



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**MICROBIOMA ASSOCIADO A AMOSTRAS DE SOLOS
DO CENTRO-OESTE PAULISTA MEDIANTE
SEQUENCIAMENTO DE NOVA-GERAÇÃO (NGS)**

Aluna: Danielle Hamae Yamauchi

Orientador: Eduardo Bagagli

Co-orientador: Flavia Hebler Barbosa Trovão

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de parasitas e microrganismos (BPM).

Eduardo Bagagli



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MICROBIOMA ASSOCIADO A AMOSTRAS DE SOLOS DO CENTRO-OESTE PAULISTA MEDIANTE SEQUENCIAMENTO DE NOVA-GERAÇÃO (NGS)

Aluna: Danielle Hamae Yamauchi

Orientador: Eduardo Bagagli

Co-orientador: Flavia Hebler Barbosa Trovão

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil, CAPES (Processo 88882.183597/2018-01) e auxílio FAPESP (Processo 2018/06390-9).

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Yamauchi, Danielle Hamae.

Micobioma associado a amostras de solos do centro-oeste paulista mediante sequenciamento de nova-geração (NGS) / Danielle Hamae Yamauchi. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Eduardo Bagagli

Coorientador: Flavia Hebeler Barbosa Trovão

Capes: 21201030

1. Fungos do solo. 2. Fungos patogênicos. 3. Solos - Análise. 4. Metagenômica.

Palavras-chave: Fungos patogênicos ; Metagenômica; Micobioma; NGS; Solo.

“何かに挑戦したら確実に報われるのであれば、誰でも必ず挑戦するだろう。報われないかもしれないところで、同じ情熱、気力、モチベーションをもって継続しているのは非常に大変なことであり、私は、それこそが才能だと思っている。”

羽生善治

Agradecimentos

Gostaria de iniciar o meu agradecimento ao meu orientador, o Prof. Dr. Eduardo Bagagli, que possibilitou todo meu trabalho e meu desenvolvimento na academia, sempre oferecendo suporte e motivação. Agradeço por ser, acima de um orientador, uma pessoa maravilhosa, que verdadeiramente admiro.

Agradeço à minha coorientadora Prof. Dra. Flavia Hebler Barbosa Trovão, que, em meio a correria da rotina, sempre se dispôs a ajudar em tudo. Agradeço a paciência e todo conhecimento que nos proporcionou durante este projeto.

Agradeço ainda, ao Dr. Hans Garcia Garces que juntamente com o meu orientador, me mostrou o desconhecido e me acompanhou no em todo meu caminhar desde a iniciação científica, sempre estando ao meu lado nas dificuldades e problemas que vem junto a busca pelo novo.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos ao nível de Mestrado Acadêmico (Processo 88882.183597/2018-01), à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio recebido no projeto (Processo 2018/06390-9).

Agradeço a todos os colegas de laboratório, que tornam o nosso pequeno espaço mais alegre e acolhedor, sempre mantendo a união e cumplicidade, mesmo entre os problemas que surgem. Quero agradecer especialmente a minhas colegas de mestrado Ana Carolina do Prado e Alana Lucena Oliveira, que sempre foram parceiras, apesar de estarmos em diferentes caminhos e me acrescentaram, tanto na formação profissional como pessoal.

Agradeço à Dra. Leila Sabrina Ullmann que, em meio a correria de sua rotina, dedicou seu tempo para me instruir e auxiliar no meu projeto, sempre sendo um poço de paciência e conhecimento.

Agradeço a todos os técnicos e funcionários que me ajudaram de mais diversas formas, sempre se dispondo a ajudar no que fosse necessário.

Especialmente, gostaria de registrar minha gratidão à minha família. Aos meus pais, Cristina e Mário Yamauchi, que sempre estiveram ao meu lado nas horas mais difíceis. Vocês me proporcionaram tudo que tenho, tudo que vivi e o privilégio de buscar conhecimento e fazer o que gosto. Ainda, agradeço a minha irmã, Bruna Rye Yamauchi, com quem compartilhei minhas alegrias mais sinceras e meus medos mais profundos, mesmo estando distante.

Agradeço pela cumplicidade e apoio da pessoa que estive mais próxima de mim nessa caminhada longe da família, o meu namorado, Gabriel Fellipe Barros Rodrigues. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, principalmente nas adversidades.

Agradeço a todas as amigas verdadeiras que encontrei em meio a essa longa caminhada, que me apoiaram de mais diversas formas. Quero dizer a todos que sou grata por cada os momentos de alegria a partilharmos, tal como cada briga que tivemos e superamos. Mesmo em caminhos diferentes, desejo que possa tê-los sempre em minha vida.

Por fim, reconheço os muitos apoios e ajudas de pessoas que possibilitaram tudo que sou e tudo que eu tenho. Então, termino deixando meu agradecimento a todos que mesmo indiretamente influenciaram positivamente a minha vida.

Sumário

BOTUCATU – SP 2019	1
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. O REINO FUNGI, SUA DIVERSIDADE: ESPÉCIES PATOGÊNICAS E OPORTUNISTAS	9
1.2. DISTRIBUIÇÃO E ECOLOGIA DOS AGENTES FÚNGICOS.	12
1.3. EVOLUÇÃO DA BIOLOGIA MOLECULAR E A COMPREENSÃO DA COMUNIDADE FÚNGICA	15
1.4. DISTRIBUIÇÃO E COMUNIDADE FÚNGICA	16
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
2. MICOBIOMA ASSOCIADO A AMOSTRAS DE SOLOS DO CENTRO-OESTE PAULISTA MEDIANTE SEQUENCIAMENTO DE NOVA-GERAÇÃO (NGS): ANÁLISES E DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS.	26
2.1. RESUMO	26
2.2. INTRODUÇÃO	27
2.3. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.3.1. COLETA	31
2.3.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	33
2.3.2.1. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS: DETECÇÃO DE <i>PARACOCCIDIOIDES</i> SPP POR NESTED PCR	33
2.3.2.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS: SEQUENCIAMENTO ILLUMINA MISEQ	33
2.3.3. PROCESSAMENTO DOS DADOS	34
2.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
2.4.1. ANÁLISE DE DADOS	36
2.4.2. DIVERSIDADE ALFA	37
2.4.3. DIVERSIDADE BETA	41
2.4.4. A DISTRIBUIÇÃO DE AGENTES PATOGÊNICOS	44
2.5. CONCLUSÃO	48
2.6. REFERÊNCIAS	50
3. APÊNDICE	58

Abreviaturas

CA: cerrado (brazilian savana)

EA: edifício abandonado (abandoned building)

MU: floresta sazonal semidecídua (sazonal semideciduous forest)

NGS: Sequenciamento de Nova-Geração

OTU: Unidade Taxonômica Operacional

PCA: plantação de cana-de-açúcar (sugarcane plantation)

PCF: plantação de café (coffee plantation)

PCM: paracoccidioidomicose

PS: pastagem (pasture)

TC: toca de coruja (owl's burrow)

TT: toca de tatu (armadillo's burrow)

1. Introdução e revisão bibliográfica

1.1. O Reino Fungi, sua diversidade: espécies patogênicas e oportunistas

O reino Fungi abriga enorme número de espécies, cuja real dimensão da sua biodiversidade ainda é desconhecida. Estima-se que mais de 90% das espécies ainda não foram sequer descritas (HAWKSWORTH, 1991, 2001). A maioria destas espécies atuam como decompositores, outras ocorrem associadas a hospedeiros vivos, vegetal ou animal, em relações simbióticas, comensais, mutualística ou em parasitismo (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). Assim, esses organismos têm fortes impactos ecológicos, econômicos e sociais, podendo incidir em áreas como a agricultura, biotecnologia e saúde, humana e animal (doméstico e silvestre).

