



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Rio Grande  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



***Aspergillus* spp. DE AMBIENTE COSTEIRO: INFLUÊNCIA DE FATORES  
ABIÓTICOS NA TAXA DE ISOLAMENTO E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIFÚNGICA**

**Emília Ferreira Andrade**

Rio Grande, 2024



Ministério da Educação

Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



***Aspergillus* spp. DE AMBIENTE COSTEIRO: INFLUÊNCIA DE FATORES  
ABIÓTICOS NA TAXA DE ISOLAMENTO E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIFÚNGICA**

**Emília Ferreira Andrade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientadora:** Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier

Rio Grande, 2024

**Emília Ferreira Andrade**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

***Aspergillus* spp. DE AMBIENTE COSTEIRO: INFLUÊNCIA DE FATORES  
ABIÓTICOS NA TAXA DE ISOLAMENTO E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIFÚNGICA**

**Banca examinadora**

Profa. Dra. Jessica Louise Benelli (Externo – UFCSPA)

Profa. Dra. Andrea Von Groll (Titular – FURG)

Profa. Dra. Vanice Rodrigues Poester (Suplente - FURG)

**Orientadora:** Profa. Dra. Melissa Orzechowski Xavier

Rio Grande, 2024

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida e a oportunidade de ter uma formação acadêmica de qualidade.

Agradeço ao grupo de Micologia da FAMED-FURG em especial Abraão, Bruna, Diulien, Mari, Cassi, Karine, Fabi, Rê e Chica, por tornarem meus dias mais leves e engraçados, pelos debates nos RU's de cada dia, pelos abraços e apoio recebido, materiais emprestados e por todos os ensinamentos compartilhados durante esses dois anos.

Agradeço imensamente à Prof. Dra. Vanice, por toda paciência em me ensinar sobre os experimentos na bancada e pelas dúvidas mais que esclarecidas, desenhadas!!

E principalmente, meu super agradecimento à Prof. Dra. Melissa, que além de todo auxílio e ensinamentos na formação científica e profissional, nos guia para a vida. Obrigada por exercer exatamente o que significa ser uma orientadora, que ajuda a reconhecer meus padrões e melhorá-los, que acredita no meu potencial e incentiva a busca constante dele! Ser orientada e direcionada na ciência por você é um privilégio e uma honra. Muito obrigada!

À minha família, em especial minha mãe e vó Zulema, no fim tudo isso é para vocês! Obrigada pelas orações, por torcerem tanto por mim e por estarem presente na minha vida mesmo com a distância.

À todas as pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida e me apoiaram nesta etapa acadêmica, gratidão!

## RESUMO

*Aspergillus* é um gênero de fungos filamentosos ubíquos, presentes em diversos ecossistemas e reconhecido por atuar como patógeno oportunista de humanos, plantas e animais. Nas últimas décadas, relatos de resistência das cepas aos antifúngicos recomendados para uso terapêutico vêm aumentando, e o ambiente tem se mostrado importante nessas altas taxas. Acredita-se que uso de azol na agricultura induz a resistência cruzada aos medicamentos de mesma classe farmacológica, neste cenário, resíduos azólicos são escoados pelos efluentes e desembocam em estuários e oceanos, podendo exercer pressão de seleção aos isolados de *Aspergillus* spp. presente nesses ambientes costeiros. Portanto, o objetivo desta dissertação foi determinar a taxa de isolamento de *Aspergillus* spp. em amostras de água de um ecossistema costeiro e sua relação com características abióticas, e em adição, determinar o perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados à fármacos de eleição para tratamento da aspergilose. Para isso, foram coletadas mensalmente amostras de água em três sítios ambientais, localizados no (1) estuário médio da Lagoa dos Patos, (2) desembocadura da lagoa e (3) praia do Cassino em Rio Grande, RS - Brasil, durante 25 meses, sendo os parâmetros abióticos dos locais determinados em cada coleta. Os parâmetros abióticos entre os sítios de amostragem, frequência de coletas positivas de *Aspergillus*, seções e influência desses parâmetros no isolamento fúngico foram determinados, bem com a susceptibilidade antifúngica. *Aspergillus* spp. foi detectado em 44% das coletas (n=33/75) e totalizou 67 isolados, sendo eles 59.7% *Fumigati*, 22.3% *Flavi* e 17.9% *Nigri*. O sítio de coleta com maior taxa de *Aspergillus* spp. foi o estuário (39,4%) seguido da praia 36.4% e desembocadura da lagoa (24.2%), embora sem diferença estatística. Parâmetros como séston, oxigênio dissolvido e turbidez influenciaram no isolamento das seções de *Aspergillus*. A resistência foi encontrada em 3% (2/67) dos isolados, pertencentes à seção *Nigri*. Estudos de detecção e resistência de *Aspergillus* em ecossistemas aquáticos são raros na literatura. O presente trabalho demonstra que ambientes aquáticos podem servir como fonte de infecção, além de agregar dados dos parâmetros abióticos para *Aspergillus* spp. e relatar a presença de isolados resistentes em ambiente costeiro, provando a necessidade de vigilância e monitoramento ambiental frente a resistência fúngica.

Palavras-chave: Estuário, ambientes marinhos, parâmetros abióticos, resistência fúngica, Saúde Única, fungos filamentosos.

## ABSTRACT

*Aspergillus* is a genus of ubiquitous filamentous fungi found in various ecosystems and recognized for acting as an opportunistic pathogen in humans, plants, and animals. In recent decades, reports of strain resistance to antifungals recommended for therapeutic use have been increasing, and the environment has been shown to be important in these high rates. It is believed that the use of azoles in agriculture induces cross-resistance to drugs of the same pharmacological class. In this scenario, azole residues are washed away by effluents and flow into estuaries and oceans, potentially exerting selection pressure on *Aspergillus* spp. isolates present in these coastal environments. Therefore, the aim of this dissertation was to determine the isolation rate of *Aspergillus* spp. in water samples from a coastal ecosystem and its relationship with abiotic characteristics, as well as to determine the antifungal susceptibility profile of the isolates. For that, water samples were collected monthly at three environmental sites located in the estuary of Patos Lagoon, the lagoon mouth, and Cassino beach in Rio Grande, RS - Brazil, over 25 months, with the abiotic parameters of the sites determined at each collection. Abiotic parameters between sampling sites, frequency of positive *Aspergillus* collections, sections, and the influence of these parameters on fungal isolation were determined, as well as antifungal susceptibility. *Aspergillus* spp. was detected in 44% of the collections (n=33/75) and totaled 67 isolates, with 59.7% being *Fumigati*, 22.3% *Flavi*, and 17.9% *Nigri*. The collection site with the highest *Aspergillus* rate was the estuary (39.4%), followed by the beach (36.4%) and lagoon mouth (24.2%), with parameters such as seston, dissolved oxygen, and turbidity influencing section isolation. Resistance was found in 3% (2/67) of the isolates, belonging to the *Nigri* section. Studies on the detection and resistance of *Aspergillus* in aquatic ecosystems are rare in the literature. This study demonstrates that aquatic environments can serve as a source of infection, in addition to providing data on abiotic parameters for *Aspergillus* spp. and reporting the presence of resistant isolates in coastal environments, proving the need for environmental surveillance and monitoring against fungal resistance.

Keywords: Estuary, marine environments, abiotic parameters, fungal resistance, One Health, filamentous fungi.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados de parâmetros abióticos das amostras de água (n=75) de acordo com a localização geográfica dos locais de amostragem, durante o período de julho de 2021 a julho de 2023, totalizando 25 coletas em cada local. **37**
- Tabela 2.** Influência das variáveis ambientais entre coletas positivas (sim) (n=33) e negativas (não) (n=42) para o isolamento de *Aspergillus* spp. e de suas seções *Fumigati* (n=16), *Flavi* (n=12) e *Nigri* (n=11) durante o período do estudo (25 meses) **38**
- Tabela 3.** Dados referentes às coletas positivas para cada uma das seções *Fumigati* (n=16), *Flavi* (n=12) e *Nigri* (n=11) com o respectivo percentual isolado em cada local de coleta (estuário, desembocadura da lagoa e praia) e o resultado da significância estatística entre sítios. **39**
- Tabela 4.** Suscetibilidade *in vitro* de *Aspergillus* spp. isolados. (n=67) provenientes de coletas de água em locais de amostragem ambiental na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, frente os medicamentos itraconazol (ITZ) e anfotericina b (AMB). **40**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDAGC	Sabouraud-dextrose acrescido de gentamicina e cloranfenicol
PDA	<i>Potato dextrose ágar</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
APC	Aspergilose pulmonar crônica
AI	Aspergilose invasiva
SFA	Sinusite fúngica alérgica
ABPA	Aspergilose bronco pulmonar alérgica
ITC	Itraconazol
AMB	Anfotericina B
DMSO	Dimetilsulfóxido
PELD – ELPA	Pesquisa Ecológica de Longa Duração no Estuário da Lagoa dos Patos e Costa Marinha Adjacente
NH <sub>4</sub>	Amônia
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
COVID-19	<i>Corona Virus Disease 2019</i>
GM	Galactomanana
CYP51A	<i>Cytochrome P450 14-<math>\alpha</math> Sterol Demethylase</i>
SPM	<i>Suspended particulate matter</i>



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Fórmula estrutural do (A) Itraconazol, fármaco azólico comumente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas na clínica e (B) Tebuconazol, fungicida azólico comumente utilizado nos campos agrícolas (Resolução nº160 de 19/01/10 ANVISA)

**22**

**Figura 2.** Imagem referente a localização da área de estudo, destacando os locais de amostragem na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A porção sul da Lagoa dos Patos se conecta com o Oceano Atlântico, região onde estão os locais de coleta. O ponto de coleta no estuário médio abrange parte da Lagoa dos Patos, local de influência urbana que possui proximidade aos hospitais. O ponto de coleta desembocadura da Lagoa, se localiza na Barra de Rio Grande, onde ocorre a troca de água entre a lagoa e o oceano, local caracterizado por uma área industrial, portuárias e pesqueiras. O ponto de coleta praia, se localiza na praia do Cassino e é caracterizado por área marítima de lazer. Fonte: autor/ Google Imagens, 2024.

**24**

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Características do gênero <i>Aspergillus</i> .....	13
2.2 Seções e espécies crípticas.....	14
2.3 Características da seção <i>Fumigati, Flavi e Nigri</i> .....	15
2.4 Aspergilose em humanos .....	16
2.5 Aspergilose em animais .....	17
2.6 <i>Aspergillus</i> em ambientes .....	18
2.7 Tratamentos Antifúngicos e Fungicidas agrícolas .....	20
2.8 Mecanismos de Resistência .....	22
2.9 Ecossistema Costeiro .....	23
2.10 Variáveis abióticas e adaptações em ambiente costeiro.....	24
2.11 Ambiente e Resistência .....	26
2.12 <i>Aspergillus</i> , resistência e o contexto <i>One Health</i> .....	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos .....	29
4. MANUSCRITO.....	30
1 INTRODUCTION .....	32
2 MATERIAL AND METHODS.....	34
3 RESULTS.....	37
4 DISCUSSION.....	40
5 FUNDING .....	43
6 ACKNOWLEDGEMENTS .....	44
7 REFERENCES .....	44
5. CONCLUSÕES.....	50
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	52

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33

## 1. INTRODUÇÃO

*Aspergillus* é um gênero fúngico ubíquo, causador da aspergilose em humanos, animais e um importante patógeno de plantas (Latgé & Chamilos, 2019; Melo et al., 2020; Shabeer et al., 2022). A aspergilose acomete principalmente o sistema respiratório, confere uma série de manifestações clínicas e apesar de ser negligenciada, tem sido cada vez mais relatada em humanos (Cadena et al., 2021; Moldoveanu et al., 2021; Agarwal et al., 2022) sendo considerada emergente mundialmente (Bongomin et al., 2017). Os principais agentes causadores são *Aspergillus* da seção *Fumigati* mas também as seções *Flavi* e *Nigri* são potencialmente patogênicas (Nargesi et al., 2022).

Em vista da emergência da aspergilose, *Aspergillus* seção *Fumigati* foi classificado recentemente pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022) como patógeno fúngico prioritário, com classificação de risco crítico devido sua ameaça para a saúde pública e altas taxas de mortalidade relacionadas. Dentre a ampla gama de manifestações clínicas da aspergilose, se destaca a doença pulmonar (Latgé & Chamilos, 2019). Dependendo principalmente do estado imunológico do paciente, essa micose pode se apresentar de forma alérgica com reações de hipersensibilidade, de forma crônica principalmente em pacientes que possuem doença prévia pulmonar, ou de forma invasiva, na qual ocorre invasão de vasos sanguíneos e disseminação do fungo do pulmão para outros órgãos (Latgé & Chamilos, 2019).

O tratamento baseia-se no uso de triazóis e poliênicos, no entanto, elevadas taxas de resistência das cepas aos antifúngicos recomendados, vêm sendo relatadas (Lestrade et al., 2019; De Francesco, 2023). Nesse cenário de resistência, tem se observado o relevante papel do ambiente como atuante principal nas altas taxas (Burks et al., 2021). Grande parte do problema está relacionado ao uso indiscriminado de fungicidas azólicos em plantações agrícolas, induzindo resistência cruzada aos medicamentos de mesma classe farmacológica que são utilizados na clínica para o tratamento da aspergilose e outras doenças fúngicas (Kang et al., 2022). Uma vez utilizados nas plantações, resíduos azólicos são escoados chegando a rios, lagos, estuários e oceanos, exercendo pressão de seleção aos isolados de *Aspergillus* spp. presente nos sistemas aquíferos, podendo possivelmente, induzir uma seleção inesperada e novas mutações associadas a resistência aos triazóis (Almeida et al., 1993; Verweij et al., 2013; Pérez-llano et al., 2020; Maggi, et al., 2023).

34 Estudos de detecção de resistência em isolados ambientais são frequentemente  
35 direcionados à seção *Fumigati*, e apenas 0,3% dos estudos são em ecossistemas aquáticos  
36 (Burks et al., 2021). Assim, reforça-se a importância de conhecer a distribuição das  
37 principais seções de *Aspergillus* em ambiente costeiro, bem como de monitorar seu perfil  
38 de suscetibilidade antifúngica nestes ambientes. Deste modo, a investigação com enfoque  
39 em Saúde Única se faz necessária, uma vez que a saúde do ambiente influencia  
40 diretamente e indiretamente a saúde humana e animal (Banerjee et al., 2021).

41 Portanto, tendo em vista que: (1) *Aspergillus* spp. apresenta importância clínica  
42 elevada em diferentes grupos de pacientes humanos; (2) *Aspergillus* spp. destaca-se como  
43 patógeno de alta morbi-mortalidade em animais, especialmente aves (Melo et al., 2020);  
44 (3) tem sido demonstrado mundialmente um aumento alarmante de cepas clínicas e  
45 ambientais de *Aspergillus* spp. resistentes a antifúngicos; (4) este gênero fúngico tem  
46 ainda importante impacto econômico como fitopatógeno e produtor de micotoxinas (El-  
47 Baky et al., 2021; Nawaf, 2023); (5) tem alta capacidade de adaptação aos mais diferentes  
48 habitats, até mesmo em condições adversas (Lalgé & Chamilos 2019), como estuários e  
49 oceano, que possuem constante variante de parâmetros abióticos (Fernandes et al., 2007);  
50 (6) e que a região sul do Rio Grande do Sul é caracterizada por um ecossistema costeiro,  
51 cuja economia é baseada na agricultura (IBGE, 2022), na qual há utilização de fungicidas  
52 agrícolas resulta em resíduos que contaminam águas superficiais (Primel et al., 2007) e  
53 podem chegar ao oceano, há uma necessidade de vigilância e monitoramento da presença  
54 e do perfil de resistência a antifúngicos dos isolados de *Aspergillus* spp. advindos de  
55 fontes ambientais, sendo fundamental que se busque compreender como um aspecto  
56 influencia o outro principalmente em relação às variáveis ambientais.

57 Contudo, o presente estudo foi desenvolvido com enfoque na pesquisa em  
58 reservatórios ambientais de *Aspergillus* resistentes a azóis. A dissertação apresentará um  
59 referencial teórico, discutindo aspectos gerais relacionados ao tema. Na sequência, os  
60 objetivos serão pontuados e um manuscrito será apresentado, contendo os resultados e a  
61 discussão acerca do estudo. Por fim, as conclusões serão apresentadas.

## 62 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 63 2.1 Características do gênero *Aspergillus*

64 *Aspergillus* é um gênero bastante diversificado e onipresente, com espécies que  
65 ocorrem em todo o mundo, nos mais diversos habitats (Arastehfar et al., 2021). Por conta  
66 disso é um gênero amplamente estudado, com alto impacto ambiental, social e  
67 econômico, visto que é explorado em diferentes ramos da biotecnologia como produção  
68 de fármacos, alimentos, ácidos orgânicos, enzimas, dentre outros (Abdel-Azeem et al.,  
69 2019). Além disso, o gênero *Aspergillus* tem grande destaque na saúde, com espécies  
70 patogênicas que causam uma série de manifestações clínicas tanto em humanos como  
71 animais, além da produção de micotoxinas e contaminações ambientais (Samson et al.,  
72 2014; Arastehfar et al., 2021).

