *C. haemulonii* was reported infecting a patient for the first time in 1984. In Brazil's hospital was in 2012 the first record to the country in a blood stream infection from a 26-year-old immunosuppressed woman (de Almeida et al. 2012). This yeast species was found causing osteitis in a 37-year-old man and other blood stream infection and neonate and seniors fungemia (Al-Sweih et al. 2009; Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; Kim et al. 2011). In the Al-Sweih et al. (Al-Sweih et al. 2009), *C. haemulonii* was the third most isolated yeast from *Candida* genus from blood culture of neonates.

Deaths caused by candidiasis in hospitals worldwide are identified as prevalent fungal infections. Since most of the reported cases were caused by *Candida albicans*, but the number of infections by other species of the genus is growing (Johnson 2009). *C. haemulonii* is still classified as rare species causing infections, but classified as an emerging pathogen and this also due to resistance to antifungal Amphotericin B, for example (Johnson 2009; Kim et al. 2011; Merseguel et al. 2015).

Trichosporon is a basidiomycetous yeast-like genus, reported as medically relevant in opportunistic infections. It is widespread in the environment and can be found in tropical and temperate areas (Colombo et al. 2011). In humans, it can be found in the gastrointestinal tract and transiently colonizing respiratory tracts and skin (Hashino et al. 2013; Iturrieta-González et al. 2014).

Trichosporon spp. and *Cutaneotrichosporon* comb. nov. can be commonly isolated from environmental samples such as water, soil and decomposing matter (Colombo et al. 2011; Iturrieta-González et al. 2014). However, *Cutaneotrichosporon dermatis* (formerly *Trichosporon dermatis*) was isolated from the environment for the first time in hydrothermal fields (Gadanho and Sampaio 2005) and the second time from deep-sea sediments of the

Pacific Ocean in 2014 (Xu et al. 2014). This species was transferred from *Cryptococcus humicola* complex to *Trichosporon* genus as described by Sugita and colleagues (Sugita et al. 2001) and to *Cutaneotrichosporon* by Liu et al. (Liu et al. 2015). Since then, the species has been reported as an infectious yeast in skin, blood, and nails. It has also been reported as summer-type hypersensitivity pneumonitis. Invasive *Trichosporon* and *Cutaneotrichosporon* infections have been increasingly identified during the past 30 years. Most cases occur in patients with hematological diseases, particularly those with acute leukemia (Miceli et al. 2011). It is the second most common cause of fungal infections in these patients, and mortality rate of patients with hematological diseases and *Trichosporon* and *Cutaneotrichosporon* remains at 11%, despite antifungal therapy (Polvi et al. 2015). Several case reports around the world described its pathogenicity (Fan et al. 2011; Iturrieta-González et al. 2014; Taverna et al. 2014). For example, a patient developed fatal disseminated *C. dermatis* infection after cord blood transplant with aplasia (Fekkar et al. 2009). There is another case report with a 47-year-old woman with Burkitt's leukemia diagnosed with fungemia caused by *C. dermatis*. In this case, the administration of voriconazole at standard dose was ineffective (Hashino et al. 2013).

In this research we reported the isolation of eight strains of *C. haemulonii* and four strains of *C. dermatis* from marine soft coral in northeastern Brazil and discussed their characterization as possible emerging pathogen. We also tested potential enzymatic virulence factors and susceptibility to several antifungal agents because of the pathogenic nature of this species.

Materials and methods

Yeasts isolation

We isolated the yeast strains from three marine zoanthids species (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus sociatus*). Samples were collected at Ponta Verde coral reef (situated at the urban central coast) and at Sereia's sandstone reef (located on north coast), both on the Maceio city, Alagoas state, northeastern Brazil.

We washed the marine soft corals samples with sterile seawater to remove the debris, cut them in small pieces and pounded them with a mortar and pestle. We inoculated decimal dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , and 10^{-4}) in Wickerham's YM medium with seawater, supplemented with 0.04% chloramphenicol, and incubated at 22 °C for up to 28 days.

Representatives of each colonial morphotype were purified twice in YEPD medium (2% dextrose, 1% peptone, 0.5% yeast extract and 2% agar). For conservation, the isolates were kept in vials with YEPD media covered with sterile mineral oil at 4 °C.