A real diversidade fúngica, assim como a sua taxonomia ainda é pouco compreendida. A pouco tempo, o reino fungi era dividido em quatro filos: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota. Chytridiomycota e Zygomycota eram considerados táxons mais basais, sendo que o primeiro agrupava representantes flagelados (zoósporos). Os fungos deste filo necessitam de água para sua dispersão sendo associados a ambientes aquáticos e/ou com alta umidade (BARR, 2001), enquanto que os representantes de Zygomycotas são adaptados à vida terrestre, apesar de serem favorecido também em ambientes úmidos (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019; TEDERSOO et al., 2014). Mais recentemente, os filos Chytridiomycota e Zygomycota sofreram modificações na sua classificação. Chytridiomycota foi dividido em Chytridiomycota (sensu stricto), Blastocladiomycota e Neocallimastigomycota, todos contendo fungos flagelados. A subdivisão do filo Zygomycota ainda não está devidamente definida, carecendo de consenso em seus subgrupos (HIBBETT et al., 2007; JAMES et al., 2006; WIJAYAWARDENE et al., 2018). O ambiente terrestre apresenta uma alta diversidade fúngica, sendo dominando maioritariamente por fungos do sub-reino Dikarya (maioria dos fungos descritos). Este sub-reino está conformado por fungos ascomicetos e basidiomicetos que se caracterizam por possuir sinapomorfia das hifas dicarióticas (JAMES et al., 2006).

Os fungos patogênicos são amplamente distribuídos nos diferentes filos. Os humanos e animais homeotérmicos em geral contam com eficientes mecanismos contra infecções fúngicas, mesmo assim, ainda são acometidos por alguns grupos destes agentes,

desenvolvendo as micoses, as quais podem ser classificadas em superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas ou profundas (HOOG; GUARRO, 1995; RIPPON, 1982).

As micoses superficiais e cutâneas afetam camadas mais superficiais e via de regra são adquiridas pelo contato direto com o agente, a partir do ambiente ou de um hospedeiro contaminado. Nas infecções superficiais a resposta imune celular costuma ser ausente, pois acometem pelos, lipídios e peles mortas. As micoses cutâneas afetam camadas vivas e externas da pele, como a epiderme ou mucosa, podendo causar uma resposta imune celular no hospedeiro, com manifestação de vermelhidão e prurido. Como exemplo destas micoses temos infecções de peles, como as dermatofitoses causadas por fungos queratinofílicos, os dermatófitos e as dermatomicoses (infecções causadas por fungos não dermatófitos) (ELLABIB M. S.; KHALIFA Z.; KAVANAGH K., 2003) Já as micoses subcutâneas são adquiridas por inoculação traumática, se instalando assim no tecido subcutâneo (subcutis), onde tendem a ficar localizadas e normalmente com presença de uma resposta imune bastante ativa e manifestações ulcerativas (RIPPON, 1982).

As micoses sistêmicas (também chamadas micoses profundas) por sua vez se manifestam em órgãos internos (pulmão, baço, fígado, etc) e normalmente se disseminam pelos vasos (sanguíneos ou linfáticos), podendo assim causar também manifestações secundárias em tecidos cutâneos e subcutâneos. Estas micoses podem ser causadas por dois grupos de fungos bem distintos: os oportunistas e os patogênicos propriamente ditos, também denominados dimórficos endêmicos. Enquanto os oportunistas pertencem a grupos taxonômicos bastante diversificados de Ascomicetos, Basidiomicetos e Zigomicetos, os patogênicos pertencem principalmente à uma mesma ordem de fungos Ascomicetos (Onygenales). Os patógenos desta ordem se concentram nas famílias Onygenaceae e Ajellomycetaceae (HOOG; GUARRO, 1995).

Deste modo, a ordem Onygenales (Ascomicetos), é especialmente importante por agrupar tanto os agentes etiológicos das micoses cutâneas mais prevalentes no homem e animais (os dermatófitos), como os dimórficos endêmicos causadores de micoses sistêmicas. Muitas espécies desta ordem têm a capacidade de degradar queratina, sendo importante para o ciclo natural da queratina na natureza. Estas espécies, conhecidas como queratinofílicas ou queratinolíticas, têm afinidade por substratos queratinizados, sendo

encontradas tanto em situação de saprofismo no ambiente como em parasitismo animal (OLLÉ, 2006). Os dermatófitos queratinofílicos causadores de dermatofitoses pertencem à família Arthrodermataceae e são responsáveis por maior parte das micoses cutâneas registradas, tendo muitas espécies antropofílicas e zoofílicas (ELLABIB M. S.; KHALIFA Z.; KAVANAGH K., 2003).

Como já mencionado, a ordem agrupa ainda, importantes agentes patogênicos de micoses sistêmicas e endêmicas. Eles são conhecidos como patógenos verdadeiros e são tipicamente adquiridos por inalação, causando uma infecção primária pulmonar de onde podem se disseminar sistemicamente em hospedeiros imunocompetentes (ASCIOGLU et al., 2002; HOOG; GUARRO, 1995) Estes fungos normalmente são dimórficos, pois apresentam morfologia leveduriforme ou micelial, dependendo da temperatura e do meio em que se encontram. No ambiente encontram-se sob a forma filamentosa, como saprófitos em seu habitat, produtora de conídios infectantes, os quais são inalados por hospedeiro animal e, no tecido pulmonar, em sua forma parasitária, mudam sua morfologia para células individualizadas (leveduras ou endósporos) (FRANCO et al., 1993; SAN-BLAS, 1993; TEIXEIRA et al., 2014a). Estudos filogenéticos associados às observações micológicas indicaram que estes agentes originalmente acomodados numa única família (Onygenaceae) pertenciam a dois subgrupos distintos. Uma nova família (Ajellomycetaceae) foi erigida (UNTEREINER et al., 2004), a qual contém as espécies *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Emmonsia* spp. e *Paracoccidioides* spp. (COLOMBO et al., 2011; DUKIK et al., 2017) , além do novo gênero *Emergomyces*, causadores de micoses sistêmicas no continente Africano e também outras diversas regiões geográficas (DUKIK et al., 2017; SCHWARTZ et al., 2019). As espécies *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* estão devidamente posicionadas na família Onygenaceae (GALGANI et al., 2005).

Os agentes oportunistas geralmente acometem indivíduos com algum grau de imunodeficiência, como os pacientes com AIDS, transplantes, tumor, etc (ASCIOGLU et al., 2002). Com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, as micoses oportunistas têm ganhado destaque no mundo todo (GUPTA; GUPTA, 2017). As micoses se tornam especialmente importantes pela alta morbidade e mortalidade que podem apresentar nestes pacientes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

1.2. Distribuição e Ecologia dos agentes fúngicos.

Os agentes oportunistas comumente estão presentes em ambientes diversificados, podendo inclusive constituir a microbiota normal de hospedeiros animais. Enquanto os fungos oportunistas apresentam uma distribuição mais universal, os dimórficos da ordem Onygenales tendem a apresentar uma distribuição geográfica mais definida, ou seja, ocorrem endemicamente em determinadas regiões (COLOMBO et al., 2011; LEE; LAU, 2017).

A distribuição dos fungos dimórficos (Onygenales e não-Onygenales) é variada (**Figura 1**), sendo a América Latina uma região com ampla ocorrência destas espécies. No Brasil, observa-se a endemia de paracoccidioidomicose (PCM), a mais importante micose sistêmica da América Latina, que tem como seu agente etiológico *Paracoccidioides* spp. (BRUMMER; CASTANEDA; MENDES et al., 2017; RESTREPO, 1993; SHIKANAI-YASUDA et al., 2018). A ocorrência de coccidioidomicose, é observada somente na região nordeste de nosso país, enquanto a histoplasmose, também prevalente no Brasil, apresenta uma ampla ocorrência em toda América. Destacamos ainda, a alta epidemia de esporotricose (micose geralmente subcutânea) no Brasil, decorrente do *Sporothrix brasiliensis*, que apresenta uma maior virulência e adaptações a transmissão zoonótica e infecções em felinos, quando comparados com outros agente do gênero (*S. schenckii* e *S. globosa*) e no momento apresenta-se na forma hiper-epidêmica em várias regiões do país, em especial no Rio de Janeiro (LOPES-BEZERRA et al., 2018; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016).