73 As espécies deste gênero obtiveram tamanho sucesso de adaptação devido a uma  
74 série de fatores e características (Arastehfar et al., 2021). *Aspergillus* spp. podem produzir  
75 ascósporos sexuais ambientalmente persistentes e é capaz de produzir inúmeras estruturas  
76 reprodutivas, no qual dispersa continuamente conídios - estruturas de reprodução  
77 assexuada, no ambiente. Estes, por sua vez, possuem um pequeno tamanho (2,5 µm seção  
78 *Fumigati* e de 3 a 10 µm seções *Nigri* e *Flavi*) (Silva, 2009) pelo qual conseguem ser  
79 transportados por longas distâncias pelo vento, habitando diferentes nichos ecológicos,  
80 fazendo este gênero de fungo ser um dos mais encontrados no ar (Arastehfar et al., 2021).

81 Em seu ambiente natural, possui um comportamento sapróbio, sendo encontrado  
82 particularmente em vegetação em decomposição no solo ou na acumulação de compostos  
83 orgânicos, no entanto, é um fungo que não possui seletividade, pois consegue colonizar  
84 substratos sob condições limitadas de nutrientes além de ser capaz de degradar uma ampla  
85 variedade de moléculas orgânicas (Krijgheld et al., 2013; Latgé & Chamilos et al., 2019).  
86 Além disso, em relação às condições abióticas de crescimento eles igualmente não são  
87 seletivos, isso porque crescem numa ampla faixa de ph, salinidade, temperatura, oxigênio,  
88 umidade, sobrevivendo em altos níveis de estresse (Arastehfar et al., 2021). Espécies de  
89 *Aspergillus* spp. já foram isoladas inclusive em ambientes de alta salinidade, como no  
90 mar morto (Oren, 2012; Latgé & Chamilos et al., 2019).

91 O interesse clínico neste gênero advém do fato de possuírem um vasto conjunto  
92 de espécies patogênicas, podendo afetar além de humanos uma série de animais, desde

93 mamíferos marinhos, aves silvestres até invertebrados, como corais (Seyedmousavi et al.,  
94 2015). Dentre os patógenos de *Aspergillus* spp., destacam-se as seções *Fumigati*, *Flavi*,  
95 *Nigri*, *Terrei* e *Nidulantes* sendo a principal e mais virulenta a seção *Fumigati*,  
96 responsável por 90% dos casos de aspergilose (Lalgé & Chamilos 2019). As vias de  
97 infecção para vertebrados ocorrem majoritariamente por inalação dos conídios, na qual o  
98 pulmão é o local de sua proliferação inicial (Bhat et al., 2010).

99 O desenvolvimento da aspergilose está intrinsecamente associado ao quadro  
100 imunológico do hospedeiro. No momento em que os conídios são inalados tanto por  
101 humanos, quanto por animais, o sistema imunológico inato consegue eliminar essas  
102 estruturas, normalmente por ação dos neutrófilos e macrófagos, não causando nenhum  
103 malefício à saúde de indivíduos imunocompetentes (Paulussen et al., 2017; Lalgé &  
104 Chamilos 2019). No entanto, dependendo da falta de integridade pulmonar, assim como  
105 do imunocomprometimento do hospedeiro, a partir do conídio inalado a infecção pode  
106 ser persistente, causando a partir disso uma ampla gama de apresentações clínicas, desde  
107 reações alérgicas até doença invasiva (Paulussen et al., 2017; Lalgé & Chamilos 2019).

## 108 **2.2 Seções e espécies crípticas**

109 Nos últimos anos a nomenclatura das espécies de *Aspergillus* foi alterada, ao  
110 descobrir a existência das denominadas espécies crípticas, que são espécies  
111 fenotipicamente idênticas, diferenciadas uma das outras apenas molecularmente a partir  
112 do sequenciamento de genes. Para isso, é necessária a aplicação de métodos que  
113 amplificam o espaçador interno transcrito (ITS), regiões  $\beta$ -tubulina ou calmodulina, para  
114 discernir entre espécies crípticas (Pinto et al., 2018).

115 As espécies que possuem a mesma morfologia foram agrupadas em subgrupos  
116 chamados seção. *Aspergillus fumigatus* pertence agora ao subgênero *Fumigati*, seção  
117 *Fumigati* (Imbert et al., 2021). No qual dentro desta seção, irá conter a espécie *Aspergillus*  
118 *fumigatus sensu stricto* e as suas espécies crípticas (*A. viridinutans*, *A. lentulus*, *A. felis*,  
119 *A. udagawae*, *A. fischeri*, *A. hiratsukae*, *A. pseudofischeri*). A mais recente atualização  
120 taxonômica do gênero relatou 436 espécies de *Aspergillus* distribuídas em 27 seções  
121 (Houbraken et al., 2020). A correta identificação das espécies crípticas de *Aspergillus*  
122 spp., foi relatada como de extrema importância pois as espécies podem variar em  
123 determinadas características como a virulência e o perfil de resistência aos antifúngicos,  
124 sendo essencial para o tratamento clínico (Pinto et al., 2018; Imbert et al., 2021).

125

### 126 **2.3 Características da seção *Fumigati*, *Flavi* e *Nigri***

127 A seção *Fumigati* é uma das seções do gênero *Aspergillus* mais frequentemente  
128 associadas a aspergilose. Seus fatores de virulência e características dos seus conídios  
129 fazem esta ser a seção mais patogênica do gênero. O habitat natural da seção *Fumigati* é  
130 o solo no qual prospera como ser saprófita e de distribuição ubíqua, com uma ampla gama  
131 de nichos ecológicos (Rhodes, 2006; Chowdhary & Meis, 2018). *Aspergillus* seção  
132 *Fumigati* tolera altas temperaturas (até ~70° C), pH de básico ao ácido, assim como alta  
133 salinidade, podendo ser isolado do oceano. A prosperidade de *Aspergillus* seção *Fumigati*  
134 em diferentes habitats (sendo isolado de águas marinhas e doces, ar, solo, ambientes  
135 internos, dentre outros) se dá também pela característica de seus conídios. Este conídio  
136 hidrofóbico, tem a capacidade de germinar, formar colônias mais rapidamente (de 6 a 8  
137 horas) que os de outras seções do gênero (Rhodes, 2006). Além de seu pequeno tamanho  
138 (2-3 µm) e de possuir maior proteção devido a deposição de melanina em sua parede  
139 celular, é capaz de ser facilmente transportado pelo ar e infectar animais e humanos via  
140 aerógena. Nestes, conseguem alcançar os alvéolos pulmonares, onde se ligam às proteínas  
141 surfactantes através do reconhecimento de ligantes/receptores (Lalgé, 1999; Kerzaon et  
142 al., 2008; Musa et al., 2018; Lalgé & Chamilos 2019).

143 Fungos da seção *Fumigati*, são capazes também de adaptar seu metabolismo à  
144 disponibilidade flutuante de nutrientes, na qual possuem a versatilidade fisiológica de  
145 utilizar diferentes compostos, detectando principalmente carbono e nitrogênio (Askew,  
146 2008). Outras características que conferem proteção e uma maior virulência é a produção  
147 de biofilmes, através da produção multi-hifas e substâncias poliméricas extracelulares,  
148 que servem como uma barreira contra os efeitos prejudiciais da resposta de defesa do  
149 hospedeiro, drogas antifúngicas ou do estresse do ambiente (Seidler et al., 2008; Lalgé &  
150 Chamilos 2019). Em adição, por meio de bombas de efluxo fungos da seção *Fumigati*  
151 conseguem secretar substâncias poliméricas, reduzindo o contato com compostos  
152 antifúngicos, bem como produzir e secretar no hospedeiro metabólitos secundários, como  
153 por exemplo a gliotoxina, que possui papel imunossupressor, prejudicando a resposta  
154 imune do hospedeiro (Seidler et al., 2008; Lalgé & Chamilos 2019).

155 *Aspergillus* seção *Flavi* é relatado, depois da seção *Fumigati*, como a segunda  
156 principal causa de aspergilose invasiva e não invasivas (Frisvad et al., 2019) e é o agente  
157 mais comum de sinusite fúngica e infecções cutâneas, queratite e endoftalmite,  
158 rinossinusite, sinusite fúngica alérgica (SFA) e aspergiloma sinusal, já que o maior  
159 tamanho dos conídios da seção *Flavi*, pode favorecer seu depósito no trato respiratório

160 superior (Vandecasteele et al., 2002; Hedayati et al., 2007; Pasqualotto, 2009). Além  
161 disso, é a principal seção de *Aspergillus* que infecta insetos, sendo bastante associada  
162 também a infecções de culturas economicamente importantes como plantações de milho,  
163 trigo, amendoim já que é o responsável pela produção de micotoxinas, metabólitos  
164 secundários de fungos potencialmente prejudiciais aos animais ou aos seres humanos,  
165 sendo, portanto, exposto frequentemente a aplicações de fungicidas (Hedayati et al.,  
166 2007; Pasqualotto, 2009). As micotoxinas produzidas pela seção *Flavi* são chamadas de  
167 aflatoxinas sendo as principais B1, B2, G1 e G2. A aflatoxina B1 é um dos compostos  
168 naturais mais potencialmente carcinogênicos já conhecidos, se caracterizando por  
169 toxicidade aguda, teratogenicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, podendo levar  
170 ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC) em humanos e animais (Cao et  
171 al., 2022).

172 *Aspergillus* seção *Nigri* são relatados como a terceira seção mais  
173 frequentemente associada a doenças invasivas e aspergilomas (Denning, 1998) bem como  
174 doenças localizadas e disseminadas em animais domésticos e selvagens (Abarca et al.,  
175 2004). Mais comumente, a seção é relatada como agente causador da otomicose, além de  
176 sintetizar a segunda micotoxina mais importante depois das aflatoxinas, a ocratoxina A,  
177 de modo que *Aspergillus Nigri* possui tanto importância clínica, como agrícola (Howard  
178 et al., 2011). A ocratoxina A é um metabólito é relatado mundialmente por sua presença  
179 em diversos produtos como café, cerveja, uvas, cereais, vinhos e oleaginosas, em que as  
180 culturas são contaminadas pelo fungo, acarretando perdas de rendimentos para os  
181 produtores agrícolas (Astoreca et al., 2010). Essa toxina é conhecida pelos seus efeitos  
182 imunotóxicos, nefrotóxicos e carcinogênicos em animais (Astoreca et al., 2010), além de  
183 complicações renais em humanos (Severo et al., 1997). *Aspergillus* seção *Nigri* são muito  
184 utilizados pela biotecnologia e indústria alimentar para produção de enzimas como  
185 amilases, ácido cítrico, pectinases e fermentação (Ward et al., 2006).

186

## 187 **2.4 Aspergilose em humanos**

188 A aspergilose pode desencadear um amplo espectro de condições respiratórias  
189 causadas após inalação de conídios do gênero *Aspergillus*, sendo considerada uma das  
190 principais ameaças fúngicas a pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos  
191 (Sabino et al., 2016). Dentre as infecções fúngicas graves mais comuns nas unidades de  
192 saúde, aquelas causadas por *Aspergillus* spp., correspondem a segunda de maior  
193 ocorrência, atrás apenas das infecções por *Candida* spp. (Giacomazzi et al., 2016).



194 Estima-se que a saúde de mais de 10 milhões de pessoas sejam afetadas pela aspergilose  
195 no mundo, ocasionando mais de 1 milhão de mortes por ano (GAFFI, 2021).

196 Nas últimas décadas, tem se observado um aumento de casos de aspergilose  
197 devido a grande quantidade de pessoas imunocomprometidas e isso se agravou na  
198 pandemia de COVID-19, em especial nos pacientes que receberam tratamento  
199 imunossupressor e ficavam susceptíveis a infecções fúngicas secundárias (Hsu et al.,  
200 2011; Segrelles et al., 2020). Pacientes com aspergilose pulmonar associada da COVID-  
201 19 (CAPA) apresenta alta taxa de mortalidade, sendo superior a 59,1% sendo este um  
202 grave problema durante a pandemia (Pemán et al., 2020). Mesmo com diagnóstico  
203 precoce, a taxa de mortalidade por aspergilose é alta, estando próximo de 50% e podendo  
204 atingir 100% nas unidades de terapia intensiva (Hsu et al., 2011). A apresentação clínica  
205 da aspergilose é influenciada pela virulência fúngica e resposta imune do hospedeiro, e  
206 pode ser dividida em três categorias principais de acordo com a localização e colonização  
207 do fungo, sendo elas: alérgica, crônica e invasiva.

208 (1) aspergilose broncopulmonar alérgica (ABPA), ocorre em indivíduos já  
209 susceptíveis a reações de hipersensibilidade, estando associadas à asma e fibrose cística;  
210 (2) Aspergilose crônica (APC), comum em pacientes que possuíram ou possuem alguma  
211 doença pulmonar, como a tuberculose ou a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC),  
212 onde existe uma injúria e/ou cavidade do parênquima na qual o fungo prolifera, sendo  
213 portanto uma doença pulmonar progressiva; (3) Aspergilose invasiva (AI), é a categoria  
214 que apresenta maior risco de vida, ocorre em pacientes imunossuprimidos e se caracteriza  
215 pela angioinvasão e disseminação do fungo para diferentes órgãos (Paulussen et al., 2017;  
216 Latgé & Chamilos 2019). O grupo de risco para AI são predominantemente pacientes  
217 transplantados, neutropênicos ou que estão sendo submetidos a quimioterapia (Paulussen  
218 et al., 2017; Latgé & Chamilos 2019).

219 O diagnóstico da aspergilose, geralmente exige uma combinação de critérios,  
220 que se baseiam em três pilares: fatores dos hospedeiros, critérios clínicos e critérios  
221 microbiológicos (Latgé & Chamilos 2019). Nos critérios clínicos são incluídos, além da  
222 sintomatologia do paciente, exames de imagem do trato respiratório, e no critério  
223 microbiológico destacam-se avaliação microscópica direta e cultivo da amostra clínica e  
224 testes imunológicos, como a detecção de antígeno galactomanana (GM) ou de anticorpos  
225 específicos e/ou testes moleculares (Ullmann et al., 2017; Latgé & Chamilos 2019).

## 226 **2.5 Aspergilose em animais**

227 A aspergilose é relatada em cães, cavalos, abelhas, vacas, golfinhos e aves,  
228 sendo este último grupo por sua vez, um dos animais mais suscetíveis a infecção por  
229 *Aspergillus* spp. (Tell et al., 2005). Nos animais a forma mais comum de aspergilose difere  
230 de acordo com o hospedeiro. Dentre elas se pode citar: infecção nasosinusiais em gatos e  
231 cães, guturocistite em cavalos, aborto micótico e infecções da glândula mamária em  
232 bovinos, pneumonia associada com outras infecções em mamíferos marinhos, entre outras  
233 (Seyedmousavi et al., 2015).

234 Em se tratando de aves, a aspergilose é uma das doenças fúngicas mais  
235 frequentes, tanto em aves de produção, quanto silvestres e marinhas (Melo et al., 2023).  
236 Em aves marinhas, mais especificamente em pinguins em cativeiros e em centros de  
237 reabilitação, *Aspergillus* seção *Fumigati* é responsável por cerca de 98% das mortes (da  
238 Silva et al., 2015). O que contribui para esta alta taxa é o fato de as aves possuírem um  
239 sistema respiratório disposto em sacos aéreos, juntamente com peculiaridades de seu  
240 sistema imune e sua temperatura corporal elevada (38° C/ 42°C) na qual confere um  
241 ambiente totalmente propício e suscetível para o fungo *Aspergillus* spp. se proliferar  
242 (Melo et al., 2020), sendo a aspergilose diagnosticada até mesmo durante a rota migratória  
243 de pinguins, implicando na Saúde Única (Melo et al., 2023).

244 Os sinais clínicos de aspergilose em aves são difíceis de identificar e podem  
245 não ser evidentes até o estágio final da doença (Carrasco & Forbes, 2016). Um estudo de  
246 Silva e colaboradores (2015) demonstrou que anualmente, a mortalidade proporcional por  
247 aspergilose em centros de reabilitação de pinguins variou de 0 a 100%, com uma  
248 mortalidade geral proporcional de 48,5% para o período total do estudo. Outro grupo de  
249 animal marinho acometido por aspergilose são os cetáceos, na qual a infecção por  
250 *Aspergillus* pode ser primária ou secundária a estresse fisiológico, infecção crônica ou  
251 imunossupressão (Seyedmousavi et al., 2015). Já em répteis como tartarugas e crocodilos,  
252 *Aspergillus* da seção *Nigri* e *Fumigati* podem ser isolados de lesões cutâneas, geralmente  
253 como consequência de traumas, o que potencializa a invasão tecidual (Seyedmousavi et  
254 al., 2015).

255

## 256 **2.6 *Aspergillus* em ambientes**

257 *Aspergillus* é um fungo saprófito, portanto o habitat natural e o local onde são  
258 majoritariamente encontrados, é o solo. Nesses locais *Aspergillus* spp. desempenha um  
259 notável papel na ciclagem de nitrogênio e carbono, sendo essencial para a decomposição

260 da matéria orgânica (Latgé & Chamilos 2019). A maioria das espécies de *Aspergillus* são  
261 encontradas no meio ambiente e não são consideradas patogênicas (Samson et al., 2014).