Molecular identification

For molecular identification, we grew the strains aerobically in Sabouraud broth at 22 °C. Centrifugation in 8000 x g for five minutes were done to recover the cells, then we washed the pellet with sterile distilled water and repeat the above step of centrifugation. We add 500 µL of buffer lysis (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2% SDS pH 8,0) and incubated at 65°C for one hour and immediately 200 µL potassium acetate (5 M, pH 4,8) was added to the tubes, then placed in an ice bath for 30 minutes. After we centrifuged the samples at 14100 x g for 5 minutes. The supernatant was transferred to another tube and centrifuged again. The supernatant was transferred to another tube. A volume of 600 µL absolute isopropanol was add to the supernatant and incubated at -20 °C for 15 minutes. After a centrifugation at 14100 x g for 20 minutes, the DNA was collected by centrifugation at 13,000 × g for 15 min and washed with 70% ethanol. The supernatant was discarded and after drying and DNA was resuspended in TE buffer (Tris-EDTA pH 7,4) and stored at -20° C. To amplify divergent D1/D2 domain of LSU rRNA gene and ITS region, universal primers NL1, NL4 and ITS1, ITS4 were used (Kurtzman and Robnett 1998), and amplification conditions were: 94 °C for 5 min, 35 cycles at 94 °C for 15 s, 56 °C for 45 s, and 72 °C for 90 s, and a final extension at 72 °C for 6 min. Sequencing was performed as described by Péter et al. (Péter et al. 2009) in the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Obtained sequences were compared with the BLAST tool with those deposited at the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul et al. 1990).

Growth at 37 °C and 39 °C

Tests of growth at 37 °C and 39 °C for five days were performed in test tubes containing YEPD broth in triplicate. To monitor turbidity, Wickerham's card was used.

Enzymatic activity assays

Standard suspensions with $1-5 \times 10^6$ cells/mL of each isolate were obtained by cultivation in Sabouraud dextrose agar for 48 h at 25 °C and 10 µL of suspensions were inoculated on the specific culture media for each enzyme to be assayed (amylase, cellulase, esterase, lipase, pectinase, albuminase, caseinase, gelatinase, phospholipase, urease and DNase). Results were obtained after incubation at 25 °C for 7 days, and the precipitation zone (Pz) was calculated, unless specified otherwise. Pz was expressed as the ratio between the average diameter of the colony and the average diameter of the colony plus the degradation halo (Hankin and Anagnostakis 1975; Buzzini and Martini 2002). The amylase, cellulase and pectinase activities were performed according to (Buzzini and Martini 2002) and the isolates were inoculated in a specific medium to each enzyme. Amylase plates were revealed with a solution of iodine, and clear halos indicated a positive result. To reveal the positive results to cellulase production, an aliquot of 0.1% red Congo solution were add to the plates and washed with 1 M NaCl. Pectinase positive results were observed by producing a clear halo around the colony when the plates were flooded with 1% hexadecyltrimethylammonium bromid.

For esterase activity, the followed protocol was established by (Slifkin 2000). Lipase activity, after incubation, positive results were observed in presence of degradation halo around the enzyme producing colonies (Atlas and Parks 1993). To test the DNase activity, the assay was determined according to Lopez-Martinez et al. (López-Martínez et al. 1994). When a degradation halo was visualized around the colonies after the addition of 37% HCl, the assay was considered positive. The *Sporothrix schreckii* ATCC 201679 was utilized as positive control.

To test the phospholipase activity, the assay was determined according to Price et al. (Price et al. 1982). The medium consisted of 5.73% sodium chloride, 0.05% calcium chloride, 1% peptone, 2% glucose and 2% agar. The medium was autoclaved and then cooled to approximately 50 °C before the addition of sterile egg yolk at a final concentration of 4%. The *C. albicans* strain ATCC 10231 was used as positive control. For test the urease activity, the cultures were inoculated in tubes containing Yeast Carbon Base (YCB) urea agar and incubated at 37 °C for 72 h. The tubes were examined every day during three days for a change of color to white (Hagler and Mendonça-Hagler 1991). *Cryptococcus neoformans* ATCC 24066 was used as positive control and *Candida albicans* ATCC 18804 was used as negative control.

To test protease activity, four substrates were tested. Albuminase followed Rüchel et al. (Rüchel et al. 1982) and the medium consisted of 0.2% bovine serum albumin fraction V, 1.17% YCB, and 2.5 mL of Protovit in distilled water. We inoculated the isolates on the plates, and incubated them at 30 °C for 7 days. The plates were stained with 1.0% black starch in 20% acetic acid solution, and we washed excess stain away 5% acetic acid solution. *Candida albicans* ATCC 10231 was used as positive control. The medium for the casein degradation assay consisted of 0.5% casein, 0.5% glucose, 0.67% YNB and 2% agar, pH 7.0, according to Montville (Montville 1983). The presence of degradation halos around the producing colonies was observed by addition of 1N HCl. For gelatinase activity, the methodology followed Smith and Goodner (Smith and Goodner 1958), with the medium consisting of 1.2% gelatin, 0.4% peptone, 0.1% yeast extract and 1.5% agar. The cultures were washed with a saturated solution of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ for the visualization of the degradation halos. The *Nocardia caviae* species was used as positive control. For keratinase activity, the methodology followed Scott and Untereiner (Scott and Untereiner 2004). The enzymatic quantification was performed according to Giudice et al. (Giudice et al. 2012), a suspension containing $1-5 \times 10^6$ CFU/mL was inoculated into liquid basal medium with 4 mg/mL of keratin azure and incubated under agitation at 30 °C for 14 days in triplicate. The cultures were centrifuged, the supernatant measured in a spectrophotometer at $\lambda = 595\text{nm}$, and the variation in absorbance of 0.01 compared to the blank (non-inoculated tube) was considered 1 U of keratinase. A clinical isolate of *Microsporum canis* was used as a positive control.