O solo é um importante ambiente para estudo de fungos saprofíticos e fungos patogênicos, abrigando uma diversidade muito grande de micobiota (diversidade fúngica), que diverge de acordo com sua estratificação e vegetação local (BUÉE M. et al., 2009), clima (TEDERSOO et al., 2014) e fatores ambientais (GEML, 2019; VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015). Este ambiente é o habitat natural de muitos agentes responsáveis por micoses importantes como *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides* spp., *Emmonsia* spp. e dermatófitos, além dos fungos oportunistas, como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., que atuam como saprófagos generalistas nestes ambientes. Além disso, também há espécies patogênicas associadas a animais, como *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus* spp., relacionada a fezes de morcegos e aves, que podem estar associada a

solo de determinados ambientes (ELLIS; PFEIFFER, 1990; HOOG; GUARRO, 1995; WHEAT; KOHLER; TEWARI, 1986).

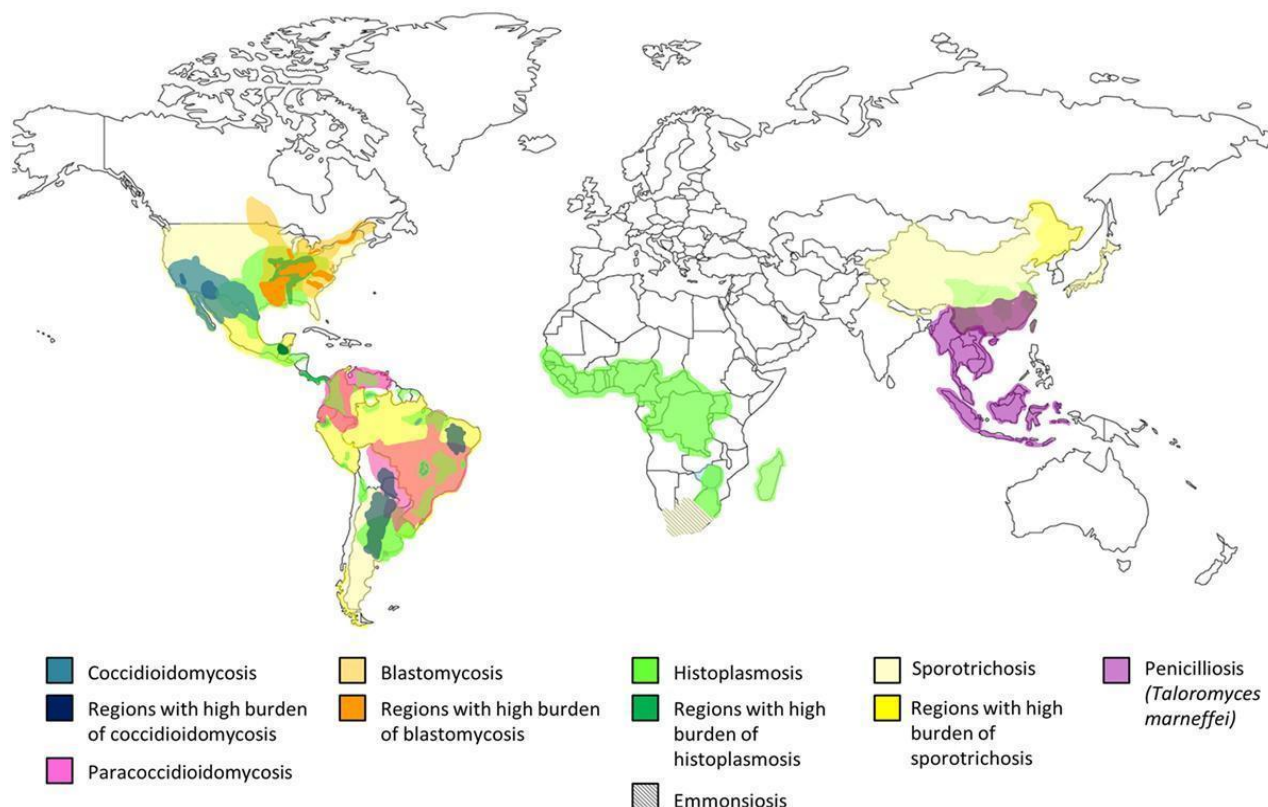


Figura 1. Distribuição global das micoses endêmicas.
Fonte: LEE e LAU, 2017, Frontier Immunology

Apesar de haver diferente grau de conhecimento destes agentes, estes e muitos outros fungos responsáveis por micoses são pouco compreendidos em seus aspectos ecológicos, pela dificuldade de isolamento ou por não serem cultiváveis em meios de culturas (condições laboratoriais). Este é o caso, por exemplo, do *Paracoccidioides* spp. Apesar de significativos avanços no conhecimento dos aspectos filogenéticos das espécies de *Paracoccidioides* (MATUTE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2014a; TURISSINI et al., 2017), a ecologia destes organismos ainda é pouco compreendida (RESTREPO M, 1985). Os agentes etiológicos da PCM, assim como muitos agentes patogênicos da ordem, têm como provável habitat o solo e estão associados a habitats/presença de animais, como os tatus (*Dasypus novemcinctus*), neste caso, hospedeiro silvestre conhecido de

Paracoccidioides spp. (HRYCYK et al., 2018). Estes animais cavam as tocas, que constituem um ambiente com condições ideais para desenvolvimento de muitos fungos, tal como: proteção contra radiação, vento e variação térmica brusca; presença de matéria orgânica, derivado de sua alimentação, especialmente o material queratinizado; e matéria nitrogenada, derivada das fezes (THEODORO et al., 2005). Assim, estes ambientes podem estar favorecendo o crescimento e manutenção do fungo e o contato com estes animais ou suas tocas constitui um aumento dos fatores de riscos para a infecção em pessoas residentes nas áreas endêmicas da doença (CADAVID; RESTREPO, 1993).

A nossa recente pesquisa no laboratório gerou evidências de que os fungos do gênero *Paracoccidioides* podem estar presentes de maneira mais ampla, associada a tocas de corujas-buraqueiras (*Athene cunicularia*). Estas aves de rapina têm o hábito de cavar e viver em tocas relativamente profundas, o que pode favorecer o crescimento de *Paracoccidioides* spp. e também de outros fungos patogênicos da ordem Onygenales. Pelo fato de *A. cunicularia* ter um habitat amplo, incluindo ambientes mais urbanizados e com movimentação humana (SICK, 1984; SIGRIST, 2009).

Ambiente relativamente protegido e associado à presença de animais também pode ser um fator facilitador para outros fungos patogênicos de distribuição mais ampla, pertencentes a outros grupos taxonômicos não-Onygenales, como *Sporothrix* spp., causadores da esporotricose. Isto é evidenciado pelo isolamento do fungo *Sporothrix schenckii* em solo de toca de tatus (RODRIGUES et al., 2014), pelo desenvolvimento da doença nestes animais (WENKER et al., 1998) e pela observação da doença em humanos caçadores de tatus na região Sul do Brasil (ALVES et al., 2010).

Outros fatores ambientais, além do hospedeiro animal silvestre, também poderiam ser importantes. Este parece ser o caso do *Coccidioides* spp que embora esteja fortemente associado ao solo e animais e suas tocas, sua ocorrência prevalece em ambientes áridos. Várias evidências indicam que alguns fungos parecem ser favorecidos em ambientes mais hostis (DIGHTON; WHITE; WHITE, 2005), por apresentar uma maior resistência às condições ambientais.