262 Por conta de seu ambiente ser o solo, em campos agrícolas fungos do gênero  
263 *Aspergillus* são amplamente encontrados. No entanto, fungicidas azólicos como o  
264 tebuconazol e o propiconazol são baratos e eficientes, sendo amplamente utilizados na  
265 agricultura para prevenir e combater uma variedade de fungos que causam doenças em  
266 plantações, principalmente de cereais como milho, trigo, arroz dentre outros (Burks et al.,  
267 2021). Devido sua meia vida longa (110 a 375 dias no solo) e estrutura molecular estável,  
268 os azóis são capazes de resistir no ambiente por longos períodos de tempo com pequenas  
269 alterações em suas estruturas químicas, por exemplo, perda de algumas cadeias laterais;  
270 assim por serem facilmente transportados por rios através de drenagem de chuva e  
271 escoamento agrícola, esses azóis persistentes conseqüentemente contaminam solos, águas  
272 e principalmente contribuem com a pressão de seleção e mutações de resistência a este  
273 composto, por *Aspergillus* que estão presentes não apenas nos solos, como em toda a rota  
274 de escoamento (Hof, 2001; Burks et al., 2021). A consequência deste tipo de  
275 desenvolvimento de resistência entre ambiente e *Aspergillus* spp. é que humanos e  
276 animais em risco imunológico, podem ser expostos e infectados por cepas resistentes aos  
277 azóis no próprio ambiente (Mortensen et al., 2010).

278 Por conta de sua clássica característica ubíqua, na qual são funcionalmente  
279 encontrados nos mais variados locais do planeta, em ecossistemas costeiros, incluindo  
280 ambientes aquáticos que se estendem desde lagos até o oceano, *Aspergillus* se destaca,  
281 possuindo funções importantes na dinâmica da teia alimentar de águas superficiais  
282 (Grossart et al., 2019). Fungos filamentosos marinhos ocorrem predominantemente em  
283 habitats costeiros e desempenham um papel fundamental na volatilização, lixiviação,  
284 quebra de material orgânico como galhos, folhas, raízes, sendo fonte de alimento para  
285 pequenos invertebrados e fornecendo até 99% da entrada total de energia nesses  
286 ambientes (Ittner et al., 2018; Kumar et al., 2021).

287 As águas de escoamento agrícola geralmente desembocam em lagos e oceanos,  
288 como é o caso de Rio Grande, RS, na qual as águas utilizadas para plantações de arroz e  
289 cebola são totalmente desembocadas no Estuário da Lagoa dos Patos. O Brasil é um dos  
290 países com maior uso de pesticidas e grande parte desses pesticidas não são monitorados  
291 nas águas (von Ameln et al., 2021). Além disso, a ocorrência de agrotóxicos em ambientes  
292 aquáticos é intensificada pela escassez de saneamento e elevados níveis de consumo (von  
293 Ameln et al., 2021). Desses agrotóxicos o tebuconazol é um fungicida comumente

294 utilizados nos campos agrícolas e predominantemente presentes no ambiente aquoso  
295 (Wattanayon & Kasprzyk-Hordern, 2021). Estudos anteriores observaram que a  
296 exposição de *Aspergillus* spp. ao tebuconazol promove resistência cruzada aos triazóis  
297 clínicos e justifica os riscos para a saúde humana, animal e ambiental associado aos azóis  
298 agrícolas (Allizond et al., 2021). Dessa forma, azóis estáveis e *Aspergillus* spp., percorrem  
299 toda a rota de escoagem e encontram no estuário, parâmetros abióticos que exige do  
300 fungo, mecanismos de adaptação fisiológicos para sobrevivência em um ecossistema  
301 desafiador (Pérez-Illano et al., 2020). Uma vez que há esse estresse, existe a hipótese de  
302 que a pressão por uma adaptação, juntamente com resíduos químicos de azóis,  
303 influenciariam o desenvolvimento de mutações de resistência a antifúngicos (Toyotome,  
304 2019).

305

## 306 **2.7 Tratamentos Antifúngicos e Fungicidas agrícolas**

307 Um dos primeiros antifúngicos a ser desenvolvido foram os poliênicos na  
308 década de 1940, que representou um marco para a saúde pública para o tratamento de  
309 infecções fúngicas, apesar de seus graves efeitos colaterais e nefrotoxicidade (Dannaoui  
310 et al., 1999). Em 1980 o cetoconazol foi implementado como antifúngico oral e marcou  
311 a primeira geração de triazólicos na década de 1990, juntamente com o itraconazol e  
312 fluconazol, na qual até hoje seguem sendo medicamento de eleição, com uma ótima  
313 atividade antifúngica e segurança para o paciente (Dannaoui et al., 1999). No entanto,  
314 devido a apresentarem interações medicamentosas e já serem reportadas resistências,  
315 desenvolveu-se a partir dos anos 2000, os triazóis de segunda geração que incluem o  
316 posaconazol, voriconazol e ravuconazol, apresentando melhorias em relação a geração  
317 anterior (Maertens et al., 2004; Allen et al., 2015).

318 Atualmente três classes de agentes antifúngicos podem ser utilizadas no  
319 tratamento da aspergilose: os triazólicos, o poliênico anfotericina B e as equinocandinas.  
320 No entanto, devido à alta toxicidade da anfotericina B desoxicolato e o alto custo desse  
321 antifúngico em apresentação lipídica ou lipossomal, bem como das equinocandinas, como  
322 linha de frente para o tratamento da aspergilose, os medicamentos azólicos – itraconazol,  
323 voriconazol, posaconazol, isavuconazol – têm sido amplamente utilizados (Ullmann et  
324 al., 2017).

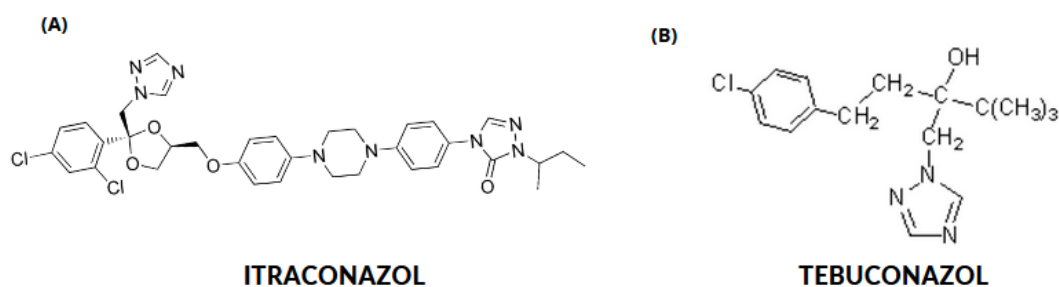
325 A anfotericina B (AMB) pertence à classe dos poliênicos, é bastante utilizada  
326 no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas pois diferente dos azóis, apresenta baixos  
327 relatos de resistência (Gray et al., 2012). O mecanismo de ação mais aceito é o modelo

328 de canal iônico, em que o AMB se liga ao ergosterol e se agrega para formar poros na  
329 bicamada lipídica do fungo, na qual esses poros aumentam a permeabilidade da  
330 membrana celular do fungo aos íons K<sup>+</sup> e outros cátions pequenos, permitindo assim o  
331 rápido esgotamento dos íons intracelulares que são vitais para a função celular (Kamiński,  
332 2014). O segundo mecanismo proposto induz a formação intracelular de espécies reativas  
333 de oxigênio (ROS) causando danos oxidativos e morte celular. O terceiro envolve  
334 absorção superficial, no qual o AMB extrai o ergosterol da bicamada lipídica, modelo  
335 conhecido como esponja de esterol (Kamiński, 2014). Existem três formulações da AMB:  
336 anfotericina B desoxicolato de sódio (disponível no sistema único de saúde), complexo  
337 lipídico de anfotericina B (ABLC) e anfotericina B lipossomal (L-AmB), sendo essas  
338 duas últimas formulações menos tóxicas, porém com maior dificuldade no acesso devido  
339 ao valor alto (CONITEC, 2022). A AmB desoxicolato de sódio, geralmente utilizada,  
340 desencadeia graves efeitos secundários limitantes da dose, estando associada a altas taxas  
341 de efeito colateral graves, como nefrotoxicidade (59%), hipocalcemia (88%) e anemia  
342 (95%) limitando o seu uso para pacientes de determinados grupos de risco e acarretando  
343 taxa elevada de mortalidade (40%) (Loução et al., 2018).

344 O itraconazol (ITZ) pertence a classe dos triazóis e é geralmente  
345 administrado em pacientes com quadro alérgico a crônico e voriconazol é indicado para  
346 indivíduos com aspergilose invasiva (Carrasco & Forbes, 2016). O mecanismo de ação  
347 dos triazólicos é inibir a biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana  
348 citoplasmática (Wang et al., 2018). Esta inibição é realizada através do bloqueio da  
349 enzima 14- $\alpha$ -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica (Arastehfar et al.,  
350 2021). Isso altera a fluidez da membrana, fazendo acumular fosfolípidos e ácidos graxos  
351 insaturados dentro das células fúngicas, sendo este um mecanismo seletivo que não afeta  
352 as células hospedeiras (Wang et al., 2018; Arastehfar et al., 2021).

353 Paralelamente a isso, na agricultura os triazólicos começaram a ser  
354 implantados na década de 1970 e seguiram sendo vastamente utilizados devido seu amplo  
355 espectro de atividade antifúngica, baixo custo e persistência no ambiente, com meia vida  
356 variando de 110 a 375 dias no solo (Hof, 2001). Atualmente existem mais de 30 fungicidas  
357 azólicos que são utilizados nos campos e apenas cerca de cinco utilizados na clínica para  
358 tratamento humano, o que reforça as escassas alternativas terapêuticas disponíveis  
359 (FRAC, 2019; Barber et al., 2020). Devido aos azóis utilizados no campo como pesticidas  
360 terem a mesma estrutura química (**Figura 1**) e mecanismo de ação dos administrados nas  
361 unidades de saúde para tratamento de aspergilose e outras doenças fúngicas, a resistência

362 cruzada é uma hipótese comprovada para os diversos relatos de resistência aos azóis, por  
 363 *Aspergillus* spp. (Meis et al., 2016; Zhang et al., 2017; Sharpe et al., 2018).



364

365 **Figura 1.** Fórmula estrutural do (A) Itraconazol, fármaco azólico comumente utilizado  
 366 para o tratamento de infecções fúngicas na clínica e (B) Tebuconazol, fungicida azólico  
 367 comumente utilizado nos campos agrícolas (Resolução nº160 de 19/01/10 ANVISA).

368

## 369 2.8 Mecanismos de Resistência

370 O mais comum mecanismo de resistência azólica encontrado na seção  
 371 *Fumigati* são mutações no gene codificante para a proteína alvo dos fungicidas azólicos,  
 372 o esteroide 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51A), a enzima chave da via de biossíntese do ergosterol  
 373 (Burks et al., 2021). Em geral, a resistência a azóis de ocorrência ambiental em *Fumigati*  
 374 é caracterizada por mutações envolvendo repetições em tandem – padrões de repetição  
 375 sequencial de bases nitrogenadas, geralmente presentes em regiões não codificantes de  
 376 um genoma (TRs) – que regulam a expressão na região promotora de CYP51A  
 377 acompanhadas por mutações pontuais dentro deste gene, que diminuem a afinidade dos  
 378 azóis pela proteína alvo (Rhodes et al., 2022).

379 Dentre as mutações mais relatadas está a integração de uma repetição em  
 380 tandem de 34 pb (TR 34) na região promotora do gene, que leva a uma superexpressão  
 381 de cyp 51A juntamente com uma substituição de leucina 98 por histidina (TR 34 /L98H).  
 382 Outra mutação é a inserção de repetição em tandem de 46 pb na região promotora e  
 383 substituições de tirosina 121 por fenilalanina e treonina 289 por alanina (TR 46  
 384 /Y121F/T289A). E por fim outra mutação relatada é uma repetição em tandem de 53 pb  
 385 na região do promotor sem qualquer substituição de aminoácidos cyp 51A (Menendez et  
 386 al., 2016; Fraaije et al., 2020).

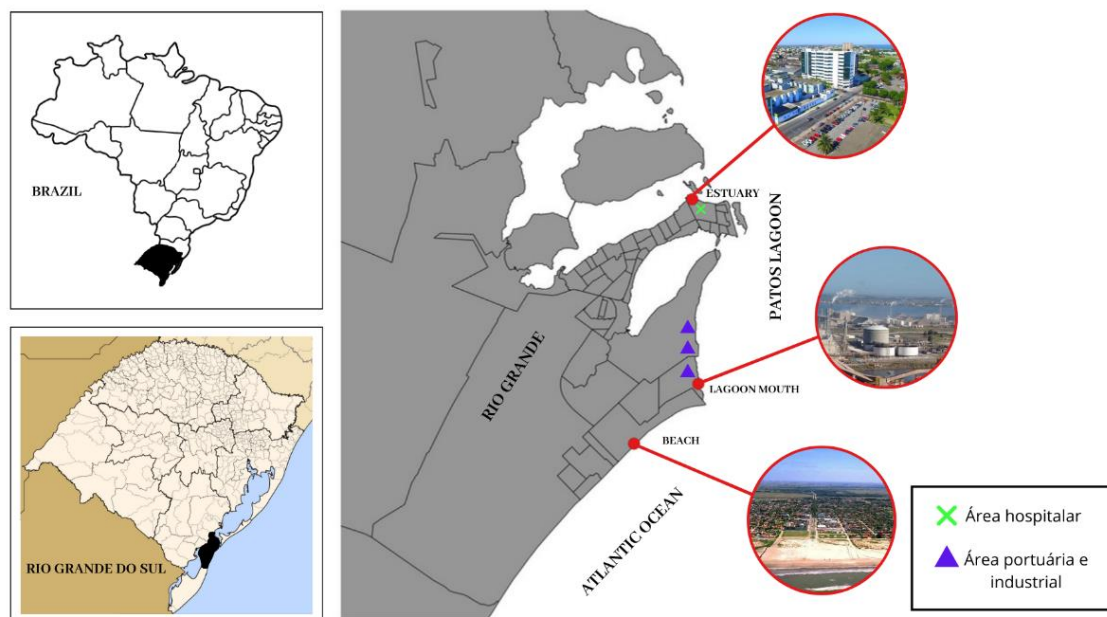
387 Os alelos de ocorrência mais comum são TR 34 /L98H e TR 46  
388 /Y121F/T289A e estão relacionados com taxas de resistência ao itraconazol e ao  
389 voriconazol respectivamente, tanto na clínica quanto no ambiente (Ingen et al., 2015;  
390 Wiederhold et al., 2016; Rhodes et al., 2022). Visto isso, a resistência fúngica é definida  
391 como a habilidade do fungo de se proliferar em doses de antifúngicos que a princípio se  
392 tem descrito que exercem atividade antifúngica. Estes valores são estabelecidos através  
393 da Concentração Inibitória Mínima (CIM) cuja determinação está padronizada por  
394 comitês nacionais e internacionais, como por exemplo o *Clinical Laboratory Standards*  
395 *Institute* (CLSI), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)  
396 e o Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST).

397

## 398 **2.9 Ecossistema Costeiro**

399 O local estudado no presente estudo se está situado no município de Rio  
400 Grande, planície costeira do Rio Grande do Sul (Figura 2). A Lagoa dos Patos,  
401 considerada a maior laguna “estrangulada” (Kjerfve, 1986), recebe águas de cerca de 2/3  
402 do estado do Rio Grande do Sul, por meio dos rios e área de drenagem (Kjerfve, 1986).  
403 A parte do estuário médio onde se encontra um dos locais de coleta é caracterizado pela  
404 presença de área urbana na costa do estuário possuindo inclusive hospitais em sua  
405 proximidade sendo eles a Associação de Caridade Santa Casa do Rio Grande e o hospital  
406 universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr. (HU-FURG/Ebserh). Além disso nas  
407 proximidades desse sítio de coleta se encontra o Centro de Recuperação de Animais  
408 Marinhos (CRAM), que recebem animais marinhos debilitados para tratamento  
409 (Monteiro et al., 2005). O segundo ponto de coleta. está localizado na Barra de Rio  
410 Grande, local da desembocadura da lagoa onde a água do estuário se encontra diretamente  
411 com o Oceano Atlântico. Este sítio de coleta é marcado por indústrias presentes em toda  
412 extensão da Barra, com produção de metais, fertilizantes, alimentos, além de ser uma  
413 região portuária e pesqueira (Odebrecht et al., 2013). O terceiro ponto de coleta está  
414 localizado na praia do Cassino, ambiente marinho com alta frequência de banhistas e  
415 pescadores (Odebrecht et al., 2013).

416



417

418 **Figura 2.** Imagem referente a localização da área de estudo, destacando os locais de  
 419 amostragem na cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A porção sul da Lagoa  
 420 dos Patos se conecta com o Oceano Atlântico, região onde estão os locais de coleta. O  
 421 ponto de coleta no estuário médio abrange parte da Lagoa dos Patos, local de influência  
 422 urbana que possui proximidade à hospitais. O ponto de coleta desembocadura da Lagoa,  
 423 se localiza na Barra de Rio Grande, onde ocorre a troca de água entre a lagoa e o oceano,  
 424 local caracterizado por uma área industrial, portuárias e pesqueiras. O ponto de coleta  
 425 praia, se localiza na praia do Cassino e é caracterizado por área marítima de lazer. (Fonte:  
 426 autor/ Google Imagens, 2024).

427

428 Neste cenário, a presença de *Aspergillus* spp. nesses locais pode ser um  
 429 problema devido a possibilidade de aerossolização dos conídios e transporte através do  
 430 vento (Melo et al., 2020; Li et al., 2022). Assim, pessoas imunocomprometidas, pacientes  
 431 hospitalizados, além de animais que transitam por todos esses ambientes podem ser  
 432 infectados com esses conídios e desenvolverem aspergilose (Melo et al., 2020). Além  
 433 disso, a expansão urbana e industrial de Rio Grande altera a dinâmica hidrográfica do  
 434 estuário, já que tanto na parte do estuário médio, quanto na desembocadura da lagoa  
 435 ocorre desemboque de esgoto doméstico e industrial, o que favorece o desenvolvimento  
 436 de fungos nesses locais (Almeida et al., 1993; Baumgarten et al., 2017).