Salinity Tolerance Experiments

The YEPD agar medium containing 10% and 30% NaCl was used and yeasts cell suspensions were spread on the surface. The plates were incubated for 3 weeks at 25 °C (Formoso et al. 2015).

In vitro antifungal activity

The microdilution technique was used to determine minimal inhibitory concentrations (MICs), according to the M27-A3 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute ((CLSI) 2008). The isolates were cultured on Sabouraud dextrose agar at 35°C for 48h. The inoculum was prepared by suspension of colonies in saline solution (0.85%) and the number of cells was measured with a hemocytometer and they were diluted until to obtain 5×10^2 to 2.5×10^3 CFU/mL in each well. Fluconazole was tested in the range 0.125-64 µg/mL, while itraconazole, ketoconazole, voriconazole, posaconazole, tioconazole, terbinafine, and amphotericin B were used in the final

concentration range of 0.03–16 µg/mL. The incubation was at 35°C for 48 hours and the MICs were determined as the minimal antifungal concentration that no visible growth (100% of inhibition) were observed when compared with the growth control (wells without antifungal agents). After reading the MICs, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. We transferred a 50µl aliquot from wells with no observable growth to wells with 800 µL of Sabouraud dextrose broth and incubated for 7 days at 30°C. MFC was defined as the minimum concentration in which no fungal growth occurred (Stopiglia et al. 2011). These assays were performed in triplicate and the quality control was performed with *Candida krusei* ATCC 6258.

Results

We isolated three strains of *C. haemulonii* from *P. variabilis* in September/2014, one in March/2015, three in May/2015 and one strain from *Z. sociatus* in May/2015 all the isolates are from Sereia's sandstone reef (9°33'54"S, 35°38'39"W) (Table 1).

We also isolated two strains of *C. dermatis* from *P. caribaeorum* in May/2014, and *Z. sociatus* in September/2014 from Ponta Verde coral reef (9°39'59.15"S, 35°41'46.11"W). The other two strains came from *P. caribaeorum* in March/2015, and *P. variabilis* in September/2014, which samples were collected on Sereia's sandstone reef. We deposited all sequences in the GenBank database (Table 1).

For *C. haemulonii*, all strains were strong producer of esterase, gelatinase and albuminase and either were able to express lipase, phospholipase and keratinase, and not express urease and DNase (Table 2). Only LMS 40 do not grow up in a 10% NaCl medium and all of them were grow up at 37°C. All isolates can be considered resistant to all antifungals tested, with exception for ketoconazole and tioconazole (MIC=2µg/mL) (Table 3).

For *C. dermatis*, all strains could express urease, esterase, lipase, and grow up at 39 °C (Table 2), but did not express amylase, gelatinase, keratinase, pectinase, or phospholipase. Only strain LMS 02 could produce caseinase. The strains LMS 38, LMPV 90 and LMPV 109 grew in NaCl 10% medium, but not in NaCl 30% medium. Strains LMS 38 and LMPV 109 produced DNase. LMS 02 and LMPV 109 had moderate production of albuminase. The results from MICs and MFCs tests for the antifungal susceptibility are in Table 3. The geometric median MICs of all strains tested were, in crescent order: ketoconazole, voriconazole, itraconazole, tioconazole, amphotericin B, terbinafine,

posaconazole and fluconazole. The strains LMPV 90 and LMS 38 were less susceptible to almost all antifungals agents with exceptions for itraconazole and amphotericin B, for which all strains presented similar MICs. Comparing MICs of LMPV 90 with LMS 38, LMS 38 was less susceptible to ketoconazole and voriconazole. The MFCs of all antifungal agents were very high. The lower MFCs were amphotericin B with geometric median equal to 4.0 (range 2.0 to 8.0).