1.3. Evolução da biologia molecular e a compreensão da comunidade fúngica

Assim como acontece com outros microrganismos, o método de cultivo/isolamento fúngico distorce a real diversidade (tanto em relação a riqueza quanto em relação a abundância) presente no meio, apesar das técnicas que possibilitam isolamento de colônias puras (PESSOA FILHO, 2011). Isso se deve aos diversos fatores, desde quantidade de esporos produzidos, velocidade de crescimento fúngico, temperatura de incubação e meio de cultura selecionado até a aleatoriedade da distribuição dos esporos. Ainda, estimativas apontam que apenas 1% da microbiota é cultivável em condições ambientais, devido ao desconhecimento da necessidade nutricional de diversos organismos (MOREIRA, 2013).

Com o avanço da biologia molecular, que classicamente trabalhava com identificação de organismos em culturas, tem sido possível a identificação (até nível de gênero e espécie) de microrganismos específicos, sem a necessidade de isolamento e cultivo do mesmo (MANCINI et al., 2010). Hoje, há várias técnicas que permitem a detecção de espécies/gêneros determinados (como no caso da técnica de Nested PCR), possibilitando, por exemplo, o estudo de mapeamento dos prováveis habitats de um grupo pré-determinado (ARANTES, 2012). Essas técnicas são eficazes no estudo de algumas espécies, mas se limitam por necessitar de estudo prévio da espécie-alvo, pois demandam a criação de primers específicos para cada espécie.

Novas técnicas surgem com o avanço da biologia molecular, permitindo estudos de metagenomas ambientais (DNA de todos os organismos presentes em determinado local), possibilitando mensurar a diversidade da microbiota em diferentes ambientes, sem a necessidade de cultura prévia (XU, 2006). Os métodos de estudo de metagenoma têm sido aprimorados, se tornando uma forte ferramenta que permite, além comparar as diversidades, trabalhar interações, funções e metabolismo, dependendo do objetivo (MOREIRA, 2013; PESSOA FILHO, 2011; PETROSINO et al., 2009).

O rápido desenvolvimento na tecnologia de sequenciamento possibilitou a redução do custo e tempo no sequenciamento e aumentou a sua precisão. O sequenciamento de nova geração (NGS), como são conhecidas estas tecnologias que possibilita um sequenciamento de alta cobertura do DNA ambiental (metagenoma), permite uma visão mais ampla sobre a estrutura, a diversidade e a função da comunidade microbiana, sendo uma importante chave para compreensão deste no ecossistema (LIU et al., 2011, 2012; LUO et al., 2012; XU, 2006).

1.4. Distribuição e Comunidade fúngica

A distribuição e a estruturação da comunidade fúngica, assim como outras questões no reino, são pouco compreendidas. A utilização de diferentes métodos de Sequenciamento de Nova-Geração (NGS) vem aumentando nos últimos anos, inclusive nos estudos micológicos, colaborando na compreensão geral da ecologia e biogeografia dos fungos. A maioria dos trabalhos de micobiota é realizada nas amostras de solo, por este se apresentar um ambiente rico em microrganismos, especialmente fungos, quando comparada, por exemplo, com ambiente aquático (PEAY; KENNEDY; TALBOT, 2016b).

A comunidade de microrganismo, em geral, é sensível a mudanças das condições ambientais sendo difícil estabelecer padrões (SOLÉ et al., 2008). Os trabalhos realizados com a micobiota do solo, indicam uma diversidade fúngica que varia de acordo com muitos fatores ambientais. Tedersoo et al. (2014), por exemplo, constatou a variação da comunidade fúngicas por padrão biogeográfico, onde os fatores como temperatura e precipitação anual, apresentaram uma forte correlação com o aumento ou diminuição de alguns grupos. Além disso, o padrão do ambiente ou até mesmo do micro-habitat influenciam na variação da comunidade (BALDRIAN et al., 2012; GEML, 2019; VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015). Dentre os fatores ambientais que influenciam na estrutura da comunidade fúngica podemos destacar: padrões climáticos, dependendo de precipitação e de temperatura (influenciada por latitude) (GEML, 2019); fatores edáficos (associada a composição do solo), como o pH e íons de cálcio (Ca) que podem favorecer o crescimento de certos fungos; umidade, que aumenta a diversidade fúngica de forma geral (BUÉE M. et al., 2009; GEML, 2019; TEDERSOO et al., 2014); e características do micro-habitat, como estabilidade e/ou exposição do ambiente, presença de vegetação, atividade animal, etc. (O'BRIEN et al., 2005). Em trabalho de meta-análise, utilizando-se de dados disponíveis de outros 36 estudos de micobioma e fatores ambientais associados, observou-se que o fator clima deve ser o principal agente determinante da biogeografia fúngica, incluindo o padrão de distribuição global das espécies, bem como a composição e diversidade das espécies nas comunidades (VETROVSKY et al 2019) (inserindo pelo meu Zotero (VĚTROVSKÝ et al., 2019). Esse estudo de Větrovský et al (2019) também indicou outro aspecto aparentemente peculiar da distribuição global da diversidade fúngica – uma maior diversidade fúngica em altas latitudes – o que difere do padrão geral

observado em plantas e animais, cujas diversidades tendem a aumentar em direção aos trópicos (HILLEBRAND, 2004; HU et al., 2019).

De forma geral, ainda são relativamente poucos estudos realizados com fungos, utilizando a NGS, quando comparada com outros microrganismos. Os trabalhos com esta abordagem têm mostrado eficiência do método, embora apresentem limitações que estão sendo compreendidas e aperfeiçoadas quanto a própria técnica (LIU et al., 2012; LUO et al., 2012), o desenho dos primers (TAYLOR et al., 2016) e a análise dos dados (BOLYEN et al., 2018; GWEON et al., 2015; NILSSON et al., 2015; PALMER et al., 2018).

A melhor compreensão da microbiota associada aos solos é essencial para a compreensão da sua ecologia, tal como da evolução de grupos importantes. Além disso, estudos de microbioma fornecem importantes dados sobre a influência de diferentes fatores ambientais em sua composição. Entender a estrutura e a função da comunidade fúngica é essencial para compreensão de sua mudança e seu manejo. Os microrganismos poderiam ser indicadores de qualidade dos solos, podendo, por exemplo, beneficiar o crescimento e favorecer plantações em áreas de cultivo.

Este tipo de estudo permite também evidenciar a epidemiologia e ecologia de espécies patogênicas amplamente prevalentes no Brasil. A evidência da presença de *Paracoccidioides* spp., bem como outros fungos Onygenales em ambientes urbanizados, associado à outras espécies animais (como corujas) é preocupante, uma vez que poderia ampliar as áreas de risco de infecção pelos fungos em locais mais próximos a áreas urbanas. Ainda a compreensão de sua real distribuição e os fatores ambientais que favorecem este fungo é bastante debatida. O entendimento da prevalência de agentes patogênicos em diferentes ambientes é necessário para estabelecer padrões, entender a epidemia e as áreas de risco, podendo influir na prevenção da doença.

Nesse presente trabalho, utilizamos técnicas de NGS para caracterizar a diversidade fúngica presente em solos de diferentes ambientes na região endêmica de PCM de Botucatu, permitindo um melhor entendimento da estrutura da comunidade fúngica e da prevalência de fungos patogênicos.