437

438

439 **2.10 Variáveis abióticas e adaptações em ambiente costeiro**



440 Nos sistemas aquáticos, os fungos podem ser uma parte significativa da  
441 comunidade eucariótica e encontram nestes habitats, condições de vida adversas e  
442 flutuantes para o seu metabolismo (Pagani et al., 2023). Apesar do estresse osmótico e  
443 iônico relacionado à alta salinidade que impede a sobrevivência de muitos  
444 microrganismos (Huang et al., 2011), para prosperar em condições adversas, os fungos  
445 precisam criar diferentes mecanismos de adaptação e para isso, possuem estratégias  
446 (Ślizewska et al., 2022). Silveira e colaboradores (2013) observaram que em locais com  
447 alta salinidade não houve isolamento fúngico, indicando um fator limitante do  
448 crescimento, o que diverge de outros estudos que isolaram *Aspergillus* spp. provenientes  
449 de água salgada (Gomes et al., 2008; Oliveira et al., 2011, Frenkel et al., 2022). O  
450 mecanismo de “baixo teor de sal”, é uma adaptação dos fungos para acumular solutos  
451 orgânicos como polióis, açúcares, glicerol no interior da célula, para assim manter o  
452 equilíbrio osmótico sem absorver sais inorgânicos (Coker, 2019).

453 Estudos anteriores mostram que a temperatura ideal para o crescimento de  
454 fungos marinhos está entre 20 e 30°C (Ibrahim et al., 2011), capazes de crescer em  
455 temperaturas tão baixas quanto 4°C (Mouton et al., 2012). As estratégias de tolerância a  
456 temperaturas mais baixas ou mais altas nos fungos incluem a produção de proteínas  
457 anticongelantes, aumento do número de ácidos graxos para prevenir a  
458 agregação/desnaturação de proteínas e estabilizar a fluidez da membrana plasmática  
459 (Coker, 2019). O oxigênio assim como a temperatura, desempenha um importante papel  
460 para os fungos, já que por serem aeróbios, necessitam do oxigênio para seu  
461 desenvolvimento, atividades metabólicas e esporulação, exigindo uma porcentagem  
462 mínima entre 0,5% e 2,5% de oxigênio disponível (Hall & Denning, 1994). A clorofila A  
463 é uma importante variável nos ecossistemas aquáticos, sendo o principal pigmento  
464 responsável pela fotossíntese sendo fonte de oxigênio para os fungos (Esteves, 1988).

465 Nos ambientes costeiros a turbidez é uma das variáveis encontradas, sendo a  
466 medida da dificuldade de um feixe de luz atravessar uma determinada quantidade de água,  
467 conferindo uma aparência turva à mesma, geralmente por conta de sedimentos de  
468 areia/argila que ficam em suspensão no sistema (Lunt & Smee, 2014). Este sedimento  
469 ocorre principalmente no meio e nos canais do estuário e são compostos por silte (80%)  
470 e argila (15%) (Tavora, 2022). O efeito das ondas na praia faz a turbidez e o séston  
471 alcançar maiores variações neste local (Piedras, 2012; Chiva et al., 2018). O séston é  
472 classificado como o material particulado orgânico em suspensão (MPS) no corpo d’água,  
473 podendo ser os fitoplâncton, microfitobentos, fragmentos de plantas superiores ou os

474 carbonos provenientes de fontes marinhas, terrestres, de água doce e antropogênicas  
475 (Meseck et al., 2017). Além disso, a fase da maré influencia não apenas na quantidade de  
476 material suspenso, mas também na sua composição, que de acordo com o vento, direciona  
477 os sedimentos para dentro ou fora do estuário, o que varia conforme o período climático  
478 (Pereira et al., 2008; Tavora et al., 2022). Por conta do solo ser o habitat principal do  
479 gênero *Aspergillus*, essas partículas podem ser substratos para os fungos em ambientes  
480 aquáticos (Tavora et al., 2022).

481           Em relação ao alimento, os fungos assimilam carbono e nitrogênio e é através  
482 da decomposição de fontes orgânicas/inorgânicas em que eles obtêm esses  
483 compostos (Meti et al., 2011). Muitos fungos obtêm o nitrogênio através da amônia  
484 presente no ambiente (NH<sub>4</sub>) e esta assume elevada importância nos ecossistemas  
485 aquáticos por ser uma das principais fontes de nitrogênio, assimiladas pelos produtores  
486 primários (Dellagiustina, 2000; Meti et al., 2011).

487

## 488 **2.11 Ambiente e Resistência**

489           Desde 1997, diversos relatos de resistência aos azóis tem sido descrito para a  
490 seção *Fumigati*, na qual a frequência se intensificou nos últimos anos, resultando assim,  
491 em um desafio terapêutico (Denning et al., 1997; Camps et al., 2012; Sabino et al., 2016;  
492 Burks et al., 2021). De modo geral, acredita-se que essas mutações de resistência surjam  
493 pela exposição a: (1) terapia azólica a longo prazo (Takeda et al., 2021) e (2) contato  
494 indireto do fungo com fungicidas agrícolas (Kang et al., 2022). Embora a resistência  
495 azólica ocorra normalmente nos pacientes durante a terapia com azol, a principal via de  
496 mutações de resistência, é através do ambiente (Meis et al., 2016).

497           Mutações que conferem resistência azólica em *Fumigati* coletados do seu  
498 habitat natural, evidenciaram ser responsáveis por mais de 80% da resistência clínica aos  
499 azóis (Zhang et al., 2017). Ainda não está claro como surgem cepas resistentes aos azóis  
500 no ambiente, mas hipóteses sugerem que a resistência ambiental a antifúngicos, se  
501 desenvolve a partir do uso indevido de fungicidas agrícolas, assim como o desequilíbrio  
502 do ecossistema, somada a exposição contínua dos fungos a esses agentes fungicidas,  
503 podendo assim induzir uma seleção inesperada e novas mutações de resistência  
504 (Toyotome, 2019; Lestrade et al., 2018). Dessa forma, o contato prolongado de espécies  
505 patógenas que habitam ambientes aquáticos com substâncias antifúngicas descartadas  
506 constantemente nesses habitats, estimula a expressão de mecanismos de resistência

507 fúngica, selecionando os descendentes com maior capacidade de crescer e se reproduzir  
508 na presença do azol (Meade & Garvey, 2017; Sharpe et al., 2018; Lestrade et al., 2018).

509 Isso está ligado, entre outros fatores, com rotas de descarte e tratamento de  
510 resíduos e escoamento agrícola (Vaezi et al., 2018). Fungicidas azólicos são utilizados em  
511 grande escala para controle de pragas, em especial, no extremo sul do Brasil, para o  
512 plantio de arroz (Freitas et al., 2015; Vaezi et al., 2018). A água utilizada nesse plantio,  
513 em geral contendo *Aspergillus* spp. e resíduos estáveis de azóis, é escoada para rios,  
514 lagoas costeiras e estuários, como o Estuário da Lagoa dos Patos e posteriormente, chega  
515 ao mar (Hollomon, 2017). Desta forma, se constitui uma rota indireta de contato entre  
516 pessoas, animais, antifúngicos e fungos patógenos, que podem potencialmente  
517 desencadear uma resistência cruzada a doenças clínicas, limitando o sucesso do  
518 tratamento (Hollomon, 2017).

## 519 **2.12 *Aspergillus*, resistência e o contexto *One Health***

520 Ao observar a origem da maioria das doenças infecciosas, que principalmente  
521 nos últimos anos foi bastante comentada devido a pandemia de COVID-19, se percebe  
522 uma importante característica: a intrínseca relação entre meio ambiente, animais e  
523 humanos em seu surgimento (Limongi & Oliveira, 2020). A partir deste pensamento,  
524 surge a importância do olhar sistêmico perante o todo, que é a essência de uma abordagem  
525 *One Health* - Saúde Única (OHHLEP, 2022). Com essa visão ampla e integrada, que visa  
526 o equilíbrio entre a saúde ambiental, humana e animal, será mais fácil entender as razões  
527 para determinadas doenças, mantendo a conscientização e vigilância acerca das mesmas  
528 (Limongi & Oliveira, 2020).

529 Um exemplo disso, é o comportamento migratório comum que as aves  
530 realizam rotineiramente durante o seu ciclo de vida, com deslocamentos de curta a média  
531 distância para alimentação e descanso que geralmente ocorre em campos agrícolas.  
532 Nesses locais as cepas de *Aspergillus* sofrem pressão seletiva por estarem frequentemente  
533 em contato com azóis e as aves podem não apenas se contaminar ou se infectar com essas  
534 cepas como carregar consigo para outros locais. As migrações sazonais podem estar  
535 associadas a dispersão de cepas de *Aspergillus* e inserção cepas fúngicas resistentes em  
536 diferentes regiões do percurso, na qual humanos, ambiente e outros animais podem ser  
537 afetados (Melo et al., 2020).

538 A perspectiva de Saúde única é essencial para compreender melhor o papel  
539 dos fungicidas agrícolas no surgimento da resistência aos azóis em *Aspergillus*, com

540 consequente falha no tratamento e mortalidade, especialmente em humanos. Pois  
541 geralmente *Aspergillus* não é o principal alvo dos fungicidas utilizados nas lavouras, mas  
542 por serem saprófitos e onipresentes, é comum a presença de seus conídios nos campos  
543 agrícolas, na qual o uso de fungicidas azólicos pode resultar na seleção de cepas  
544 resistentes no ambiente (Sewell et al., 2019).

545           A abordagem *One Health* aqui é essencial pois o entendimento da prevenção  
546 do desenvolvimento de cepas fúngicas resistentes só será alcançado se mudanças  
547 holísticas acontecerem, como: o uso racional de fungicidas, que apesar de essencial para  
548 a produção mundial de alimentos, precisa ter seu limite de dose; a correta administração  
549 de medicamentos para o tratamento de doenças fúngicas; a atenção a doenças que são  
550 negligenciadas; bem como a prevenção da poluição que prejudica o meio ambiente e  
551 animais, os deixando susceptíveis a infecções (Xavier et al., 2007). Em suma, tudo está  
552 conectado, uma vez que o ciclo voltará e afetará todos, caso não haja prevenção,  
553 vigilância e informação.

554 **3. OBJETIVOS**

555 **3.1 Objetivo Geral**

- 556 • Determinar a taxa de isolamento de *Aspergillus* spp. em amostras de água de um  
557 ecossistema costeiro e sua relação com características abióticas, e determinar o  
558 perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados.

559 **3.2 Objetivos Específicos**

- 560 • Descrever e comparar os dados abióticos das amostras de água incluídas de  
561 acordo com os sítios de coleta;
- 562 • Identificar e comparar a taxa de isolamento das seções *Fumigati*, *Nigri* e *Flavi*  
563 nos distintos sítios de coleta;
- 564 • Avaliar a influência de parâmetros abióticos da água na taxa de isolamento das  
565 distintas seções de *Aspergillus* spp.;
- 566 • Avaliar o perfil de suscetibilidade a antifúngicos dos isolados de *Aspergillus* spp.  
567 do ambiente.

568 **4. MANUSCRITO**

569 Manuscrito a ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* (Fator de impacto 2,2),  
570 classificação A2 para área de Medicina II. As normas de submissão podem ser consultadas  
571 em:

572 <https://link.springer.com/journal/42770/submission-guidelines>

***Aspergillus* spp. FROM COASTAL ENVIRONMENT: INFLUENCE OF ABIOTIC FACTORS ON ISOLATION RATE AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY**

Emília Ferreira Andrade<sup>1,2</sup>; Bruna Muradás Esperon<sup>1,2</sup>; Vanice Rodrigues Poester<sup>1,2</sup>; Jéssica Estefania Dávila Hidalgo<sup>1,2</sup>; Cassiane Ferreira Lessa dos Santos<sup>1,2</sup>, Manuel Macedo de Souza<sup>3</sup>; Cecília Bittencourt Severo<sup>4</sup>; Melissa Orzechowski Xavier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina (FaMed), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Faculdade de Medicina (FaMed), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, Brasil. <sup>3</sup>Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração - Sítio do Estuário da Lagoa dos Patos e costa Adjacente (PELD-ELPA) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), RS, Brasil. <sup>4</sup>Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, RS, Brasil.

**Corresponding author:**

Emília Ferreira Andrade – emiliaferreiraandrade@hotmail.com

Laboratório de Micologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rua General Osório, s/n, Centro, CEP 96200-400, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

573 **ABSTRACT**

574 *Aspergillus* is a genus of ubiquitous filamentous fungi found in various ecosystems and  
 575 recognized as opportunistic pathogen in humans, plants, and animals. Reports of resistant  
 576 strains to recommended antifungals have been increasing, with the environment playing  
 577 a significant role in these high rates due to the use of azoles in agriculture. As azole  
 578 residues are washed away by effluents and can exert selection pressure on *Aspergillus*  
 579 spp. isolates present in coastal environments, we aimed to determine the isolation rate of  
 580 *Aspergillus* spp. in water samples and its relationship with abiotic characteristics, as well  
 581 as to determine the antifungal susceptibility profile of the isolates. For that, water samples  
 582 were collected monthly at three environmental sites over 25 months. Abiotic parameters  
 583 between sampling sites, frequency of positive *Aspergillus* collections, sections, and the  
 584 influence of these parameters on fungal isolation were determined, as well as antifungal  
 585 susceptibility using the microdilution assay. *Aspergillus* spp. was detected in 44% of the  
 586 samples (n=33/75) and totaled 67 isolates, with 59.7% being *Fumigati*, 22.3% *Flavi*, and  
 587 17.9% *Nigri*. The collection site with the highest *Aspergillus* rate was the estuary (39.4%),  
 588 followed by the beach (36.4%) and lagoon mouth (24.2%), with parameters such as

589 seston, dissolved oxygen, and turbidity influencing section isolation. Resistance was  
590 found in 3% (2/67) of the isolates, belonging to the *Nigri* section. Studies on detection  
591 and resistance of *Aspergillus* in aquatic ecosystems are rare in the literature. The present  
592 work demonstrates that aquatic environments can serve as a source of infection, in  
593 addition to aggregating data on abiotic parameters for *Aspergillus* spp. and report the  
594 presence of resistant isolates in a coastal environment, proving the need for environmental  
595 surveillance and monitoring in the face of fungal resistance.

596 Keywords: Estuary, marine environments, abiotic parameters, fungal resistance, One  
597 Health, filamentous fungi.

## 598 1 INTRODUCTION

599 *Aspergillus* is a genus of filamentous fungi, characterized as saprophytic and  
600 ubiquitous, with species occurring worldwide in a diversity of habitats (Arastehfar et al.,  
601 2021). Characteristics contributing to its adaptation success include the production of a  
602 wide variety of enzymes and its small conidia (2.5  $\mu\text{m}$  in the *Fumigati* section and 3 to  
603 10  $\mu\text{m}$  in the *Nigri* and *Flavi* sections), infective structures able of being transported long  
604 distances by wind, across different ecological niches. As a result, this fungal genus is one  
605 of the most found in air, soil, and water, and it is an important pathogen of plants, animals,  
606 and humans (Silva, 2009; Latgé & Chamilos, 2019; Arastehfar et al., 2021).

607 In humans, these small conidia can eventually be inhaled and cause allergic,  
608 chronic, or invasive infections (Latgé & Chamilos, 2019; Schürch et al., 2023) in  
609 susceptible hosts, depending on the individual's immunological status and/or lack of  
610 pulmonary integrity (Paulussen et al., 2017; Otu et al., 2023). Among the clinically  
611 relevant sections, the *Fumigati* section stands out as the main cause of aspergillosis,  
612 followed by the *Nigri* and *Flavi* sections (Iatta et al., 2016; Nargesi et al., 2022). In 2022,  
613 the World Health Organization issued the first list of priority fungal pathogens,  
614 highlighting fungi of critical and high importance to human health. Among the 19  
615 pathogens listed, *Aspergillus* section *Fumigati* was classified as a critical risk due to its  
616 threat to health and high mortality rates, necessitating surveillance and investigation of  
617 this pathogen, as well as monitoring of fungal resistance (WHO, 2022; Fisher & Denning,  
618 2023).

619 Three classes of antifungals can currently be used in the treatment of  
620 aspergillosis: triazoles (itraconazole), polyenes (amphotericin B), and echinocandins  
621 (Denning, 2022). Triazoles are the frontline treatment, although reports of increased



622 intrinsic and/or acquired resistance to azoles have been described worldwide in  
623 *Aspergillus* spp. isolates (Arastehfar et al., 2021; De Francesco, 2023). This increase is  
624 related to selection pressure, either through long-term azole therapy in the clinic (Verweij  
625 et al., 2013) or primarily through the common use of azole-based fungicides in agriculture  
626 due to their low cost and broad spectrum of action, even knowing it can persist in the  
627 environment for long periods (Hof, 2001).

628           Agricultural runoff waters typically flow into lakes, rivers, and oceans.  
629 Thus, stable azoles and *Aspergillus* spp. travel and meet themselves along the entire  
630 drainage route. During this route distinct abiotic parameters in watersheds demand  
631 physiological adaptation mechanisms by the fungus for its survival in a challenging  
632 ecosystem (Pérez-Illano et al., 2020; Maggi et al., 2023). Once this stress occurs, there is  
633 a hypothesis that the pressure for adaptation, along with chemical residues of azoles in  
634 the environment, influences the development of cross-resistance mutations to antifungals  
635 (Chowdhary et al., 2012; Toyotome, 2019).