Discussion

Knowledge about pathogenic microorganisms is based on the need for diagnosis and treatment of infectious pathogens in a specific region. Therefore, pathogens are emerging without supervision in poor locations or developing countries (Dávila et al. 2004; Miceli et al. 2011). Systemic fungal infections are generally limited to immunocompromised individuals and detecting new fungal emerging species is a slow process (Angelakis and Raoult 2014; Polvi et al. 2015). The colonization by fungi involves adherence, colonization and penetration in these steps and the production of hydrolytic enzymes presents a great importance. The production of hydrolytic enzymes plays a central role in infectious processes and the production of proteases and phospholipases are important virulence factors (Ramos et al. 2015). There are no studies with environmental isolates of *C. haemulonii* and *C. dermatis*, only research with clinical isolates. Furthermore, sensitivity to antifungal drugs within the different species of the *Cutaneotrichosporon* genus has still not attracted much investigation (Chagas-Neto et al. 2009) in contrast with *Candida* genus which has a great medical importance and the research has increasing (Hobson 2003).

The isolates in this study display strong Pz values in enzymatic virulence factors, especially for lipase and esterase production. Half of the *C. dermatis* and all *C. haemulonii* strains were capable to express albuminase. These enzymes are animal-related substrates commonly regarded as potential virulence factors for human infections (Ebert and Bull 2003). As well as work done by (Ramos et al. 2015) on clinical isolates, all of our isolates of *C. haemulonii* are strong producers of proteases and were considered weakly positive for the production of phospholipase. Studies of virulence and disease transmission have some interesting aspects. The relationships between transmission and adaptation stages of transmitting movement between the host and colonization are due to exposure to the possible pathogen as a result of environmental, ecological, behavioral, and evolutionary factors. This is the case for diseases

caused by environmental microorganisms and emerging infections. The high virulence (a strong enzymatic arsenal) is an indicative of ancestor pool characteristic in new host association (Chagas-Neto et al. 2008). Although some substrates have not showed enzymatic activity, an organism's virulence is not always expressed. Yeasts has the capacity to change, for example, his metabolic pathways, when environmental conditions are not propitious (Hoskisson and Trevors 2010) and one example it is *C. haemulonii* and *C. dermatis* competence to grow up at 37 °C and 39 °C, respectively. Certain diseases can leave patients asymptomatic or with severe acute symptoms, depending on individual hosts and niches (Chagas-Neto et al. 2008; Hoskisson and Trevors 2010).

Growth at high temperatures is essential to pathogenesis (Polvi et al. 2015). Many of the necessary genes for growth at elevated temperatures are virulence genes and vital to the microorganism. As well as work done by (Ramos et al. 2015) on clinical isolates all of our isolates of *C. haemulonii* are strong producers of proteases and were considered negative for the production of phospholipase. Studies of virulence and disease transmission have some interesting aspects. The relationships between transmission and adaptation stages of transmitting movement between the host and colonization are due to exposure to the possible pathogen as a result of environmental, ecological, behavioral, and evolutionary factors.

There are no study that tested the antifungal activity from environmental strains of *C. haemulonii*, but there are some studies with this yeast causing human infection, mainly fungemia (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Xess et al. 2007; Kim et al. 2009; Kim et al. 2011; de Almeida et al. 2012; Oberoi et al. 2012; Shin et al. 2012; Silva et al. 2015). Other cited cases were in ear (Kim et al. 2009), bone (Crouzet et al. 2011), peritoneum (Yuvaraj et al. 2014), skin (Ramos et al. 2015) and isolation of catheter (Giusiano et al. 2006). *C. haemulonii* of clinical isolation is being related an important resistant to antifungal agents, mainly to amphotericin B and azoles. Echinocandins had lowers MICs than other classes of antifungals in some studies (Kim et al. 2009; de Almeida et al. 2012) but resistance to theirs already has been cited (Cendejas-Bueno et al. 2012; Muro et al. 2012) and the treatment of the infection with this *Candida* species is being considered a therapeutic problem. The results of this study are similar to the results found by some authors that evaluated clinical strains, and both origins of isolation can be considered resistant to: amphotericin B (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; de Almeida et al. 2012; Shin et al. 2012; Melhem et al. 2013; Ramos et al. 2015; Silva et al. 2015); fluconazole (Rodero et al. 2002; Khan et

al. 2007; Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; Cendejas-Bueno et al. 2012; Muro et al. 2012; Oberoi et al. 2012; Melhem et al. 2013; Ramos et al. 2015); itraconazole (Crouzet et al. 2011; Cendejas-Bueno et al. 2012; Oberoi et al. 2012); voriconazole and posaconazole (Cendejas-Bueno et al. 2012). Some studies showed clinical isolates more sensitive, compared with our isolates, to: amphotericin B (Cendejas-Bueno et al. 2012; Muro et al. 2012); fluconazole (de Almeida et al. 2012; Silva et al. 2015); itraconazole (Rodero et al. 2002; Khan et al. 2007; Kim et al. 2009; de Almeida et al. 2012); voriconazole (Kim et al. 2009; Crouzet et al. 2011; de Almeida et al. 2012; Oberoi et al. 2012; Melhem et al. 2013; Silva et al. 2015); posaconazole (de Almeida et al. 2012). The environmental strains of *C. haemulonii* were considered resistant to terbinafine and there is no study testing this antifungal against this yeast. However, ketoconazole and tioconazole showed lower MICs, compared with the other antifungal MICs obtained, for the environmental strains and also no study testing these antifungals in the literature was found.