1.5. Referências Bibliográficas

- ALVES, S. H. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 523–525, out. 2010.
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, n. 1, p. 32–46, 2001.
- ARANTES, T. D. et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83–92, 1 jan. 2013.
- ASCIIOGLU, S. et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 2002.
- BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 505–512, abr. 1998.
- BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–223, 1 jan. 2003.
- BALDRIAN, P. et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 248–258, fev. 2012.
- BARR, D. J. S. Chytridiomycota. In: MCLAUGHLIN, D. J.; MCLAUGHLIN, E. G.; LEMKE, P. A. (Eds.). **Systematics and Evolution: Part A. The Mycota**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 93–112.
- BARROS, M. B. DE L.; PAES, R. DE A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, 1 out. 2011.
- BOLYEN, E. et al. **QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science**. [s.l.] PeerJ Inc., 3 dez. 2018. Disponível em: <<https://peerj.com/preprints/27295>>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.
- BROWN, J. et al. Coccidioidomycosis: epidemiology. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 185–197, 2013.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, abr. 1993.

BUÉE M. et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 449–456, 25 set. 2009.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiology & Infection**, v. 111, n. 1, p. 121–133, ago. 1993.

CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, jan. 2015.

CHAO, A. et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs**, v. 84, n. 1, p. 45–67, 2014.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 1 nov. 2011.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, p. 165–191, 1 mar. 2016.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 5–31, 2017.

DIGHTON, J.; WHITE, J. F.; WHITE, J. F. **Fungal Communities of Desert Ecosystems: Links to Climate Change**. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/>>. Acesso em: 24 set. 2019.

ELLABIB M. S.; KHALIFA Z.; KAVANAGH K. Dermatophytes and other fungi associated with skin mycoses in Tripoli, Libya. **Mycoses**, v. 45, n. 3-4, p. 101–104, 16 dez. 2003.

ELLIS, DAVIDH.; PFEIFFER, TANIAJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **The Lancet**, Originally published as Volume 336, Issue 8720. v. 336, n. 8720, p. 923–925, 13 out. 1990.

FETCHER, N.; OBERBAUER, S. F.; STRAIN, B. R. Vegetation effects on microclimate in lowland tropical forest in Costa Rica. **International Journal of Biometeorology**, v. 29, n. 2, p. 145–155, 1 jun. 1985.

FILHO, Q.-T.; DE, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 345–346, ago. 1997.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**. 1 edition ed. Boca Raton: CRC Press, 1993.

GEMPL, J. Soil fungal communities reflect aspect-driven environmental structuring and vegetation types in a Pannonian forest landscape. **Fungal Ecology**, v. 39, p. 63–79, 1 jun. 2019.

GHOSH, A. et al. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v. 45, n. 11–12, p. 449–454, 2002.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=BFJCDQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Gotelli,+N.+J.,+%26+A.+M.+Ellison,+2016.+Princ%C3%ADpios+de+estat%C3%ADstica+em+ecologia.+Artmed+Editora,+Porto+Alegre&ots=DOvo8pT_X_&sig=dekbNLZYjKna4SGA5Ru_K3hwz1A#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 30 set. 2019.

GRÄSER, Y. et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. **Medical Mycology**, v. 37, n. 2, p. 105–114, 1 jan. 1999.

GUPTA, R. K.; GUPTA, P. Opportunistic Fungal Infections. In: **Pathology of Opportunistic Infections**. [s.l.] Springer, Singapore, 2017. p. 53–130.

GWEON, H. S. et al. PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 8, p. 973–980, ago. 2015.

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51 Suppl 4, p. 2–15, set. 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641–655, 1 jun. 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, dez. 2001.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 1 maio 2007.

HILLEBRAND, H. On the Generality of the Latitudinal Diversity Gradient. **The American Naturalist**, v. 163, n. 2, p. 192–211, fev. 2004.

HOFF, G. L.; BIGLER, W. J. THE ROLE OF BATS IN THE PROPAGATION AND SPREAD OF HISTOPLASMOSIS: A REVIEW. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 2, p. 191–196, abr. 1981.

HOOG, G. S. DE et al. Species Diversity and Polymorphism in the *Exophiala spinifera* Clade Containing Opportunistic Black Yeast-Like Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4767–4778, 1 out. 2003.

HOOG, G. S. DE; GUARRO, J. Atlas of clinical fungi. **Atlas of clinical fungi**, 1995.

HRYCYK, M. F. et al. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, 2018.

- HU, Y. et al. Contrasting latitudinal diversity and co-occurrence patterns of soil fungi and plants in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 131, p. 100–110, abr. 2019.
- JAMES, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818–822, out. 2006.
- LEE, P. P.; LAU, Y.-L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- LEE TAYLOR, D. et al. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, 2016.
- LEVITZ, S. M. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1163–1169, 1 nov. 1991.
- LIU, B. et al. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. **Genome Biology**, v. 12, n. 1, p. P11, 19 set. 2011.
- LIU, L. et al. **Comparison of Next-Generation Sequencing Systems**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364/>>. Acesso em: 30 set. 2019.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. 126–143, 1 abr. 2018.
- LUO, C. et al. Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30087, 10 fev. 2012.
- MARQUES, S. A.; FRANCO, M. F.; MENDES, R. P. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DA PARACOCIDIOIDOMICOSE NA AREA ENDEMICA DE BOTUCATU (SAO PAULO - BRASIL). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 87–92, 1 jan. 1983.
- MARTIN, D. J. Selected Aspects of Burrowing Owl Ecology and Behavior. **The Condor**, v. 75, n. 4, p. 446–456, 1973.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.
- MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.
- MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J. Fungal flora of the coat of pet cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 602–606, abr. 1991.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology E-Book**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2015.

NAIFF, R. D. et al. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19–27, fev. 1986.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1443–1476, 2019.

NGUYEN, C. et al. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 505–525, jul. 2013.

NILSSON, R. H. et al. A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 2, p. 145–150, 2015.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, set. 2005.

OLLÉ, M. S. **Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales**. <http://purl.org/dc/dcmitype/Text>—[s.l.] Universitat Rovira i Virgili, 2006.

PALMER, J. M. et al. Non-biological synthetic spike-in controls and the AMPtk software pipeline improve mycobiome data. **PeerJ**, v. 6, p. e4925, 28 maio 2018.

PEAY, K. G.; KENNEDY, P. G.; TALBOT, J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434–447, jul. 2016a.

PEAY, K. G.; KENNEDY, P. G.; TALBOT, J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434–447, jul. 2016b.

PESSOA FILHO. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado. 1 abr. 2011.

QUIDEAU, S. A. et al. A direct link between forest vegetation type and soil organic matter composition. **Geoderma**, v. 104, n. 1, p. 41–60, 1 nov. 2001.

RESTREPO, A. et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Medical Mycology**, v. 38 Suppl 1, p. 67–77, 2000.

RESTREPO M, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. **Medical Mycology**, v. 23, n. 5, p. 323–334, jan. 1985.

RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 1 ago. 2004.

RIPPON, J. W. **Medical Mycology: Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. 2nd edition ed. Philadelphia: W B Saunders Co Ltd, 1982.

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 199–206, abr. 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, 14 jul. 2016.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.

SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, v. 24, n. 3, p. 267–268, 1993.

SANCHOTENE, K. O. et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.

SCHWARTZ, I. S. et al. *Emergomyces*: The global rise of new dimorphic fungal pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 9, 19 set. 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. esp, nov. 2018.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Brasília: Editora Universidade De Brasília, 1984.

SIGRIST, T. **Avifauna Brasileira: Guia De Campo Avis Brasilis: The Avis Brasilis Field Guide to the Birds of Brazil**. Vinhedo, SP: Avis Brasilis, 2009.

SOLÉ, M. et al. Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for assessing anthropogenic stress. **Science of The Total Environment**, v. 389, n. 2, p. 557–565, 25 jan. 2008.

SUMMERBELL RC. **Form and function in the evolution of dermatophytes**. Disponível em: <<https://www.dermatophytes.reviberoammicol.com/contents.php?030043>>. Acesso em: 29 set. 2019.

TAYLOR, D. L. et al. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7217–7226, 15 dez. 2016.

TAYLOR, M. L. et al. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 451–458, 2005.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 28 nov. 2014.