636           One of the typical areas that receive effluents from various sources is the  
637 estuaries, which are formed at the end of a lagoon when it meets the ocean. These areas  
638 are rich in organic matter, including agricultural discharges (Almeida et al., 1993), being  
639 propitious to induce selective pressure in microorganisms. However, studies regarding  
640 *Aspergillus* spp. resistance in water environments are scarce. Burks et al. (2021)  
641 conducted a review including articles focused on the *Fumigati* section detection from the  
642 environment and its antifungal resistance profile, showing that out of the 52 articles  
643 identified, only 0.3% were conducted with isolates from water samples. This minor  
644 percentage highlights the lack and the need for attention to these environments as  
645 potential reservoirs of potentially pathogenic fungi and the surveillance of its antifungal  
646 susceptibility profile to a better knowledge of the role of this niche in contribute to an  
647 increasing in rates of *Aspergillus* spp. resistance.

648           The environmental role in the acquisition of clinical resistance by *Aspergillus*  
649 spp. is mainly supported by azole-naive patients who had strains of *Aspergillus* section  
650 *Fumigati* resistant to the drug at the beginning of the treatment (Snelders et al., 2009;  
651 Verweij et al., 2009; van der Linden et al., 2013; Dauchy et al., 2018). Reports of  
652 environmental resistance are common in European, African, and Asian countries. In the  
653 Americas, studies reporting this data in countries such as the United States, Colombia,  
654 and Argentina have been published in the last years (Dunne et al., 2017; Gonçalves, 2017;  
655 Sharpe et al., 2018; Trovato et al., 2018; Friedman & Schwartz, 2019; Buks et al., 2021).

656 On the other hand, in Brazil, literature shows that the presence of *Aspergillus* and its  
657 resistance profile in the environment are rarely studied, as well as its association with  
658 abiotic parameters of the samples (Bedin et al., 2018; Friedman & Schwartz et al., 2019).

659 All this context reinforces the need for surveillance in environmental sources  
660 of potential human infection (Sabino et al., 2016), emphasizing the challenge of "One  
661 Health," which aims to include environmental, animal, and human health as one (Banerjee  
662 et al., 2021). Thus, we aimed to evaluate the occurrence of *Aspergillus* spp. in water  
663 samples from a coastal ecosystem and its relationship with abiotic characteristics,  
664 determining the antifungal susceptibility profile of these environmental isolates.

## 665 **2 MATERIAL AND METHODS**

### 666 **2.1 Local, climate and period of the study**

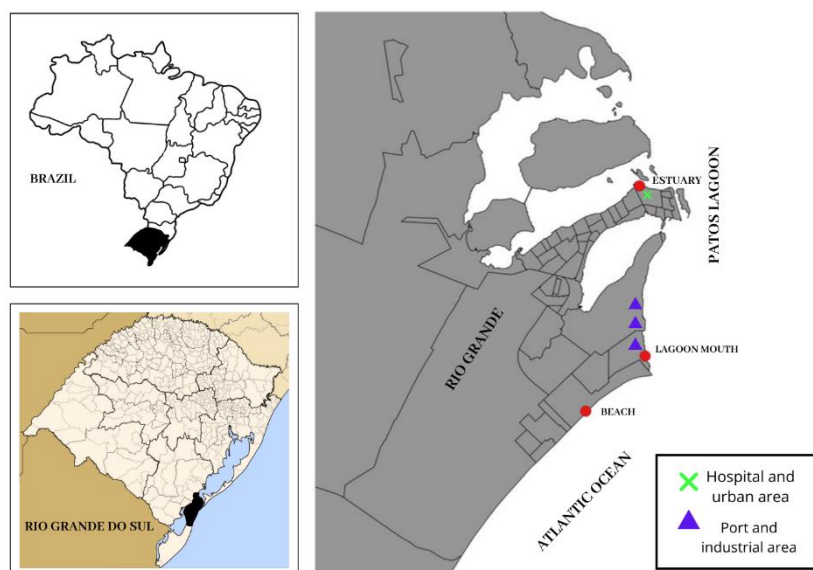
667 The study was conducted during a period of 25 months (from July 2021 to  
668 July 2023) in a coastal environment in the southernmost region of Brazil (32° 1' 60" S,  
669 52° 5' 55" W), which is bordered by the Atlantic Ocean and the Patos Lagoon (Rio Grande,  
670 Rio Grande do Sul). The climate in the region is subtropical characterized by four distinct  
671 seasons which has an average temperature ranging from 2.3 to 18.5°C in winter, from 8.3  
672 to 24.7°C in spring, from 11.5 to 28°C in summer and from 3.8 to 21°C in autumn. The  
673 average relative humidity is high during all the year, ranging from 77% in summer months  
674 to 85% in the winter period (Wrege, et al., 2012).

### 675 **2.2 Water Samples**

676 Coastal surface waters were collected from three specific sites, monthly (one  
677 sample from each site/month), as a subproject of the major institutional project PELD –  
678 ELPA (Long-Term Ecological Research in the estuary of Patos Lagoon and Adjacent  
679 Marine Coast). The sampling specific sites corresponded to: 1) Middle Estuary of Patos  
680 Lagoon (-32.0253° S, -52.1060° W); 2) Lagoon Mouth (-32.1495° S, -52.1009° W); and  
681 3) Sea/Beach (-32.2066° S, -52.1738° W) from South Atlantic (Figure 1).

682 A total volume of 1000mL of each site of water sample were collected in a depth  
683 of approximately 20 cm, using sterile bottles and kept refrigerated until its processing for  
684 mycological analyses within a maximum period of 12 hours. During each collection,  
685 abiotic characteristics of the water, such as temperature (°C), salinity (psu), turbidity  
686 (FNU), seston (mg/L), dissolved oxygen (mg/L), chlorophyll A (µg/l), and ammonia  
687 NH<sub>4</sub>, were analyzed from each site using a YSI-ProDSS multiparameter probe (USA).

688



689

690 **Figure 1.** Image regarding the location of the study area, highlighting the sampling sites  
 691 in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil. The southern portion of Patos  
 692 Lagoon connects to the Atlantic Ocean, where the collection sites are located. The  
 693 collection point in the middle estuary encompasses part of Patos Lagoon, an urban-  
 694 influenced area that is close to hospitals. The collection point at the lagoon's mouth is  
 695 located at Barra of Rio Grande, where water exchange occurs between the lagoon and the  
 696 ocean, characterized by an industrial, port, and fishing area. The beach collection point is  
 697 located at Beach of Cassino and is characterized by a maritime leisure area. (Source:  
 698 author).

699

### 700 2.3 Mycological Analyses of Water Samples

701 Water samples were processed using the membrane filtration technique culturing  
 702 with some adaptations, employing a vacuum filtration system. Briefly, following  
 703 filtration, the nitrocellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$ ) was dispensed in a falcon tube with  
 704 10mL of sterile saline solution and vortexed for elution. The membrane was then placed  
 705 onto Sabouraud-dextrose agar plates (Difco®, Detroit, MI, USA) supplemented with  
 706 antibacterials (gentamicin - Hypofarma®) and (chloramphenicol - Alamar Tecno-  
 707 Científica Ltda - SP) (SDAGC). The remaining solution in the tube was centrifuged at  
 708 3500 rpm (3 min), and two aliquots (500  $\mu\text{L}$ ) of the precipitate were also inoculated onto  
 709 two SDAGC. Plates were incubated at 30°C for seven days, and all *Aspergillus* spp.  
 710 isolates were purified and phenotypically identified at the section level based on  
 711 macroscopic and microscopic characteristics.

## 712 2.4 Antifungal Susceptibility Testing

713 All *Aspergillus* sections *Fumigati*, *Flavi*, and *Nigri* isolated from the water  
714 samples were submitted to the broth microdilution technique according to the M38-A2  
715 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), to evaluate their  
716 susceptibility profile to itraconazole (ITZ) and amphotericin B (AMB), through the  
717 analyzes of the Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) which is defined as the lower  
718 concentration at which 100% of the fungal growth is inhibited.

719 Drugs were obtained in powder form (ITZ: Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) and  
720 liquid form (AMB: Cristália®, Itapira, SP, Brazil). Stock solutions were prepared in 100%  
721 dimethyl sulfoxide (DMSO) and kept at -20°C. Serial dilutions of the stock solutions were  
722 performed to allow the final drug concentrations in the wells ranging from 0.125 to 8  
723 µg/mL for ITZ and 0.25 to 16 µg/mL for AMB.

724 For inoculum standardizing all pathogenic *Aspergillus* isolates were subcultured  
725 on potato dextrose agar (PDA - KASVI®, Spain) for 72 hours at 37°C to produce conidia.  
726 Then, a solution of conidia was prepared adding sterile saline and tween 20 (Synth®) to  
727 the cultures and adjusted by spectrophotometry. Once standardized, the inoculum was  
728 diluted in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640; GLIBCO®, Waltham,  
729 MA, USA) supplemented with MOPS (MOPS, Êxodo Científica - Sumaré/SP). The pour  
730 plate method was performed as a confirmation of the final inoculum concentration used.

731 Microplates were filled with the standardized inoculum and the drugs  
732 concentrations and incubated for 48 hours at 35°C for visual reading to MIC  
733 determination. Tests were performed in duplicate, and a quality control strain (*Aspergillus*  
734 *fumigatus* - ATCC Mya 3627) was used in all experiments. Isolates with MIC values >8  
735 µg/mL of ITZ and >2 µg/mL AMB were classify as resistant isolates (CLSI, 2008).

## 2.5 Statistics

736 Descriptive analyses of data regarding abiotic parameters from the water samples  
737 were performed and non-parametric Kruskal-Wallis test and Pearson chi-square test were  
738 conducted to evaluate the impact of these parameters in the isolation of each *Aspergillus*  
739 sections (*Fumigati*, *Nigri*, and *Flavi*). The statistical program SPSS 20.0® (IBM Corp.,  
740 Armonk, NY, USA) was employed, and values of p<0.05 were considered statistically  
741 significant. Geometric mean of MIC, MIC 50 and MIC 90 (minimum concentration able

742 to inhibit 50% and 90% of the isolates tested, respectively) were determined from both  
 743 drugs tested against each section of *Aspergillus* spp.

### 744 3 RESULTS

745 Of the 75 water samples included in the study, 21 were collected in winter, 18  
 746 in spring, 18 in summer, and 18 in autumn. The abiotic parameters of the samples are  
 747 described in (Table 1), highlighting that temperature, turbidity, dissolved oxygen, and  
 748 ammonia concentration were similar among the three sampling sites ( $p < 0.05$ ), with  
 749 means ranging from 19.5 to 20°C, 16.95 to 38.71 FNU, 7.7 to 7.9 mg/L, and 3.4 to 4.1  
 750 µg/l, respectively. On the other hand, salinity, seston, and chlorophyll A differed  
 751 statistically among the sampling sites, with the lowest average salinity and seston at site  
 752 1 (estuary) at 19.36 psu and 94.36 mg/L, respectively, and the lowest chlorophyll A at  
 753 site 2 (lagoon mouth) at 4.77 µg/l. The highest averages for salinity, seston, and  
 754 chlorophyll A were at site 3 (beach) at 31 psu; 157.15 mg/L; 12.06 µg/l, respectively.

755 Table 1: Data on abiotic parameters of water samples (n=75) according to the geographic location of the  
 756 sampling sites, during the period from July 2021 to July 2023, totaling 25 collections at each site.  
 757

Parameter	Site 1 Estuary	Site 2 Lagoon mouth	Site 3 Beach	p-value*
Temperature (°C)	19.5°C (11°C;27°C)	19.8°C (12°C;27°C)	20°C (12°C;28°C)	0.94
Salinity (psu)	19.36 (2; 36)	21.14 (1;36)	31 (21;35)	<b>0.007</b>
Turbidity (FNU)	16.95 (2;68)	24.35 (1;143)	38.71 (0,144)	0.06
Seston (mg/L)	94.36 (16;230)	106.27 (28;226)	157.15 (68;320)	<b>0.008</b>
Dissolved O <sub>2</sub> (mg/L)	7.77 (6;10)	7.97 (6;11)	7.8 (7;9)	0.88
Chlorophyll A (µg/l)	5.92 (1;15)	4.77 (0;23)	12.06 (1;62)	<b>0.02</b>
Ammonia (µg/l)	4.12 (2;9)	3.62 (2;9)	3.42 (1;11)	0.15

Values used: mean, minimum and maximum \* Kruskal-Wallis non-parametric test.

758 Isolation of fungal colonies from at least one pathogenic section of *Aspergillus*  
 759 occurred in 44% of the samples (n=33/75), totaling 67 isolates. The sample positivity

760 rate was 39.4% (n=13) at site 1 (estuary), followed by site 3 (beach) with 36.4% (n=12)  
 761 and site 2 (lagoon mouth) with 24.2% (n=8). Concerning the seasons, in winter, 30.3%  
 762 (n=10) of the samples were positive, followed by spring with 27.3% (n=9), summer  
 763 24.2% (n=8), and autumn with 18.2% (n=6) positivity. There was no significant  
 764 influence of the sample's origin site (p=0.32) or the seasons (p=0.35) on fungal isolation.  
 765 Of the 67 isolates, 59.7% (n=40) were from the *Fumigati* section, 22.3% (n=15) from the  
 766 *Flavi* section, and 17.9% (n=12) from the *Nigri* section. Positive samples for the *Fumigati*  
 767 and *Nigri* sections predominated at site 1 (estuary) 43.8% (7/16) and 45.5% (5/11),  
 768 respectively, while the *Flavi* section 58.3% (7/12) predominated at site 3 (beach). The  
 769 percentages of each site and section are presented in (Table 2).

Table 2: Data regarding positive collections for each of the sections *Fumigati* (n=16), *Flavi* (n=12) and *Nigri* (n=11) with the respective percentage isolated at each collection site (middle estuary, lagoon mouth and beach) and the result of statistical significance between sites.

<i>Aspergillus</i> Section	Site 1 Middle Estuary	Site 2 Lagoon mouth	Site 3 Beach	p-value*
<i>Fumigati</i> (n=16)	43.8%	25%	31.2%	0.57
<i>Flavi</i> (n=12)	16.7%	25%	58.3%	0.12
<i>Nigri</i> (n=11)	45.5%	18.2%	36.3%	0.47

\* Kruskal-Wallis non-parametric test, demonstrating p values.

770 Regarding the abiotic parameters of the water, only seston differed significantly  
 771 between samples positive and negative for *Aspergillus* spp. isolation (p=0.04).  
 772 Specifically, concerning specific sections of *Aspergillus*, *Fumigati* colonies were more  
 773 commonly isolated in samples with lower seston values (mg/L) (p=0.01) and higher  
 774 dissolved oxygen values (mg/L) (p=0.04); while *Flavi* colonies were isolated in samples  
 775 with higher turbidity (FNU) (p=0.04). The other variables did not show statistical  
 776 significance for the sections (Table 3), and the *Nigri* section did not show statistical  
 777 significance concerning any of the variables.

Table 3: Influence of environmental variables between positive (yes) (n=33) and negative (no) (n=42) samples on the isolation of *Aspergillus* spp. and sections *Fumigati* (n=16), *Flavi* (n=12) and *Nigri* (n=11) during the study period (25 months)

Parameter of water samples (n=75)	<i>Aspergillus</i> spp. Samples		<i>p</i>	<i>Aspergillus Fumigati</i> Samples		<i>p</i>	<i>Aspergillus Flavi</i> Samples			<i>Aspergillus Nigri</i> Samples		
	Positive (n=33)	Negative (n=42)		Positive (n=16)	Negative (n=59)		Positive (n=12)	Negative (n=63)	<i>p</i>	Positive (n=11)	Negative (n=62)	<i>p</i>
Temperature (°C)	18.5 (11.4 - 28.3)	19.6 (12.0 - 26.6)	0.54	16.3 (12.0 - 25.9)	20.0 (11.4 - 28.3)	0.08	17.5 (13.3 - 26.6)	19.6 (12.0 - 28.3)	0.56	21.2 (11.4 - 28.3)	18.8 (12.0 - 26.6)	0.57
Salinity (psu)	27.9 (1.1 - 35.6)	30.4 (1.1 - 35)	0.36	25.7 (1.2 - 34.4)	29.3 (1.1 - 35.7)	0.06	28.7 (1.2 - 35.6)	28.5 (1.1 - 35.3)	0.94	26.3 (1.5 - 35.5)	28.8 (1.1 - 35.7)	0.94
Turbidity (FNU)	16.3 (0.5 - 144)	15.4 (0.4 - 143.3)	0.81	13.6 (0.5 - 144)	18.1 (0.4 - 143.3)	0.43	24.9 (6.1 - 144)	13.1 (0.4 - 143.3)	<b>0.04</b>	19.5 (5.0 - 118.5)	15.4 (0.4 - 144.0)	0.41
Seston (mg/L)	93.2 (16.5 -223.9)	107.3 (28.7 - 320)	<b>0.04</b>	87.0 (16.5 -223.6)	106.7 (37.6 - 320)	<b>0.01</b>	98.2 (27.7 -223.9)	97.6 (16.5 - 320)	0.78	94.8 (54.7 -223.9)	97.6 (28.7 - 272.2)	0.91
Dissolved O <sub>2</sub> (mg/L)	8.34 (6.19 - 10.31)	7.60 (5.76-10.61)	0.24	8.68 (6.19 - 10.31)	7.55 (5.76-10.61)	<b>0.04</b>	8.58 (5.93 - 10.07)	7.72 (6.16-10.61)	0.41	7.53 (6.20 - 9.39)	7.76 (5.93-10.61)	0.54
Chlorophyll A (µg/l)	4.20 (0.43-15.77)	5.20 (0.95-62.25)	0.35	4.10 (0.43-15.77)	5.01 (1.95-62.25)	0.19	3.78 (0.43-15.77)	5.19 (1.48-62.25)	0.16	5.28 (1.48-15.77)	4.48 (0.43-62.25)	0.70
Ammonia (µg/l)	3.11 (1.08-7.14)	3.29 (1.38-11.03)	0.21	2.65 (1.29-7.14)	3.20 (1.08-11.03)	0.34	2.54 (1.29-5.78)	3.26 (1.08-11.03)	0.06	3.11 (1.69-7.02)	3.29 (1.08-11.03)	0.47

\* Values used: median, minimum and maximum \* Kruskal-Wallis non-parametric test.