The results of MFCs were high and only one study evaluating MFC was found in the literature testing amphotericin B against *C. haemulonii* (Rodero et al. 2002), the result was similar to results found in this study (MFC > 8 µg/mL). The results of MICs and MFCs of this study indicated that environmental strains of *C. haemulonii* can be multiresistant before infection to the human. Therefore, the right identification of the *Candida* species and its evaluation of sensitive to antifungals are necessary to obtain the cure of the infection caused by this yeast.

To *C. dermatis* strains, MICs of ketoconazole, voriconazole, itraconazole, posaconazole, and fluconazole obtained for LMPV 109 and LMS 02 (the two strains more susceptible) are similar to the MICs showed by other studies with clinical isolates (Chagas-Neto et al. 2009; Arabatzis et al. 2014; Iturrieta-González et al. 2014; Taverna et al. 2014). The MICs of amphotericin B for LMS 02 (Iturrieta-González et al. 2014) and terbinafine for LMPV 109 (Taverna et al. 2014) was also similar to other studies. However, LMPV 90 and LMS 38 were less susceptible to all antifungals tested comparing to *C. dermatis* clinical isolates analyzed in the literature (Chagas-Neto et al. 2009; Fan et al. 2011; Arabatzis et al. 2014; Iturrieta-González et al. 2014; Taverna et al. 2014). For the strain LMPV 90, the MICs obtained of tioconazole, terbinafine, fluconazole and posaconazole were high and we can consider this isolate resistant to these antifungals, although there is no standardization of sensitivity to antifungal in genus *Cutaneotrichosporon*. Accordingly, the strain LMS 38 can be considered resistant to all antifungal agents tested. The

high MFCs can indicate the treatment could be difficult for immunodeficient patients that may acquire infections from these environmental samples.

Thus, our study showed that environmental samples from *C. haemulonii* and *C. dermatis* may exhibit potential to cause an infection, due their capacity to product some important enzymes related to human tissues and they can grow in near human body' temperature. Therefore, this study showed that these yeasts can be resistance to antifungal agents used in clinical practice already in their environmental habitat and, due to this, infection caused by these yeasts must be cared in relation to the choice of the treatment that should be based on antifungal response of the isolate.

Acknowledgments

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico by process numbers 475378/2013-0 and 408718/2013-7 and FAPEAL (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Alagoas).

Reference

- (CLSI) CaLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. In, 3rd ed. edn. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Approved Standard M27- A3., Wayne, PA
- Al-Sweih N, Khan Z, Khan S, Devarajan LV (2009) Neonatal candidaemia in Kuwait: a 12-year study of risk factors, species spectrum and antifungal susceptibility. *Mycoses* 52:518-523 doi: 10.1111/j.1439-0507.2008.01637.x
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410 doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Angelakis E, Raoult D (2014) Methods for the discovery of emerging pathogens. *Microb Pathog* 77:114-118 doi: 10.1016/j.micpath.2014.06.007
- Arabatzis M et al. (2014) Sequence-based identification, genotyping and EUCAST antifungal susceptibilities of *Trichosporon* clinical isolates from Greece. *Clin Microbiol Infect* 20:777-783 doi: 10.1111/1469-0691.12501
- Atlas RM, Parks LC (1993) *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press, London
- Buzzini P, Martini A (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* 93:1020-1025
- Cendejas-Bueno E et al. (2012) Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 50:3641-3651 doi: 10.1128/JCM.02248-12
- Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL (2008) Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* 166:121-132 doi: 10.1007/s11046-008-9136-x
- Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo AS, Colombo AL (2009) Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 47:1074-1081 doi: 10.1128/JCM.01614-08
- Colombo AL, Padovan AC, Chaves GM (2011) Current knowledge of *Trichosporon* spp. and *Trichosporonosis*. *Clin Microbiol Rev* 24:682-700 doi: 10.1128/CMR.00003-11
- Crouzet J, Sotto A, Picard E, Lachaud L, Bourgeois N (2011) A case of *Candida haemulonii* osteitis: clinical features, biochemical characteristics, and antifungal resistance profile. *Clin Microbiol Infect* 17:1068-1070 doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03471.x
- de Almeida JN et al. (2012) First report of a clinical isolate of *Candida haemulonii* in Brazil. *Clinics* 67:1229-1231 doi: 10.6061/clinics/2012(10)18
- Diezmann S, Cox CJ, Schönian G, Vilgalys RJ, Mitchell TG (2004) Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol* 42:5624-5635 doi: 10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004