- TEIXEIRA, M. DE M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 19–28, jan. 2014a.
- TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014b.
- TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 30 out. 2014c.
- THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725–729, 1 dez. 2005.
- TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 106, p. 9–25, 2017.
- UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 1 jul. 2004.
- VARGAS-GASTÉLUM, L. et al. Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 5, maio 2015.
- VĚTROVSKÝ, T. et al. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, dez. 2019.
- VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology, Black fungal extremes**. v. 61, p. 137–144, 1 jan. 2008.
- WENKER, C. J. et al. Sporotrichosis in a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 29, n. 4, p. 474–478, dez. 1998.
- WHEAT, L. J.; KOHLER, R. B.; TEWARI, R. P. Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis by Detection of *Histoplasma capsulatum* Antigen in Serum and Urine Specimens. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 2, p. 83–88, 9 jan. 1986.
- WHEELER, K. Improving My Average. **The Missouri Review**, v. 14, n. 2, p. 141–157, 1991.
- WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols : a Guide to Methods and Applications**, p. 315–322, 1990.
- WIJAYAWARDENE, N. N. et al. Notes for genera: basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). **Fungal Diversity**, v. 92, n. 1, p. 43–129, 1 set. 2018.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1713–1731, jun. 2006.

YORK, M.; ROSENBERG, D.; STURM, K. Diet and food-niche breadth of Burrowing Owls (*Athene cunicularia*) in the Imperial Valley, California. **Western North American Naturalist**, v. 62, n. 3, 30 jul. 2002.

ZAITS, C. **Compendio de Micologia Medica**. Medicina e Saude edition ed. [s.l.] Editora Guanabara Koogan, 2010.

ZENG, J. S. et al. Spectrum of Clinically Relevant *Exophiala* Species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3713–3720, 1 nov. 2007.

ZHOU, X. et al. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, 2013.

2. Microbioma associado a amostras de solos do centro-oeste paulista mediante sequenciamento de Nova-Geração (NGS): Análises e distribuição de espécies patogênicas.

2.1. Resumo

O reino fungi é constituído por amplos grupos de organismos com reconhecida importância ecológica, industrial ou médica. O solo é um importante reservatório para microrganismos, especialmente fungos, que atuam na decomposição e reciclagem de nutrientes ou se associam com animais e plantas em relações simbióticas ou causando patogenias. Ainda são poucos os estudos relacionados a estrutura do microbioma, sendo rasa a compreensão da diversidade e ecologia de fungos. A compreensão dos padrões de distribuição da diversidade fúngica é essencial para mensurar as mudanças naturais e antrópicas relacionadas a estas comunidades, tal como entender a ecologia e epidemiologia dos fungos considerados patogênicos. Neste trabalho caracterizamos a diversidade fúngica das amostras de solo em diferentes ambientes no município de Botucatu (Brasil), descrevendo a estrutura da comunidade fúngica e mensurando a prevalência dos fungos patogênicos, mediante a técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). No sequenciamento mediante plataforma Illumina, analisamos 44 amostras provenientes de 8 ambientes diferentes, em dois períodos (outono e primavera), incluindo tocas de tatus, corujas e outros ambientes relacionados. A riqueza e diversidade variaram entre os ambientes, sendo favorecido nas amostras ambientais da floresta sazonal semidecidual e das tocas de tatus, os quais possuem uma maior cobertura vegetal. Ainda, ambientes mais antropizados, com menores efeitos de cobertura vegetal, como edifício abandonado e toca de coruja, proporcionaram as menores diversidades, apesar de favorecer crescimento de alguns fungos patogênicos. Os fungos patogênicos dimórficos, quando comparada com os fungos oportunistas, foram encontrados em baixas frequências, como foi o caso de *Paracoccidioides* spp., endêmico da região, que foi encontrado em diversos ambientes em baixa abundância. A estrutura da comunidade se mostrou mais similar nas amostras coletadas no mesmo ambiente, com fatores ambientais semelhantes. A pesquisa evidenciou a influência do ambiente nas comunidades fúngicas, mesmo em locais geograficamente próximos.

2.2. Introdução

O reino Fungi é constituído por microrganismos eucarióticos heterotróficos, essenciais para a ciclagem de carbono e nutrientes. Este reino engloba vários grupos funcionais importantes como decompositores e saprotróficos, mutualistas e patógenos de animais e vegetais. A sua ecologia como um todo ainda é pouco compreendida, devido ao reduzido número de pesquisas relacionadas à área, que em grande parte foca em patógenos humanos e/ou organismos com potencial biotecnológico, não sendo considerada a microbiota fúngica em sua totalidade.

A grande dificuldade do estudo da ecologia de fungos está relacionada ao isolamento e cultivo dos fungos de interesse e a falsa correlação do cultivo e sua abundância no ambiente (PESSOA FILHO, 2011). Este fato tem sido superado pela evolução da biologia molecular juntamente com a evolução da bioinformática, que hoje, por métodos de sequenciamento de nova geração, permitem o sequenciamento massivo de milhares de espécies e seu processamento até a obtenção dos dados (LIU et al., 2012; LUO et al., 2012; XU, 2006). Estes métodos de sequenciamento permitem estudos do metagenoma, estimando, além da riqueza (OTUs), a abundância relativa de cada grupo. Estas tecnologias têm possibilitado uma maior compreensão da estrutura da comunidade de microrganismos de uma forma geral, porém ainda há poucos estudos relacionados a microbioma, quando comparado com microbioma de bactéria (TEDERSOO et al., 2014).

O solo é um ambiente bastante rico em microrganismos, especialmente fungos, que atuam na decomposição e ciclagem de nutrientes. A comunidade fúngica apresenta variações em sua distribuição tanto por seu padrão biogeográfico (TEDERSOO et al., 2014), estruturação e padrão do ambiente (GEMPL, 2019) e/ou padrão do micro-habitat (BALDRIAN et al., 2012; VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015). Dentre os fatores ambientais que influenciam na estrutura da comunidade fúngica podemos destacar: o padrão climático, dependendo de precipitação e de temperatura (influenciada por latitude)(GEMPL, 2019); os fatores edáficos (associada a composição do solo), como o pH e íons de cálcio (Ca) que podem favorecer o crescimento de certos fungos; a umidade, que aumenta a diversidade fúngica de forma geral (BUÉE M. et al., 2009; GEMPL, 2019; TEDERSOO et al., 2014); e características do micro-habitat, como estabilidade e/ou

exposição do ambiente, presença de vegetação, atividade animal, etc. (O'BRIEN et al., 2005).

O levantamento da diversidade fúngica em diferentes ambientes, espacial e temporalmente, é essencial para a compreensão da mudança natural (como as mudanças sazonais) da comunidade fúngica (VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015) e da mudança antrópica e climáticas (DIGHTON; WHITE; WHITE, 2005) e suas implicações. Além disso, conhecer a estrutura de comunidade dos fungos pode ajudar na compreensão da epidemiologia de micoses, dos ciclos da matéria e das associações mutualísticas destes organismos, possibilitando, por exemplo, planejar o manejo da comunidade fúngica para facilitar os processos naturais.

Alguns fungos ganham um destaque por serem patógenos de plantas e animais, exercendo influência na economia (patógenos de plantações) ou na saúde (patógenos humanos). As micoses têm uma alta prevalência no mundo todo. Alguns tipos de micoses também apresentam alta mortalidade com difícil diagnóstico e de tratamento (BROWN et al., 2012; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015). As micoses são divididas em vários tipos, que podem ser mais ou menos agressivos para o hospedeiro.