778 Regarding the antifungal susceptibility profile, all 67 isolates (100%) were sensitive to  
 779 amphotericin B (AMB), being inhibited at concentrations  $\leq 2$   $\mu\text{g/mL}$ , and 65 (97%) were  
 780 sensitive to itraconazole (ITZ). Two isolates (3%) were resistant to ITZ, growing at  
 781 concentrations  $>8$   $\mu\text{g/mL}$ , both from the *Nigri* section, corresponding to 16.7% (2/12) of  
 782 resistance in the isolates inside the section, being one originating from site 2 - lagoon  
 783 mouth (November of 2021 collection) and the other from site 3 – beach (September of  
 784 2021 collection). GM MIC, MIC50, and MIC90 values of AMB and ITZ against isolates  
 785 from different sections of *Aspergillus* tested are described in (Table 4).

Table 4: In vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates. (n=67) arising from water collections at environmental sampling sites in the city of Rio Grande, Rio Grande do Sul against the drugs itraconazole (ITZ) and amphotericin b (AMB).

<i>Aspergillus</i> Section (total of isolates n= 67)	ITZ $\mu\text{g/mL}$				AMB $\mu\text{g/mL}$			
	GM	MIC 50	MIC 90	Range	GM	MIC 50	MIC 90	Range
<i>Fumigati</i> (n=40)	0.36	0.25	0.5	0.5- 2	1.25	1	2	0.5- 2
<i>Flavi</i> (n=15)	0.33	0.25	0.5	0.25- 1	1.51	2	2	1 - 2
<i>Nigri</i> (n=12)	0.94	0.5	2	0.5- $>8$	0.68	0,5	1	0.5- 1

GM: Geometric mean; MIC 50 and MIC 90: Minimal inhibitory concentration in  $\mu\text{g/mL}$  to inhibit 50% and 90% of isolates, respectively; ITZ: itraconazole; AMB: amphotericin B.

#### 4 DISCUSSION

786 In the present study, we determined the isolation rate of *Aspergillus* spp. in water  
 787 samples from a coastal ecosystem from Southern Brazil and South Atlantic Ocean, its  
 788 relationship with the abiotic characteristics of the environment, and the antifungal  
 789 susceptibility profile of the isolates. These data are of paramount importance considering  
 790 the scarcity of studies on the antifungal susceptibility pattern of Brazilian isolates of



791 *Aspergillus* spp. from coastal aquatic environment (Burks et al., 2021), as well as the  
792 absence of studies in the estuary of Patos Lagoon regarding fungal resistance, and the  
793 influence of abiotic factors on the isolation rates of the genus. The water collection sites  
794 in this study are classified as potential sources of infection due to exposure to bathers and  
795 fishermen, and therefore, a location where microbiological surveillance should be  
796 exercised to assess risks to human and animal health (Sabino et al., 2016; Schwingel et  
797 al., 2020).

798         Among the collection sites, the isolation of pathogenic *Aspergillus* kept a pattern,  
799 being present at all points. This result demonstrates the ubiquity of the genus and its  
800 importance in One Health, due to its ability to adapt to different ecosystems, where marine  
801 and estuarine waters have been shown to be a niche for potentially pathogenic fungi of  
802 humans, animals, and plants even under adverse conditions such as high salinity (Sabino  
803 et al., 2014). *Aspergillus Fumigati*, the most pathogenic section, was the most frequently  
804 section isolated in our study, as observed in previous studies (Misra et al., 2011; Sabino  
805 et al., 2016; Pinto et al., 2018). This finding represents a warning in the clinic, since the  
806 environmental frequency reported in a particular region may predict clinical isolates of  
807 patients with aspergillosis, determined according to the climatic and geographical  
808 conditions of the region (Pasqualotto, 2009).

809         Bandh et al. (2016) observed a higher frequency of the *Aspergillus* genus in lake  
810 waters and associated this fact with the entry of sewage into the system, increasing the  
811 nutrient supply. In the region of our study, Rio Grande-RS, both in the urban part of the  
812 estuary and at the lagoon mouth, waters with strong contamination from various sectors  
813 such as industrial and port areas receive clandestine sewage (Baumgarten et al., 2017).  
814 Thus, considering that the estuary is a dynamic environment influenced by wind and tidal  
815 fluctuations, possibly increased water circulation during periods of high tide leads to  
816 greater homogenization of this environment, increasing the dispersion of fungi present  
817 there and possibly being the reason for all points presenting similarity and a pattern of  
818 fungal isolation (Leite et al., 2019; Pagani et al., 2023).

819         Regarding the abiotic parameters, seston, dissolved oxygen, and turbidity were  
820 influential in fungal isolation. Seston (suspended organic material) were inversely related  
821 to *Aspergillus* spp. and the *Fumigati* section isolation. However, in the estuary, the  
822 location with the lowest seston, there is a higher supply of nutrients due to the  
823 decomposition of macrophytic plants and terrestrial water discharges such as sewage, as

824 mentioned before (Cunha et al., 2005; Tavora et al., 2022), thus leading to a greater  
825 proliferation of microorganisms such as fungi.

826 Dissolved oxygen is related to the higher isolation of the *Fumigati* section. This  
827 can be explained by the genus's need to capture oxygen for its development, metabolic  
828 activities, and sporulation (Hall & Denning, 1994). Other studies on fungi in aquatic  
829 environments have reported the average dissolved oxygen to be 7 mg/L (Nascimento et  
830 al., 2007; Schoenlein-Crusius et al., 2015), corroborating with our results, indicating it as  
831 adequately oxygenated (Nascimento et al., 2007). Another parameter that influenced  
832 fungal isolation was turbidity, observed in the *Flavi* section. This parameter is related to  
833 suspended sediments, which can serve as substrate and resource for fungal development  
834 (Côrte-Real et al., 2010). Silveira (2013) found higher fungal diversity when there was a  
835 greater presence of particles in the water, evidenced by lower transparency. It is worth  
836 noting that these sediments may come from agriculture through river tributaries and  
837 contain residues of azole pesticides, with the potential to cause cross-resistance (Allizond  
838 et al., 2021; Tavora et al., 2022).

839 In our study, all *A. Fumigati* isolates were susceptible for ITZ and AMB, as  
840 well as *A. Flavi*, being two strains from the section *A. Nigri* ITZ resistant. The  
841 environmental resistance of *Aspergillus* spp. to triazoles has been described in several  
842 countries showing *A. Fumigati* triazole resistance in rates up to 25%, including in the  
843 Netherlands (van der Linden et al., 2013), Iran (Badali et al., 2013), Denmark (Astvad et  
844 al., 2014; Mortensen et al., 2010), India, France, Germany (Chowdhary et al., 2012;  
845 Chowdhary et al., 2014; Bader et al., 2015), the United Kingdom (Sewell et al., 2019),  
846 Latin American and African countries (Resendiz-Sharpe et al., 2021), Colombia (Le Pape  
847 et al., 2015). However, most of them are usually made in locations such as agricultural  
848 fields and soils, which are directly exposed to azoles and therefore are more likely to have  
849 higher resistance rates (Burks et al., 2021). Specifically in Brazil, no resistance studies  
850 were found with *Aspergillus* from the aquatic environment, and studies environmental are  
851 rare. Bedin et al., (2018) obtained 25% (5/20) *Fumigati* isolates resistant to itraconazole  
852 from soil and Oliboni, (2022), found 100% of *Fumigati* from atmospheric air were  
853 sensitive to triazoles.

854 The resistance of the *Nigri* section found here to ITZ (MIC>8µg/mL) is  
855 consistent with previous environmental studies (Hashimoto et al., 2017; Sabino et al.,  
856 2016; Pérez-Cantero et al., 2019), as well with studies of clinical isolates (Saurav et al.,  
857 2010; Howard et al., 2011; Iatta et al., 2016; Takeda et al., 2020). Some studies report that

858 certain species belonging to the *Nigri* section, such as *A. tubingensis*, often exhibit  
859 tolerance to azole drugs and are recently considered to have intrinsic resistance, mainly  
860 to ITZ (Toyotome et al., 2020; Matsumoto et al., 2022). According to previous studies, it  
861 is well established in the literature that agricultural fungicides are stably transported by  
862 aquatic effluents and quantified at high levels in these environments (von Ameln et al.,  
863 2021, Toda et al., 2021). In this sense, due to the local context of our study being related  
864 to agricultural areas (IBGE, 2022), it appears that pesticide residues are present in these  
865 environments and may interact with *Aspergillus* spp., influencing the development and  
866 spread of resistance, given the molecular similarities between azole fungicides used in  
867 agriculture and in clinical settings. It is interesting to note that the two resistant isolates  
868 in our study came from collection sites with higher salinity, indicating a higher stress  
869 environment. Other resistant fungi are also found in locations with higher abiotic stress  
870 and high salinity (Chakrabarti & Sood, 2021).

871 Although 100% of our isolates from the *Fumigati* and *Flavi* sections were  
872 susceptible to ITZ and AMB, resistance to ITZ was reported in 3% of the isolates in the  
873 *Nigri* section. Even though the *Nigri* section not being the main etiological agent of  
874 aspergillosis, it is associated with allergic, chronic, and even invasive conditions (Xavier  
875 et al., 2008; Alen et al., 2022), so the resistance found here is an alert for possible resistant  
876 strains in clinical settings.

877 Given the fact that (1) *Aspergillus* spp. is dispersed in the most distinct aquatic  
878 ecosystems, as demonstrated in our study (2) that these aquatic environments can serve  
879 as a source of infection (3) and that resistance to ITZ has been demonstrated in the region  
880 studied, there is a need for surveillance to monitor the resistance rates of these pathogens.  
881 Studies on environmental surveillance of *Aspergillus* spp. resistance in Brazil should  
882 continue to be conducted to assess whether the resistance rate will increase in South and  
883 other coastal environments – and the risk of this to human and animal health. This work  
884 is of utmost importance considering the scarcity of studies relating the presence of fungi  
885 to environmental parameters, as well as the absence of studies in the estuary of Patos  
886 Lagoon regarding fungal resistance. The perspectives for the development and continuity  
887 of the study, conducting the *Fumigati*, *Nigri*, and *Flavi* identification into species-level, as  
888 well the resistance mechanisms of these isolates resistant to ITZ need to be conducted.

## 889 5 FUNDING

890 This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
891 Superior – Brasil (CAPES).

## 892 6 ACKNOWLEDGEMENTS

893 The authors would like to thank CAPES for funding and the Federal University of Rio  
894 Grande for providing the infrastructure for the study.

## 895 7 REFERENCES

896 Alen CI, Lopes M, et al. (2022). Concomitant allergic bronchopulmonary aspergillosis  
897 and eosinophilic granulomatosis with polyangiitis after *Aspergillus niger* infection.  
898 Pulmonology. 28(3):231-234.

899

900 Allizond V, et al. (2021). Exposure to the agricultural fungicide tebuconazole promotes  
901 *Aspergillus fumigatus* cross-resistance to clinical azoles. New Microbiol. 44(4):234-240.

902 Almeida MTA, Baumgarten MGZ, Rodrigues RM. (1993). Identificação das possíveis  
903 fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade de Rio Grande - RS Rio Grande  
904 do Sul: FURG, 1993. Documentos Técnicos Oceanografia, 6.

905 Arastehfar A, et al. (2021). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to  
906 clinics. Stud Mycol. 10;100:100115.

907 Astvad KM, et al (2014). First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H  
908 alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naive patients in Denmark despite  
909 negative findings in the environment. Antimicrob Agents Chemother. 58(9):5096-101.

910 Badali H, et al. (2013). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with  
911 TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. Mycoses. 56(6):659-63.

912 Bader O, et al. (2015). Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in  
913 Germany. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jul;59(7):4356-9.

914 Bandh SA, et al. (2016). Opportunistic fungi in lake water and fungal infections in  
915 associated human population in Dal Lake, Kashmir. Microbiology and Pathology  
916 Research Laboratory, v. 93, p.105-110.

917 Banerjee S, Denning DW, Chakrabarti A. (2021). One Health aspects & priority roadmap  
918 for fungal diseases: A mini-review. Indian J Med Res. 153(3):311-319.

919 Baumgarten MGZ, Aguiar VF, Almeida L. (2017). Porto do Rio Grande (estuário da  
920 Lagoa dos Patos-RS): identificação e caracterização dos locais de lançamento de  
921 efluentes líquidos nas margens.

922 Bedin DL, et al (2018). In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental  
923 isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. Braz J Infect Dis.  
924 22(1):30-36.

- 925 Burks C, et al. (2021). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment:  
926 Identifying key reservoirs and hotspots of antifungal resistance. PLoS Pathog.  
927 29;17(7):1009711.
- 928 Chakrabarti A & Sood P. (2021). On the emergence, spread and resistance of *Candida*  
929 *auris*: host, pathogen and environmental tipping points. J Med Microbiol. 3:001318
- 930 Chowdhary A, et al. (2012). Clonal expansion and emergence of environmental multiple-  
931 triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR<sub>34</sub>/L98H mutations in the  
932 *cyp51A* gene in India. PLoS One. 7(12):52871.
- 933 Chowdhary A, et al. (2014). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the  
934 environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. J Antimicrob Chemother.  
935 69(2):555-7.
- 936 CLSI. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of  
937 Filamentous Fungi: Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38 – A2.  
938 Clinical and Laboratory Standards Institute.
- 939 Côte-Real M, Johansson B, Saraiva L. (2010). Nutrição e crescimento microbiano. (Ed)  
940 Microbiologia. Litel Edições Técnicas Ltda, 166-195.
- 941 Cunha SR, Asmus M, Costa, CSB. (2005). Production Dynamics of *Spartina alterniflora*  
942 salt marshes the estuary of Patos lagoon (RS, Brazil): A simulation model approach. Braz.  
943 J. Aquat. Sci. Technol., 9(2):75-85.
- 944 Dauchy C, et al (2018). Emergence of *Aspergillus fumigatus* azole resistance in azole-  
945 naïve patients with chronic obstructive pulmonary disease and their homes. Indoor Air.  
946 28(2):298-306.
- 947 de Francesco MA. (2023). Drug-Resistant *Aspergillus* spp.: A Literature Review of Its  
948 Resistance Mechanisms and Its Prevalence in Europe. Pathogens. 31;12(11):1305.
- 949 Denning DW. (2022). Antifungal drug resistance: an update. Eur J Hosp Pharm.  
950 29(2):109-112.
- 951 Dunne K, et al. (2017). Intercountry Transfer of Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus*  
952 on Plant Bulbs. Clin Infect Dis. Jul 1;65(1):147-149.
- 953 Fisher MC, Denning DW. (2023). The WHO fungal priority pathogens list as a game-  
954 changer. Nat Rev Microbiol. 21(4):211-212.
- 955 Friedman DZP, Schwartz IS. (2019). Emerging Fungal Infections: New Patients, New  
956 Patterns, and New Pathogens. J Fungi (Basel). 20;5(3):67.
- 957 Gonçalves SS. (2017). Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*  
958 with Focus on Latin American Countries. J Fungi (Basel). 10;3(1):5.
- 959 Hall LA, Denning DW. (1994). Oxygen requirements of *Aspergillus* species. J. of Med  
960 Microb. 41 (5), 311-315.

- 961 Hashimoto A, et al. (2017). Drug Sensitivity and Resistance Mechanism in *Aspergillus*  
962 Section *Nigri* Strains from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 25;61(8): 02583-16.
- 963 Hof H. (2001). Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection.  
964 *Antimicrob Agents Chemother.* 45(11):2987-90.
- 965 Howard SJ, et al. (2011). Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger*  
966 complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(10):4802-9.
- 967 Iatta R, et al. (2016). Species Distribution and In Vitro Azole Susceptibility of *Aspergillus*  
968 Section *Nigri* Isolates from Clinical and Environmental Settings. *J Clin Microbiol.*  
969 54(9):2365-72.
- 970 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2022). Produção Agropecuária Rio  
971 Grande do Sul. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/rs>> Accessed  
972 on: Jan 2024.
- 973 Latgé JP, Chamilos G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin*  
974 *Microbiol Rev.* Nov 13;33(1): 00140-18.
- 975 Le Pape P, et al (2016). Multiple Fungicide-Driven Alterations in Azole-Resistant  
976 *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. *Emerg Infect Dis.* 22(1):156-7.
- 977 Leite B, et al. (2019). Antibiotic resistance in surface waters from a coastal lagoon of  
978 Southern Brazil under the impact of anthropogenic activities. *Rev. Ambiente Água.* 14, 5.
- 979 Maggi F, Tang FHM, Tubiello FN. (2023). Land budget of agricultural pesticides and  
980 river discharge into the oceans. *Nature.* 620:1013–1017.
- 981 Matsumoto Y, et al (2022). Discovery of Tolerance to Itraconazole in Japanese Isolates  
982 of *Aspergillus* Section *Nigri*, *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus welwitschiae*, by  
983 Microscopic Observation. *Med Mycol J.* 63(3):65-69.
- 984 Misra R, Malik A, Singhal S (2011). Comparison of the activities of amphotericin B,  
985 itraconazole, and voriconazole against clinical and environmental isolates of *Aspergillus*  
986 species. *Indian J Pathol Microbiol.* 54(1):112-6.
- 987 Mortensen KL, et al. (2010). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus*  
988 *fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents*  
989 *Chemother.* 54(11):4545-9.
- 990 Nargesi S, et al. (2022). Molecular identification and antifungal susceptibility of clinically  
991 relevant and cryptic species of *Aspergillus* sections *Flavi* and *Nigri*. *J Med Microbiol.*  
992 71(4).
- 993 Nascimento CA. (2007). Diversidade de Chytridiomycota do Parque Estadual da serra da  
994 Cantareira, Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São  
995 Paulo.