- Dávila AM, Steindel M, Grisard EC (2004) Tropical diseases, pathogens, and vectors biodiversity in developing countries: need for development of genomics and bioinformatics approaches. *Ann N Y Acad Sci* 1026:41-46 doi: 10.1196/annals.1307.005
- Ebert D, Bull JJ (2003) Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends Microbiol* 11:15-20
- Fan YM, Huang WM, Yang YP, Li W, Li SF (2011) Primary cutaneous trichosporonosis caused by *Trichosporon dermatis* in an immunocompetent man. *J Am Acad Dermatol* 65:434-436 doi: 10.1016/j.jaad.2010.01.020
- Fekkar A et al. (2009) Serum cross-reactivity with *Aspergillus galactomannan* and cryptococcal antigen during fatal disseminated *Trichosporon dermatis* infection. *Clin Infect Dis* 49:1457-1458 doi: 10.1086/644499
- Ferreira N, Belloch C, Querol A, Manzanares P, Vallez S, Santos A (2010) Yeast microflora isolated from brazilian cassava roots: taxonomical classification based on molecular identification. *Curr Microbiol* 60:287-293 doi: 10.1007/s00284-009-9539-z
- Formoso A et al. (2015) Enzymatic Activity and Susceptibility to Antifungal Agents of Brazilian Environmental Isolates of *Hortaea werneckii*. *Mycopathologia* 180:345-352 doi: 10.1007/s11046-015-9920-3
- Gadanho M, Sampaio JP (2005) Occurrence and diversity of yeasts in the mid-atlantic ridge hydrothermal fields near the Azores Archipelago. *Microb Ecol* 50:408-417 doi: 10.1007/s00248-005-0195-y
- Giudice MC, Reis-Menezes AA, Rittner GM, Mota AJ, Gambale W (2012) Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. *Braz J Microbiol* 43:895-902 doi: 10.1590/S1517-83822012000300007
- Giusiano G, Mangiaterra M, Garcia Saito V, Rojas F, Gómez V, Díaz MC (2006) Fluconazole and itraconazole resistance of yeasts isolated from the bloodstream and catheters of hospitalized pediatric patients. *Chemotherapy* 52:254-259 doi: 10.1159/000094867
- Hagler AN, Mendonça-Hagler LC (1991) A *Diazonium Blue B* test for yeasts grown three days on yeast carbon base-urea agar. *Rev Microbiol* 22:71-74
- Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67:597-607
- Hashino S et al. (2013) Fungemia due to *Trichosporon dermatis* in a patient with refractory Burkitt's leukemia. *Blood Res* 48:154-156 doi: 10.5045/br.2013.48.2.154
- Hobson RP (2003) The global epidemiology of invasive *Candida* infections--is the tide turning? *J Hosp Infect* 55:159-168; quiz 233
- Hoskisson PA, Trevors JT (2010) Shifting trends in pathogen dynamics on a changing planet. *Antonie Van Leeuwenhoek* 98:423-427 doi: 10.1007/s10482-010-9485-6
- Iturrieta-González IA, Padovan AC, Bizerra FC, Hahn RC, Colombo AL (2014) Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One* 9:e109553 doi: 10.1371/journal.pone.0109553
- Johnson E (2009) Rare and emerging *Candida* species. *Current Fungal Infection Reports* 3:152-159 doi: 10.1007/s12281-009-0020-z

- Khan ZU et al. (2007) Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *J Clin Microbiol* 45:2025-2027 doi: 10.1128/JCM.00222-07
- Kim MN et al. (2009) *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis* 48:e57-61 doi: 10.1086/597108
- Kim S, Ko KS, Moon SY, Lee MS, Lee MY, Son JS (2011) Catheter-related candidemia caused by *Candida haemulonii* in a patient in long-term hospital care. *J Korean Med Sci* 26:297-300 doi: 10.3346/jkms.2011.26.2.297
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331-371
- Liu XZ et al. (2015) Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *STUDIES IN MYCOLOGY* 81:85-147
- López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Mier T, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F (1994) [Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea]. *Rev Latinoam Microbiol* 36:17-20
- Melhem MS, Bertolotti A, Lucca HR, Silva RB, Meneghin FA, Szeszs MW (2013) Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Braz J Microbiol* 44:1257-1266 doi: 10.1590/S1517-83822014005000018
- Merseguel KB et al. (2015) Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. *BMC Infect Dis* 15:57 doi: 10.1186/s12879-015-0793-3
- Miceli MH, Díaz JA, Lee SA (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11:142-151 doi: 10.1016/S1473-3099(10)70218-8
- Montville TJ (1983) Dual-substrate plate diffusion assay for proteases. *Appl Environ Microbiol* 45:200-204
- Muro MD, Motta FeA, Burger M, Melo AS, Dalla-Costa LM (2012) Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatric patients. *J Clin Microbiol* 50:3783-3785 doi: 10.1128/JCM.01136-12
- Oberoi JK, Wattal C, Goel N, Raveendran R, Datta S, Prasad K (2012) Non-albicans *Candida* species in blood stream infections in a tertiary care hospital at New Delhi, India. *Indian J Med Res* 136:997-1003
- Polvi EJ, Li X, O'Meara TR, Leach MD, Cowen LE (2015) Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci* 72:2261-2287 doi: 10.1007/s00018-015-1860-z
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO (1982) Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:7-14
- Péter G, Tornai-Lehoczki J, Dlačny D (2009) *Candida ogatae* sp. nov., an anamorphic member of the *Kuraishia* clade. *FEMS Yeast Res* 9:328-333 doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00466.x
- Ramos LeS, Barbedo LS, Braga-Silva LA, dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB (2015) Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 32:122-125 doi: 10.1016/j.riam.2014.01.003
- Rodero L et al. (2002) Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. *J Clin Microbiol* 40:2266-2269