Micoses superficiais e cutâneas são as micoses mais comuns, e se caracterizam por serem fungos pouco virulentos com uma reação imunológica baixa ou inexistente. Micoses superficiais, por exemplo, afetam 25% da população geral (HAVLICKOVA; CZAICA; FRIEDRICH, 2008). Pode ser causada por agentes especializados (dermatófitos) ou por outros fungos não dermatófitos (como infecção por fungos filamentosos não dermatófitos –FFND-), que frequentemente são invasores secundários. Outros fungos, como *Sporothrix spp.*, causam doenças subcutâneas através de lesões e traumas, geralmente causando uma infecção localizada (HOOG; GUARRO, 1995; RIPPON, 1982). As infecções mais graves são as infecções sistêmicas que podem ter uma alta morbidade e mortalidade, devido à grande dificuldade de diagnóstico e tratamento destas doenças. As micoses sistêmicas podem ser causada tanto por fungos endêmicos e especializados nestas infecções, quanto por fungos oportunistas, que infectam pacientes imunocomprometidos (HOOG; GUARRO, 1995; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015). Os fungos oportunistas tem ganhado destaques pelo aumento de número de casos, devido ao aumento de pacientes

imunocomprometidos, derivado de procedimentos médicos e/ou cirúrgicos, como tratamento de câncer e transplantes e do aumento de casos de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) causada por HIV (GUPTA; GUPTA, 2017).

A ordem Onygenales é o grupo taxonômico de maior relevância médica, pois agrupa muitos organismos patogênicos adaptados à infecção humana ou animal. Este amplo grupo é constituído por espécies queratinofílicas, capazes de degradar a queratina, componente natural da pele e pelos de nosso corpo, como no caso dos dermatófitos que se incluem dentro da família Arthrodermataceae (DE HOOG et al., 2017; OLLÉ, 2006). Os dermatófitos são fungos filamentosos pertencentes a nove gêneros diferentes, responsáveis por micoses principalmente cutâneas, mas também superficiais e subcutâneas no homem, bem como em diversos grupos de mamíferos e aves (DE HOOG et al., 2017; GRÄSER et al., 1999; HOOG; GUARRO, 1995).

Ainda bem posicionados na ordem Onygenales, estão os fungos patogênicos dimórficos capazes de causar micoses sistêmicas em hospedeiros imuno-competentes. Estas espécies apresentam a capacidade de se adaptar morfológicamente a diferentes ambientes (ambiente natural ou tecido animal), dependendo principalmente da variação de temperatura (termodimorfismo), sendo a forma leveduriforme particularmente adaptada ao parasitismo tecidual. Estes fungos termodimórficos pertencem à duas famílias distintas, Onygenaceae e Ajellomycetaceae (FRANCO et al., 1993; SAN-BLAS, 1993; TEIXEIRA et al., 2014a). Enquanto *Paracoccidioides* spp., *Histoplasma* spp. e *Blastomyces* spp. pertencem à família Ajellomycetaceae, *Coccidioides* spp. pertencem à família Onygenaceae. As micoses sistêmicas causadas por estes agentes apresentam uma distribuição geográfica relativamente bem definida, com foco particularmente concentrado nas Américas. A paracoccidioidomicose (PCM) é a micose sistêmica de maior relevância na América Latina, enquanto a blastomicose e coccidioidomicose são mais prevalentes na América do Norte, e a histoplasmose apresenta ocorrência mais ampla nas Américas e também outros continentes (COLOMBO et al., 2011; HOOG; GUARRO, 1995; LEE; LAU, 2017).

A região centro-oeste paulista ganha um interesse especial por ser considerada área hiperendêmica de paracoccidioidomicose (PCM), com índices altos da doença, principalmente na cidade de Botucatu e São Manuel (SP) (MARQUES; FRANCO;

MENDES, 1983). Em estudos de ocorrência ambiental, os fungos do gênero *Paracoccidioides* já foi detectada por métodos moleculares de Nested-PCR (ARANTES et al., 2013; HRYCYK et al., 2018).

A afinidade dos fungos patogênicos pode ir além da associação com humanos. Muitos destes agentes adaptados à infecção humana também são responsáveis pelas infecções de outros animais, especialmente mamíferos. É o caso do fungo *Paracoccidioides* sp., que possui um hospedeiro silvestre já reconhecido, o tatu de nove-bandas (*Dasypus novemcinctus*) (BAGAGLI et al., 1998, 2003; NAIFF et al., 1986; TEIXEIRA et al., 2014). Estes agentes estão associados com seu hospedeiro silvestre (tatu), assim como com a sua toca (ARANTES et al., 2013; HRYCYK et al., 2018). Em nosso trabalho mais recente, o *Paracoccidioides* spp. foi detectado em tocas de corujas buraqueiras (*Athene cunicularia*), que tem algumas semelhanças nas características de seu ambiente, sendo um ambiente protegido e enriquecido que poderia constituir outro possível nicho destes organismos (dados não publicados). Além disso, há relatos de infecções fúngicas em animais domésticos que circulam livremente nas áreas endêmicas (RICCI et al., 2004).

Um outro fungo com associação animal é *Sporothrix brasiliensis*, ascomiceto da ordem Ophiostomatales. Este fungo tem se mostrado fortemente adaptado a infecções de gatos domésticos, sendo responsável pela epidemia de esporotricose no Brasil. Isso favorece a transmissão zoonótica desta doença, como observado frequentemente em alguns estados brasileiros (SANCHOTENE et al., 2015).

Pouco se sabe sobre nichos ecológicos dos fungos patogênicos nos ambientes, assim como animais que podem servir como seu hospedeiro silvestre, a amplitude das áreas de risco e sítios de infecção, e a real virulência destes agentes.

Apesar dos Fungos serem um grupo com importância econômica e clínica, ainda se sabe pouco sobre a ecologia da maioria destes organismos, devido à grande dificuldade encontrada em isolar e cultivar laboratorialmente alguns microrganismos do ambiente (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019). Vários destes fungos, principalmente os grupos adaptados ao estilo de vida associado a hospedeiros vivos, apresentam virulência baixa que induz a infecções de caráter mais crônico, com longo tempo de incubação, o que

dificulta a correta definição dos locais de infecção e determinação de áreas de risco e forma de contágio (FORTES et al., 2011; RESTREPO et al., 2000).

A compreensão da ecologia dos agentes etiológicos das doenças é especialmente importante em fungos patogênicos endêmicos, que tem uma distribuição mais restrita e que se acredita ter crescimento favorecido em ambientes específicos, diferentemente de alguns fungos oportunistas que costumam atingir apenas pacientes imunocomprometidos, como os fungos do gênero *Aspergillus*, *Fusarium* e *Candida*, os quais possuem uma distribuição ubíqua (GUPTA, 2017; HOOG; GUARRO, 1995).

Neste trabalho, nos propusemos caracterizar a diversidade e estrutura fúngica em diferentes ambientes mediante NGS, focando na compreensão de padrões e na distribuição de fungos patogênicos, particularmente procurando um melhor entendimento da ecologia e distribuição dos fungos do grupo Onygenales, constituído por importantes agente de micoses humana e animal, e das espécies causadoras de PCM, na região endêmica de Botucatu, Brasil.

2.3. Material e Métodos

2.3.1. Coleta

As coletas foram realizadas em diferentes locais próximos à região urbana de Botucatu, estado de São Paulo, que incluem: tocas de tatus (TT); tocas de corujas (TC); cerrado (CA); edifício abandonado (EA); floresta sazonal semidecídua (MU); plantação de cana-de-açúcar (PCA); plantação de café (PCF); pastagem (PS). As amostras foram coletadas em dois períodos distintos, com intervalo de seis meses, sendo a primeira coleta no começo de mês de maio (3 de maio de 2018) e a segunda coleta no final de mês de outubro (30 de outubro de 2018). Foram totalizadas 44 amostras, sendo 22 da primeira coleta e 22 da segunda coleta (**Apêndice, Tabela 2**).