- 996 Oliboni GM. (2022). Identificação e perfil de sensibilidade de *Aspergillus* spp. presentes  
997 no ar atmosférico. Dissertação. Programa de Pós-graduação em Ciências da  
998 Coordenadoria de Controle de Doenças. São Paulo.
- 999 Otu A, et al. (2023). The clinical spectrum of aspergillosis in chronic obstructive  
1000 pulmonary disease. *Infection*. 51(4):813-829.
- 1001 Pagani DM, et al. (2023). Unveiling Fungal Community Structure along Different Levels  
1002 of Anthropogenic Disturbance in a South American Subtropical Lagoon. *J. Fungi*, 9, 890.
- 1003 Pasqualotto AC. (2009). Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to  
1004 *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Med Mycol*. 1:S261-70.
- 1005 Paulussen C, et al. (2017). Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency  
1006 of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol*.  
1007 10(2):296-322.
- 1008 Pérez-Cantero A, et al. (2019). New Insights into the Cyp51 Contribution to Azole  
1009 Resistance in *Aspergillus* Section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother*.  
1010 24;63(7):e00543-19.
- 1011 Pérez-Llano Y, et al. (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile  
1012 Fungi to Salinity. *Cells*. 25-3: 525.
- 1013 Pinto E, et al. (2018). *Aspergillus* Species and Antifungals Susceptibility in Clinical  
1014 Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in *A.*  
1015 *fumigatus*. *Front Microbiol*. 23-9:1656.
- 1016 Resendiz-Sharpe A, et al. (2021). Triazole-Resistance in Environmental *Aspergillus*  
1017 *fumigatus* in Latin American and African Countries. *J Fungi (Basel)*. 7(4):292.
- 1018 Sabino R, et al (2014). Routine screening of harmful microorganisms in beach sands:  
1019 implications to public health. *Sci Total Environ*. 15;472:1062-9.
- 1020 Sabino R, et al. (2016). Antifungal susceptibility of 175 *Aspergillus* isolates from various  
1021 clinical and environmental sources. *Med Mycol*. 1;54(7):740-756.
- 1022 Saurav K, Kannabiran K. (2010). *In vitro* susceptibility pattern and distribution of  
1023 *Aspergillus* spp. in hospitalized patients with chronic pulmonary infection. *Br J*  
1024 *Pharmacol Tox*. 1: 45–49.
- 1025 Schoenlein-Crusius IH, Moreira CG, Gomes EPC. (2015). Richness of Ingoldian fungi  
1026 and facultative aquatic fungi from the Aclimação Municipal Park, São Paulo, SP, Brazil.  
1027 *Hoehnea*. 42(2):239–51.
- 1028 Schürch S, et al. (2023). Occurrence of *Aspergillus fumigatus* azole resistance in soils  
1029 from Switzerland. *Med Mycol*. 6;61-11.

- 1030 Schwingel S, Velasco RG (2020). Geospacialization of the fishing activity in the estuary  
1031 of Patos Lagoon, RS, Brazil. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research.  
1032 3. 4030-4050.
- 1033 Sewell TR, et al (2019). Elevated Prevalence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in  
1034 Urban versus Rural Environments in the United Kingdom. Antimicrob Agents  
1035 Chemother. 23;63(9):00548-19.
- 1036 Sharpe A, et al. (2018). ISHAM/ECMM *Aspergillus* Resistance Surveillance working  
1037 group. Triazole resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 56:83-92.
- 1038 Silva DM. (2009). Identificação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* por taxonomia  
1039 polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero. Orientador: Luís Roberto Batista  
1040 Dissertação (Mestrado), UFLA – Universidade Federal de Lavras, 76 p.
- 1041 Silveira ES, Lobato RC, Abreu PC. (2013). Fungi in the Patos Lagoon estuary and  
1042 Cassino Beach. Atlântica, Rio Grande, 35(1) 45-54, 2013.
- 1043 Snelders E, et al. (2009). Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus*  
1044 *fumigatus* to medical triazoles. Appl Environ Microbiol. 2009 Jun;75(12):4053-7.
- 1045 Takeda K, et al (2020). Species identification, antifungal susceptibility, and clinical  
1046 feature association of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from the lower respiratory tract.  
1047 Med Mycol. 1;58(3):310-314.
- 1048 Tavora J, Leao Fernandes EH, Möller OO. (2022). Patos Lagoon, Brazil, suspended  
1049 particulate matter (SPM) data compendium. Geosci. Data J. 9:235–255.
- 1050 Toda M, et al. (2021). Trends in Agricultural Triazole Fungicide Use in the United  
1051 States, 1992-2016 and Possible Implications for Antifungal-Resistant Fungi in Human  
1052 Disease. Environ Health Perspect. 129(5):55001.
- 1053 Toyotome T, et al. (2020). Prospective survey of *Aspergillus* species isolated from  
1054 clinical specimens and their antifungal susceptibility: a five-year single-center study in  
1055 Japan. J Infect Chemother. 26:321–323.
- 1056 Toyotome T. (2019). Resistance in the Environmental Pathogenic Fungus *Aspergillus*  
1057 *fumigatus*. Med Mycol J. 60(3):61-63.
- 1058 Trovato L, et al. (2018). Environmental Isolates of Multi-Azole-Resistant *Aspergillus*  
1059 spp. in Southern Italy. J Fungi (Basel). 6;4(4):131.
- 1060 van der Linden JW, et al. (2013). Aspergillosis due to *Aspergillus fumigatus* highly  
1061 resistant to voriconazole and recovery of genetically related resistant isolates from  
1062 households. Clin Infect Dis. 57: 513–520.
- 1063 Verweij PE, et al. (2009) Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of  
1064 environmental fungicide use? Lancet Infect Dis. 9(12):789-95.



- 1065 Verweij PE, et al. (2013). Triazole fungicides and the selection of resistance to medical  
1066 triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus*. *Pest Manag Sci.* 69(2):165-  
1067 70.
- 1068 von Ameln et al. (2021). Identification of pesticides in water samples by solid-phase  
1069 extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Water*  
1070 *Environ Res.*93(11):2670-2680.
- 1071 WHO. (2022). World Health Organization list of priority fungal pathogens to guide  
1072 research, development and public health actions.
- 1073 Wrege MS, et al. (2012). Atlas climático da região Sul do Brasil: estados do Paraná, Santa  
1074 Catarina e Rio Grande do Sul. Embrapa.
- 1075 Xavier MO, et al. (2008). *Aspergillus niger* causing tracheobronchitis and invasive  
1076 pulmonary aspergillosis in a lung transplant recipient: case report. *Rev Soc Bras Med*  
1077 *Trop.* 41(2):200-1.  
1078

1079 **5. CONCLUSÕES**

1080

1081 Com base no presente estudo pode se concluir que:

1082 1. Os parâmetros abióticos salinidade, séston e clorofila A, variaram significativamente  
1083 entre os pontos de coleta;

1084 2. Variáveis como a turbidez, séston e oxigênio dissolvido mostraram ser parâmetros que  
1085 influenciam o isolamento de determinadas seções de *Aspergillus*;

1086 3. As principais seções de *Aspergillus* com importância clínica foram encontrados nos mais  
1087 variados pontos de coleta do ambiente costeiro, em diferentes estações do ano e  
1088 parâmetros ambientais, inclusive em locais de alta salinidade;

1089 4. Foi relatado um número alto de *Aspergillus* seção *Fumigati* (n=40) isolado nos pontos  
1090 de coleta.

1091 5. A taxa de resistência (3%) dos isolados da seção *Nigri* é um importante alerta dentro  
1092 do contexto da região.

## 1093 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

1094 O presente estudo apresentou a taxa de isolamento de *Aspergillus* spp. em  
1095 amostras de água de um ecossistema costeiro e sua relação com características abióticas,  
1096 determinando o perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados. Nossos resultados  
1097 contribuem com a comunidade científica acerca da resistência ambiental de isolados  
1098 fúngicos advindos do ambiente e instiga a vigilância desses ambientes com o  
1099 monitoramento das taxas de resistência. Devido os locais de coleta deste estudo serem  
1100 pontos urbanos, pesqueiros e de lazer, pessoas facilmente entram em contato com essas  
1101 águas e podem devolver infecções fúngicas. De acordo com nossos resultados, esses  
1102 ambientes possuem alta frequência de *Aspergillus* seção *Fumigati*, descrita como a mais  
1103 patogênica dentro do gênero, além de terem sido encontrados *Aspergillus* da seção *Nigri*  
1104 resistentes, podendo influenciar o tratamento posterior na clínica.

1105 Como perspectiva deste trabalho, a espécie de todos os 67 isolados de  
1106 *Aspergillus* spp. assim como o mecanismo de resistência dos dois isolados resistentes ao  
1107 itraconazol, serão determinados. Além disso, um estudo avaliando a presença e  
1108 quantidade de pesticidas azólicos nessas águas será encaminhado, visto o contexto da  
1109 região ser de influência agrícola podendo ser um fator de pressão de seleção aos isolados.

1110

1111 ODS contempladas: (3) Saúde e bem-estar; (14) Vida na água

1112

1113

1114

1115

1116

1117

1118

1119

1120

1121

1122

1123

1124

**1125 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERÊNCIAL TEÓRICO**

- 1126 Abarca ML, et al. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van*  
1127 *Leeuwenhoek*. 86(1):33-49.
- 1128 Abdel-azeem, A. et al. (2019). *Aspergillus*: Biodiversity, Ecological Significances, and  
1129 Industrial Applications. *J Nonparametr Stat*, p. 121–179.
- 1130 Agarwal R, Muthu V, Sehgal IS, Dhooria S, Prasad KT, Aggarwal AN. (2022). Allergic  
1131 Bronchopulmonary Aspergillosis. *Clin Chest Med*. 43(1):99-125.
- 1132 Allen D., et al. (2015). Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection  
1133 management. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther*, v.6, p. 787-98.
- 1134 Allizond V, et al. (2021). Exposure to the agricultural fungicide tebuconazole promotes  
1135 *Aspergillus fumigatus* cross-resistance to clinical azoles. *New Microbiol*. 2021.  
1136 44(4):234-240.
- 1137 Almeida MTA, Baumgarten MGZ, Rodrigues RM. (1993). Identificação das possíveis  
1138 fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade de Rio Grande - RS Rio Grande  
1139 do Sul: FURG, 1993. Documentos Técnicos Oceanografia, 6.
- 1140 Almeida MTA, Baumgarten MGZ, Rodrigues RM. (1993). Identificação das possíveis  
1141 fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade de Rio Grande - RS Rio Grande  
1142 do Sul: FURG, 1993. Documentos Técnicos Oceanografia, 6.
- 1143 Arastehfar A, Carvalho A, et al. (2021). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From  
1144 basics to clinics. *Stud Mycol*. 10;100:100115.
- 1145 Askew DS. (2008). *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Curr*  
1146 *Opin Microbiol*, v.4, p. 11.
- 1147 Astoreca AL, Magnoli CE, Dalcero AM. (2010). Ecophysiology of *Aspergillus* section  
1148 *nigri* species potential ochratoxin A producers. *Toxins (Basel)*. 2(11):2593-605.
- 1149 Banerjee S, Denning DW, Chakrabarti A. (2021). One Health aspects & priority roadmap  
1150 for fungal diseases: A mini-review. *Indian J Med Res*. 153(3):311-319.
- 1151 Barber AE, et al. (2020). Effects of Agricultural Fungicide Use on *Aspergillus fumigatus*  
1152 Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure. *mBio*, v. 6, p. 11.
- 1153 Bhat R, Rai R, Karim A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future  
1154 Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 91, p. 57- 82.
- 1155 Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. (2017). Global and Multi-National  
1156 Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*.18;3(4):57.
- 1157 BrCAST. (2022). Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.  
1158 <https://brcast.org.br/>

- 1159 Burks C, Darby A, Gómez Londoño L, Momany M, Brewer MT. (2021). Azole-resistant  
1160 *Aspergillus fumigatus* in the environment: Identifying key reservoirs and hotspots of  
1161 antifungal resistance. PLoS Pathog. 29;17(7):1009711.
- 1162 Cadena J, Thompson GR, Patterson TF. (2021). Aspergillosis: Epidemiology, Diagnosis,  
1163 and Treatment. Infect Dis Clin North Am. 35(2):415-434.
- 1164 Camps SM, et al. (2012). Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates  
1165 harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism. J Clin Microbiol, v. 50, n. 8, p.  
1166 2674-80.
- 1167 Cao W, Yu P, Yang K, Cao D. (2022). Aflatoxin B1: metabolism, toxicology, and its  
1168 involvement in oxidative stress and cancer development. Toxicol Mech Methods.  
1169 32(6):395-419.
- 1170 Carrasco DC & Forbes NA. (2016). Aspergillosis: update on causes, diagnosis and  
1171 treatment. Companion Animal, v. 21, n. 1, p. 50–57.
- 1172 Chiva L, et al. (2018). The effects of sediment used in beach nourishment: Study case El  
1173 Portet de Moraira beach. Sci Total Environ. 1;628-629:64-73.
- 1174 Chowdhary A & Meis J.F. (2018). Emergence of azole resistant *Aspergillus fumigatus* and  
1175 One Health: time to implement environmental stewardship. Environ Microbiol, v.20, n.4,  
1176 p. 1299-1301.
- 1177 CLSI. (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of  
1178 Filamentous Fungi: Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38 – A2.  
1179 Clinical and Laboratory Standards Institute
- 1180 Coker JA. (2019). Recent advances in understanding extremophiles. F1000Res. Faculty  
1181 Rev.
- 1182 CONITEC. (2022). Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema  
1183 Único de Saúde - CONITEC. Anfotericina B lipossomal para pessoas diagnosticadas com  
1184 mucormicose rino-órbito-cerebral. Ministério da Saúde.
- 1185 da Silva FRP., et al. (2015). Incidence density, proportionate mortality, and risk factors of  
1186 aspergillosis in *Magellanic penguins* in a rehabilitation center from Brazil. J. Zoo Wildl.  
1187 Med, v.46, p. 667–674.
- 1188 Dannaoui E, et al. (1999). In-vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to  
1189 amphotericin B and itraconazole. J Antimicrob Chemother, v. 44, n. 4, p. 553-555.
- 1190 de Francesco MA. (2023). Drug-Resistant *Aspergillus* spp.: A Literature Review of Its  
1191 Resistance Mechanisms and Its Prevalence in Europe. Pathogens. 31;12(11):1305.

- 1192 Dellagiustina A. (2000). Determinação das concentrações de nitrogênio e fósforo  
1193 dissolvidos em diferentes locais do rio Itajaí-Açu. Dissertação (Mestrado em Química  
1194 analítica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 1195 Denning DW, et al. (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob.*  
1196 *Agents Chemother*, v. 41, n. 6, p. 1364-8.
- 1197 Denning DW. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.*;26(4):781-803.
- 1198 El-Baky NA, Abdel Rahman RA, Sharaf MM, Amara AAAF. (2021). The Development  
1199 of a Phytopathogenic Fungi Control Trial: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*  
1200 Infection in Jojoba Tissue Culture as a Model. *Scientific World Journal*. 17:6639850.
- 1201 Esteves FA. (1988). Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro, Ed. Interciência / FINEP
- 1202 EUCAST. (2021). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Setting  
1203 breakpoints for new antimicrobial agents. SOP 1.4. <http://www.eucast.org>.
- 1204 Fernandes EHL, Monteiro IO, Moller Junior OO. (2007). On the dynamics of Mangueira  
1205 Bay - Patos Lagoon (Brazil). *Journal of Coastal Research*, 47, 97-107.
- 1206 Fraaije B, et al. (2020). The Multi-Fungicide Resistance Status of *Aspergillus fumigatus*  
1207 Populations in Arable Soils and the Wider European Environment. *Front Microbiol*, v. 15,  
1208 p. 11.
- 1209 FRAC, (2019) .Code List. Fungal control agents sorted by cross resistance pattern and  
1210 mode of action. Fungicide Resistance Action Committee, Basel, Switzerland.
- 1211 Frenkel M, Serhan H, et al. (2022). What Is Hiding in the Israeli Mediterranean Seawater  
1212 and Beach Sand. *Journal of Fungi*. 8(9):950.
- 1213 Frisvad JC, et al. (2011). Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus*  
1214 *niger* strains. *PLoS One*. 6(8): 23496.
- 1215 GAFFI. (2021) .Fundo de ação global do GAFFI para infecções fúngicas. Disponível  
1216 online: <https://gaffi.org/why/fungal-disease-frequency>.
- 1217 Giacomazzi J et al. (2016). The burden of serious human fungal infections in Brazil.  
1218 *Mycoses*, v. 59, p. 145–150.
- 1219 Gomes D, et al. (2008). Filamentous fungi isolated from sand and water of "Bairro Novo"  
1220 and "Casa Caiada" beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. *Braz J Biol*. 68(3):577–82.
- 1221 Gray KC, et al. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol.  
1222 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(7):2234-9.
- 1223 Grossart HP, et al. (2019). Fungi in aquatic ecosystems. *Nat Rev Microbiol*, v. 17, n. 6, p.  
1224 339-354.