- Rüchel R, Tegeler R, Trost M (1982) A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:233-244
- Scott JA, Untereiner WA (2004) Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Med Mycol* 42:239-246
- Shin JH et al. (2012) Detection of amphotericin B resistance in *Candida haemulonii* and closely related species by use of the Etest, Vitek-2 yeast susceptibility system, and CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 50:1852-1855 doi: 10.1128/JCM.06440-11
- Silva CM et al. (2015) Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia* 180:69-73 doi: 10.1007/s11046-015-9872-7
- Slifkin M (2000) Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 38:4626-4628
- Smith HL, Goodner K (1958) Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *J Bacteriol* 76:662-665
- Stopiglia CD, Vieira FJ, Mondadori AG, Oppe TP, Scroferneker ML (2011) In vitro antifungal activity of dihydroxyacetone against causative agents of dermatomycosis. *Mycopathologia* 171:267-271 doi: 10.1007/s11046-010-9370-x
- Sugita T, Takashima M, Nakase T, Ichikawa T, Ikeda R, Shinoda T (2001) Two new yeasts, *Trichosporon debeurmannianum* sp. nov. and *Trichosporon dermatis* sp. nov., transferred from the *Cryptococcus humicola* complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1221-1228 doi: 10.1099/00207713-51-3-1221
- Taverna CG, Córdoba S, Murisengo OA, Vivot W, Davel G, Bosco-Borgeat ME (2014) Molecular identification, genotyping, and antifungal susceptibility testing of clinically relevant *Trichosporon* species from Argentina. *Med Mycol* 52:356-366 doi: 10.1093/mmy/myt029
- van Uden N, Kolipinski MC (1962) *Torulopsis haemulonii* nov. spec. a yeast from the Atlantic ocean. *Antonie van Leeuwenhoek* 28:78-80 doi: 10.1007/BF02538724
- Xess I, Jain N, Hasan F, Mandal P, Banerjee U (2007) Epidemiology of candidemia in a tertiary care centre of north India: 5-year study. *Infection* 35:256-259 doi: 10.1007/s15010-007-6144-6
- Xu W, Pang KL, Luo ZH (2014) High fungal diversity and abundance recovered in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean. *Microb Ecol* 68:688-698 doi: 10.1007/s00248-014-0448-8
- Yuvaraj A, Rohit A, Koshy PJ, Nagarajan P, Nair S, Abraham G (2014) Rare occurrence of fatal *Candida haemulonii* peritonitis in a diabetic CAPD patient. *Ren Fail* 36:1466-1467 doi: 10.3109/0886022X.2014.944067

Table 1. Origin, source and GenBank access number of the yeasts from marine zoanthids

Species	Strain	Origin	Source	GenBank access number (D1/D2 ^a , ITS ^b)
<i>C. haemulonii</i>				
	LMS 03	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720385 ^a
	LMS 04	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720386 ^a
	LMS 40	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720387 ^a
	LMS 54	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720388 ^a
	LMS 55	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720389 ^a
	LMS 66	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720390 ^a
	LMS 60	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720391 ^a
	LMS 67	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KU720392 ^a
<i>C. dermatis</i>				
	LMS 02	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa variabilis</i>	KT981961 ^a ; KT981962 ^b
	LMS 38	Sereia's sandstone reef	<i>Palythoa caribaeorum</i>	KT981963 ^a ; KT981964 ^b
	LMPV 90	Ponta Verde coral reef	<i>Zoanthus sociatus</i>	KT981957 ^a ; KT981958 ^b
	LMPV 109	Ponta Verde coral reef	<i>Palythoa caribaeorum</i>	KT981959 ^a ; KT981960 ^b