- 1225 Hall LA, Denning DW. (1994). Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *Journal of*  
1226 *Medical Microbiology*, 41 (5), 311-315.
- 1227 Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. (2007). *Aspergillus*  
1228 *flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. 153(6):1677-  
1229 1692.
- 1230 Hof H. (2001). Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection.  
1231 *Antimicrob Agents Chemother*. 45(11):2987-90.
- 1232 Hollomon D. (2017). Does agricultural use of azole fungicides contribute to resistance in  
1233 the human pathogen *Aspergillus fumigatus*?. *Pest Manag Sci*, v. 73, p. 1987-1993.
- 1234 Houbraken J, et al. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and  
1235 related genera (Eurotiales): an overview of families, genera, subgenera, sections, series  
1236 and species. *Stud Mycol*, v.95, n.5, p. 169,
- 1237 Howard SJ, et al. (2011). Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger*  
1238 complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(10):4802-9.
- 1239 Hsu J.L, et al. (2011). Diagnosing invasive fungal disease in critically ill patients. *Crit.*  
1240 *Rev. Microbiol*. v. 37, n. 4, p. 277–312.
- 1241 Huang J, Lu, C, Qian, X. *et al.* (2011). Effect of salinity on the growth, biological activity  
1242 and secondary metabolites of some marine fungi. *Acta Oceanol. Sin*. 30, 118–123.
- 1243 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2022). Produção Agropecuária Rio  
1244 Grande do Sul. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/rs,>> Accessed  
1245 on: Jan 2024.
- 1246 Ibrahim M, Rabah AB, Liman B, Ibrahim NT. (2011). Effect of Temperature and Relative  
1247 Humidity on the Growth of *Helminthosporium fulvum*. *Nigerian Journal of Basic and*  
1248 *Applied Science*, 19(1): 127- 129.
- 1249 Imbert S, et al. (2021). Invasive aspergillosis due to *Aspergillus* cryptic species: A  
1250 prospective multicentre study. *Mycoses*, v.64, n. 11, p. 1346-1353.
- 1251 Ingen VJ, et al. (2015). Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type,  
1252 TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands.  
1253 *J Antimicrob Chemother*, v. 70, n. 1, p. 178-81.
- 1254 Ittner LD., Junghans M., Werner I. (2018). Aquatic Fungi: A Disregarded Trophic Level  
1255 in Ecological Risk Assessment of Organic Fungicides. *Frontiers in Environmental*  
1256 *Science*, v. 6.
- 1257 Kamiński DM. (2014). Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B  
1258 with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *Eur Biophys J*. 43(10-11):453-67.

- 1259 Kang SE, Sumabat LG, Melie T, Mangum B. et al. (2022). Evidence for the agricultural  
1260 origin of resistance to multiple antimicrobials in *Aspergillus fumigatus*, a fungal pathogen  
1261 of humans, G3 Genes Genomes Genetics. 2-427,
- 1262 Kerzaon I, et al. (2008). Effects of seawater on growth and gliotoxin excretion of marine  
1263 strains of *Aspergillus fumigatus*. Fres. Toxicon, v.1, n.51, p. 398-405.
- 1264 Kjerfve B. (1986). Comparative oceanography of coastal lagoons, in: Estuarine  
1265 variability. Academic Press. 63–81.
- 1266 Krijghsheld P, et al (2013). Development in *Aspergillus*. Stud Mycol. Mar 15;74(1):1-29.
- 1267 Kumar V, et al. (2021). Ecology and Evolution of Marine Fungi with Their Adaptation to  
1268 Climate Change. Front Microbiol. v. 12.
- 1269 Latgé JP, Chamilos G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. Clin  
1270 Microbiol Rev. Nov 13;33(1): 00140-18.
- 1271 Latgé JP, Chamilos G. (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. Clin  
1272 Microbiol Rev. Nov 13;33(1): 00140-18.
- 1273 Latgé JP. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev, v. 12, n. 2,  
1274 p. 310-50.
- 1275 Lestrade PPA, et al. (2019). Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights  
1276 and challenges for patient management. Clin Microbiol Infect. (7):799-806.
- 1277 Li X, et al. (2022). Aerosolization of fungal spores in indoor environments. Sci Total  
1278 Environ. 820:153003.
- 1279 Limongi JE, de Oliveira SV. (2020). COVID-19 e a abordagem One Health (Saúde  
1280 Única): uma revisão sistemática. Vigil Sanit Debate. 8(3), 139–149.
- 1281 Loução, AS et al. (2018). Reações adversas a anfotericina b em adultos - Mineração de  
1282 dados. Rev. Bras. Farm. Hosp. Serv. Saúde, 9(1): 1-6.
- 1283 Lunt J, Smee DL. (2014). Turbidity influences trophic interactions in estuaries.  
1284 *Limnology and Oceanography*, 59(6), 2002-2012.
- 1285 Maertens JA. (2004). History of the development of azole derivatives. Clin Microbiol  
1286 Infect, v. 10, n.1, p. 1-10.
- 1287 Maggi F, Tang FHM, Tubiello FN. (2023). Land budget of agricultural pesticides and  
1288 river discharge into the oceans. *Nature* 620, 1013–1017.
- 1289 Meis JF, et al. (2016). Clinical implications of globally emerging azole resistance in  
1290 *Aspergillus fumigatus*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v. 5, n. 371, p. 1709.



- 1291 Melo AM, et al. (2020). Aspergillosis in free-ranging aquatic birds. *Med Mycol Case Rep.* 28: 36-38.  
1292
- 1293 Melo AM, et al. (2020). Aspergillosis, Avian Species and the One Health Perspective: The  
1294 Possible Importance of Birds in Azole Resistance. *Microorganisms.* 19;8(12):2037.
- 1295 Melo AM, et al. (2020). Aspergillosis, Avian Species and the One Health Perspective: The  
1296 Possible Importance of Birds in Azole Resistance. *Microorganisms.* 19;8(12):2037.
- 1297 Melo AM, et al. (2023). Aspergillosis in free-ranging *Magellanic penguins*. *Med Mycol.*  
1298 3:61(2).
- 1299 Menendez R, et al. (2016). "Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide  
1300 Problem?" *Journal of Fungi*, v. 2, n. 3, p. 21.
- 1301 Meseck SL, et al (2017). Characterizing seston in the Penobscot River Estuary. *Mar*  
1302 *Environ Res.* 131:43-56.
- 1303 Meti RS, Ambarish S, Khajure, PV (2011). Enzimas de assimilação de amônia em fungos:  
1304 uma visão geral. *Pesquisa Recente em Ciência e Tecnologia* 3-4.
- 1305 Moldoveanu B, et al (2021). Pulmonary Aspergillosis: Spectrum of Disease. *Am J Med*  
1306 *Sci.* 361(4):411-419.
- 1307 Monteiro D. (2005). Ocorrência de *Chelonia mydas* e interação com a pesca artesanal no  
1308 interior do estuário da lagoa dos patos – RS. NEMA. II Jornada de Conservação e  
1309 Pesquisa de Tartarugas Marinhas no Atlântico Sul Ocidental. 68-71.
- 1310 Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, et al. (2010). Environmental study of azole-  
1311 resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain.  
1312 *Antimicrob Agents Chemother.* 54(11):4545-9.
- 1313 Mouton M, Postma F, Wilsenach J, Botha A. (2012). Diversity and characterization of  
1314 culturable fungi from marine sediment collected from St. Helena Bay, South Africa.  
1315 *Microb Ecol.* 64(2):311-9.
- 1316 Musa H, et al. (2018). Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and  
1317 environmental biotechnology. *Process Biochem*, v.69, p. 33-44.
- 1318 Nargesi S, Jafarzadeh J, Najafzadeh MJ, et al. (2022). Molecular identification and  
1319 antifungal susceptibility of clinically relevant and cryptic species of *Aspergillus* sections  
1320 *Flavi* and *Nigri*. *J Med Microbiol.* 71(4).
- 1321 Nawaf A. (2023). Mycotoxin source and its exposure causing mycotoxicoses.  
1322 *Bioinformation.* 30;19(4):348-357.
- 1323 Odebrecht C., et al. (2013). O Efeito de Perturbações Naturais e Antrópicas na Ecologia  
1324 do Estuário da Lagoa dos Patos. Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio  
1325 Grande, Rio Grande/RS. Dez Anos do Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa  
1326 Duração no Brasil: PELD–CNPq: Achados, Lições e Perspectivas. 10:227

- 1327 OHHLEP. (2022). One Health High-Level Expert Panel. Adisasmito WB, et al. One  
1328 Health: A new definition for a sustainable and healthy future. PLoS Pathog, v.18, n. 6.
- 1329 Oliveira, D., Ferreira, W., Asmus, M. (2009). Caracterização dos ecossistemas e  
1330 identificação dos níveis de ocupação antrópica da margem do canal de navegação da  
1331 cidade de Rio Grande, RS. Observatorio Geográfico América Latina, p. 11,
- 1332 Oren A. & Gunde NC. (2012). Fungal life in the Dead Sea. Prog. Mol. Subcell Biol, v.  
1333 53, p. 115 – 132.
- 1334 Pagani DM, et al. (2023). Unveiling Fungal Community Structure along Different Levels  
1335 of Anthropic Disturbance in a South American Subtropical Lagoon. Journal of Fungi.  
1336 9(9):890.
- 1337 Pasqualotto AC. (2009). Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to  
1338 *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. Med Mycol. 61-70.
- 1339 Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, et al. (2017). Ecology of aspergillosis:  
1340 insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus*  
1341 species. Microb Biotechnol. 10(2):296-322.
- 1342 Pemán J, et al. (2020). Fungal co-infection in COVID-19 patients: Should we be  
1343 concerned? Rev Iberoam Micol. 37(2):41-46.
- 1344 Pereira ME, et al (2008). Influence of tidal resuspension on seston lithogenic and biogenic  
1345 partitioning in shallow estuarine systems: implications for sampling. Mar Pollut Bull.  
1346 56(2):348-54.
- 1347 Pérez-Llano Y, et al. (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile  
1348 Fungi to Salinity. Cells. 25-3: 525.
- 1349 Piedras FR. (2012). Variabilidade Espacial E Temporal Do Fitoplâncton Na Zona De  
1350 Arrebentação Da Praia Do Cassino (RS, Brasil): Relação Com Os Depósitos De Lama E  
1351 Nutrientes Dissolvidos. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
1352 Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande.
- 1353 Pinto E, et al. (2018). *Aspergillus* Species and Antifungals Susceptibility in Clinical  
1354 Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in *A.*  
1355 *fumigatus*. Front Microbiol. 23-9:1656.
- 1356 Primel E. et al. 2007. Risk assessment of surface water contamination by herbicide  
1357 residues: monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-  
1358 UV and confirmation by GC-MS. J. Braz. Chem. Soc. 18(3), 585–589.
- 1359 Rhodes J, et al. (2022). Population genomics confirms acquisition of drug-resistant  
1360 *Aspergillus fumigatus* infection by humans from the environment. Nat Microbiol, v. 7, p.  
1361 663–674.

- 1362 Rhodes JC. (2006). *Aspergillus fumigatus*: Growth and Virulence. *Med. Mycol. J.*, v. 44,  
1363 n. 1, p. 77– 81.
- 1364 Sabino R, et al. (2016). Antifungal susceptibility of 175 *Aspergillus* isolates from various  
1365 clinical and environmental sources. *Med Mycol.* v. 1, n. 54, p. 740-756.
- 1366 Samson RA, et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus  
1367 *Aspergillus*. *Stud Mycol*, v. 78, p. 141–73.
- 1368 Segrelles-Calvo G, Araújo GR, Frases S. (2020). Systemic mycoses: a potential alert for  
1369 complications in COVID-19 patients. *Future Microbiol.* v.15, p. 1405-1413.
- 1370 Seidler M.J, Salvenmoser S & Müller F.M. (2008). *Aspergillus fumigatus* forms biofilms  
1371 with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob*  
1372 *Agents Chemother*, v. 52, n. 11, p. 4130-6.
- 1373 Severo LC, et al. (1997). Pulmonary *Aspergillus niger* intracavitary colonization. Report  
1374 of 23 cases and a review of the literature. *Rev Iberoam Micol.* 14(3):104-10.
- 1375 Sewell TR, Zhang Y, Brackin AP, et al (2019). Elevated Prevalence of Azole-Resistant  
1376 *Aspergillus fumigatus* in Urban versus Rural Environments in the United Kingdom.  
1377 *Antimicrob Agents Chemother.* 23;63(9):00548-19.
- 1378 Seyedmousavi S, et al. (2015). *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic  
1379 animals: a global health concern with parallels to human disease. *Med Mycol.* 53(8):765-  
1380 97.
- 1381 Shabeer S, Asad S, Jamal A, Ali A. (2022). Aflatoxin Contamination, Its Impact and  
1382 Management Strategies: An Updated Review. *Toxins (Basel).* 27;14(5):307.
- 1383 Sharpe AR, et al. (2018). *Aspergillus* Resistance Surveillance working group, Triazole  
1384 resistance surveillance in *Aspergillus fumigatus*, *Medical Mycology.* 56: S83–  
1385 S92. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx144>.
- 1386 Silva DM. (2009). Identificação de espécies de *Aspergillus* Seção *Nigri* por taxonomia  
1387 polifásica e descrição de duas novas espécies do gênero. Orientador: Luís Roberto Batista  
1388 Dissertação (Mestrado), UFLA – Universidade Federal de Lavras, 76 p.
- 1389 Silveira ES, Lobato RC, Abreu PC. (2013). Fungi And Yeasts in The Patos Lagoon  
1390 Estuary and Cassino Beach, Rs, Brazil. *Atlântica.* 35(1) 45-54.
- 1391 Śliżewska W, Struszczyk-Świta K, Marchut-Mikołajczyk O. (2022). Metabolic Potential  
1392 of Halophilic Filamentous Fungi-Current Perspective. *Int. J. Mol. Sci.* 23: 4189.
- 1393 Tavora J, Leao Fernandes EH, Möller OO. (2022). Patos Lagoon, Brazil, suspended  
1394 particulate matter (SPM) data compendium. *Geosci. Data J.* 9:235–255.
- 1395 Tell LA. (2005). Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine.  
1396 *Med. Mycol. J.* v. 43, n. 1, p. 71-73.

- 1397 Toyotome T. (2019). Resistance in the Environmental Pathogenic Fungus *Aspergillus*  
1398 *fumigatus*. Med Mycol J. 60(3):61-63.
- 1399 Ullmann AJ, et al. (2017). Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive  
1400 summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. Clin Microbiol Infect, v. 24, n.  
1401 1, p. 1 – 38.
- 1402 Vaezi A, et al. (2018). Pesticide behavior in paddy fields and development of azole-  
1403 resistant *Aspergillus fumigatus*: Should we be concerned?. J Mycol Med. v. 28, p. 59–64.
- 1404 Vandecasteele SJ, Boelaer JR, Verrelst P, Graulus E, Gordts BZ. (2002). Diagnosis and  
1405 treatment of *Aspergillus flavus* sternal wound infections following cardiac surgery,  
1406 Clinical Infectious Diseases. 7:887 –890.
- 1407 Verweij PE, Kema G.H, Zwaan B, Melchers WJ. (2013). Triazole fungicides and the  
1408 selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic fungus *Aspergillus*  
1409 *fumigatus*. Pest management. Science. 69, 165–170.
- 1410 von Ameln et al. (2021). Identification of pesticides in water samples by solid-phase  
1411 extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Water  
1412 Environ Res.93(11):2670-2680.
- 1413 Wang HC, et al. (2018). Comparison of the Sensititre Yeast One and CLSI M38-A2  
1414 Microdilution Methods in Determining the Activity of Amphotericin B, Itraconazole,  
1415 Voriconazole, and Posaconazole against *Aspergillus* Species. J Clin Microbiol, v. 56, n.  
1416 10, p. 780-18.
- 1417 Ward OP, et al. (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. Adv Appl  
1418 Microbiol. 58:1-75.
- 1419 Wattanayon R & Kasprzyk-Hordern B. (2021). A multi-residue chiral liquid  
1420 chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for analysis of  
1421 antifungal agents and their metabolites in aqueous environmental matrices. Anal  
1422 Methods. 22: 2466-2477.
- 1423 WHO. (2022). Fungal priority pathogens list to guide research, development, and public  
1424 health action. Geneva: World Health Organization.
- 1425 Wiederhold NP, et al. (2016). First Detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A  
1426 Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* Isolates in the United States. J Clin Microbiol,  
1427 v. 54, n. 1, p. 168-71.
- 1428 Xavier, MO. (2007). Aspergillosis: a limiting factor during recovery of captive  
1429 *Magellanic penguins*. Braz. J. Microbiol, v. 38, n. 3, p. 480-484.

- 1430 Zhang J., van den HJ & Debets AJM. (2017). Evolution of cross-resistance to medical  
1431 triazoles in *Aspergillus fumigatus* through selection pressure of environmental fungicides.  
1432 Proc. Biol. Sci, v. 284, n. 1863.