Table 2. Enzymatic activity for yeasts strains from marine zoanthids

Enzyme tested	Precipitation zone (PZ) ^a or result											
	<i>Candida haemulonii</i> strains								<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i> strains			
	LMS 03	LMS 04	LMS 40	LMS 54	LMS 55	LMS 60	LMPV 66	LMPV 67	LMS 02	LMS38	LMPV 90	LMPV 109
Lipase	0.60	0.70	0.77	0.68	0.74	0.61	0.64	0.68	0.245	0.36	0.35	0.32
Esterase	0.30	0.31	0.33	0.31	0.31	0.32	0.93	0.28	0.32	0.35	0.37	0.285
Pectinase	Negativo	Negative	Negative	Negative	Negative							
Amylase	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Cellulase	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	0.375	0.375	0.345
Urease	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Positive	Positive	Positive	Positive
Phospholipase	0.99	0.99	0.96	0.99	0.99	0.99	0.98	0.99	1	1	1	1
Urease	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	3	3	3	3
DNase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.8	1	0.79
Protease												
Caseinase	0.34	Negative	0.38	0.38	Negativo	0.38	0.37	0.39	0.22	Negative	Negative	Negative
Gelatinase	0.33	0.35	0.43	0.44	0.40	0.41	0.57	0.41	1	1	1	1
Albuminase	0.51	0.59	0.41	0.49	0.56	0.44	0.63	0.48	0.34	1	1	0.57
Keratinase	0.120	0.172	0.252	0.019	0.101	0.163	0.115	0.084	Negative	Negative	Negative	Negative

^a PZ = 1 (negative) / PZ < 1 (positive) / PZ < 0.5 (strongly positive)

Table 3. Antifungal susceptibility of *C. haemulonii* and *C. dermatis* strains from from marine zoanthids

	Antifungal	Ketoconazole	Tioconazole	Posaconazole	Amphotericin B	Itraconazole	Voriconazole	Terbinafine	Fluconazole
		MIC / MFC ($\mu\text{g/mL}$)							
<i>C. haemulonii</i>	LMS 03	0.5 / >16	2 / 16	4 / >16	8 / 8	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	64 / >64
	LMS 04	0.5 / >16	1 / >16	2 / >16	4 / 8	8 / >16	16 / >16	>16 / >16	64 / >64
	LMS 40	1 / >16	2 / >16	>16 / >16	16 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 54	4 / >16	2 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 60	4 / >16	2 / >16	>16 / >16	16 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 66	1 / 16	2 / 16	4 / >16	8 / 8	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	64 / >64
	LMS 67	1 / >16	2 / 16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	LMS 55	4 / >16	4 / 16	>16 / >16	8 / 8	>16 / >16	>16 / >16	>16 / >16	>64 / >64
	Geometric median (min-max)	2.0 (0.5 - 4) / >16 (16 - >16)	2.0 (1 - 4) / >16 (16 - >16)	>8.7 (2 - >16.0) / >16	>10.4 (4 - >16) / >11.3 (8 - >16)	>16 (8 - >16) / >16	>16 / >16	>16 (>16) / >16	>64 (64 - >64) / >64
<i>C. dermatis</i>	LMPV 109	0.125 / 8.0	0.125 / 16.0	0.25 / 4	2.0 / 8.0	0.5 / >16.0	0.062 / 8.0	0.5 / >16.0	2.0 / >64.0
	LMPV 90	1.0 / 4.0	8.0 / 8.0	4.0 / 8.0	1.0 / 4.0	1.0 / 4.0	2.0 / 8.0	4.0 / >16.0	64.0 / >64.0
	LMS 02	0.125 / 8.0	0.25 / 8.0	0.5 / >16.0	0.5 / 2.0	0.5 / >16.0	0.125 / 16.0	1.0 / 16.0	4.0 / 8.0
	LMS 38	8.0 / >16.0	4.0 / 8.0	>16.0 / >16.0	2.0 / 4.0	2.0 / >16.0	>16.0 / >16.0	4.0 / >16.0	64.0 / >64.0
	Geometric median (min-max)	0.595 (0.125-8.0) / >8.0 (4.0->16.0)	>0.706 (0.062->16.0) / >11.314 (8.0->16.0)	0.841 (0.5-2.0) / 11.314 (4.0->16.0)	1.0 (0.125-8.0) / 9.514 (8.0-16.0)	1.189 (0.5-2.0) / 4.0 (2.0-8.0)	1.682 (0.5-4.0) / >16.0 (16.0->16.0)	>1.682 (0.25->16.0) / 9.514 (4.0->16.0)	13.454 (2.0-64.0) / >38.05 (8.0->64.0)

MIC = minimal inhibitory concentration

MFC = minimal fungicidal concentration