As amostras foram coletadas utilizando pá metálica com cabo estendido, o qual era sempre limpo com algodão encharcado em álcool 70%, antes de cada amostra. As amostras das tocas (tatus e corujas) foram coletadas com profundidades de até 50 cm da entrada da toca, enquanto para as demais amostras, o solo foi coletado na profundidade de 0-10 cm,

após remoção das camadas superficiais de serapilheira, fragmentos vegetais maiores ou da camada de gramíneas (pastagens). As amostras foram acondicionadas em frascos coletores estéreis individuais de polipropileno e polietileno, translúcidos com tampas e 80 ml de volume.

As coordenadas de cada uma das coletas foram obtidas mediante GPS 12 Personal Navigator® (Garmin®-KS, USA). O local das coletas a partir das coordenadas é mostrado no mapa representado na Figura 1. O mapa foi gerado no Software Q-GIS versão 3.6 Noosa (Equipe de Desenvolvimento do QGIS -2019. Sistema de Informações Geográficas do QGIS. Projeto Código Aberto Geospatial Foundation. <http://qgis.osgeo.org> (**Figura 1**))

Pontos de Coleta

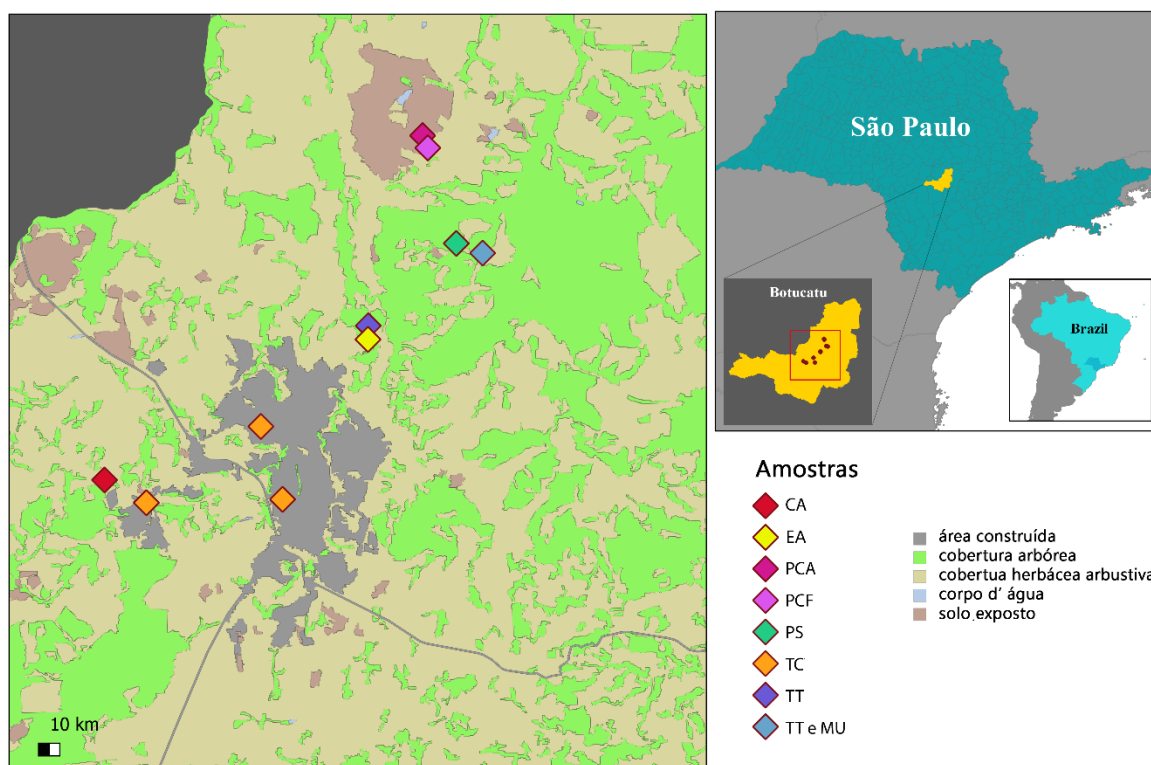


Figura 1. Mapa mostrando os pontos de coleta. CA-cerrado aberto; EA-edifício abandonado; PCA-plantação de cana de açúcar; PCF-plantação de café; PS-pastagem; TC-toca de coruja; TT-toca de tatu; MU- floresta sazonal semidecídua. O mapa foi gerado a partir de mapas do IBGE e processados no software Q-GIS v3.6.

2.3.2. Processamento das amostras

O DNA das amostras foi extraído utilizando kit MoBio (PowerSoil®DNA Isolation Kit), seguindo as instruções do fabricante. A etapa em que a amostra é submetida a dez minutos de agitação em vortex, foi substituído por cinco ciclos (3 x 40s) em ultra-agitação em equipamento Precellys® 24 (Bertin Instruments) para otimizar o processo de extração.

2.3.2.1. Processamento das amostras: detecção de *Paracoccidioides* spp por Nested PCR

As amostras extraídas foram submetidas ao processo de Nested PCR específicos para gênero *Paracoccidioides* (ARANTES et al., 2013). Esta técnica permite uma maior sensibilidade e especificidade. Foram utilizados os primers ITS4 e ITS5 (WHITE et al., 1990) e ParIntS (5'-CAC CGT TGA ACT TCT GGT TCG-3') e ParIntR (5'-TGT CGA TCG AGA GAG GAC ACC-3'), desenhado em nosso laboratório. (**Figura 2** **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) A amplificação foi verificada em gel de corrida com 1,5% de agarose. As amostras amplificadas foram sequenciadas (Serviço de Sequenciamento do IBTEC, Botucatu, SP) para garantir que não haja contaminações e falsos positivos.

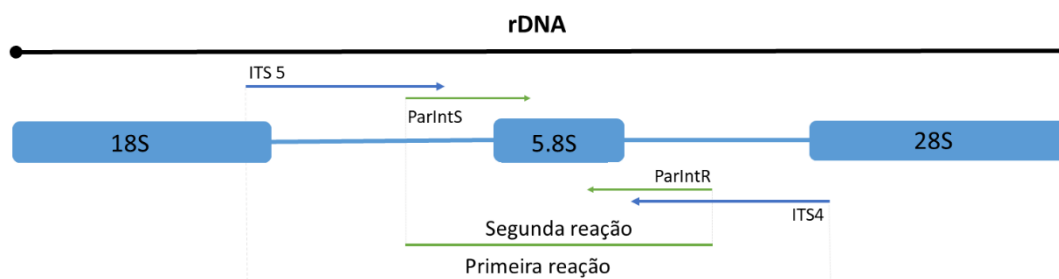


Figura 2. Esquema de primers para Nested PCR

2.3.2.2. Processamento das amostras: sequenciamento Illumina MiSeq

Para a primeira etapa de PCR, utilizamos primers 5.8-Fun e ITS4-Fun 5'- AAC TTT YRR CAA YGG ATC WCT-3' e 5'- AGG CCT CCG CTT ATT GAT ATG CTT AAR T-3', que amplificam a região Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2), pertencente ao DNA ribossomal nuclear (LEE TAYLOR et al., 2016), com a sequência do adaptador da Illumina inserido na extremidade 5', que permitiu a indexação na segunda reação de PCR, sendo o primer forward 5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG-

3' e primer reverse 5'- GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G - 3'. A região ITS apresenta-se em multicópias e sua grande variação entre os diferentes grupos fúngicos permite uma ampla utilização desta região para classificar taxonomicamente estes microrganismos (WHITE et al., 1990). A região ITS2 foi escolhida por ser uma região menor e com tamanhos menos variáveis em relação a ITS1. Este primer previamente selecionado foi desenhado para otimizar a amplificação de Eumycotas, justamente para trabalhos de estudos de diversidade, mostrando-se eficiente para a amplificação de diversos fungos e também restrito em relação à amplificação de outros organismos eucarióticos (LEE TAYLOR et al., 2016).

O DNA extraído das amostras ambientais foi amplificado utilizando KAPA Taq HotStart PCR Kit (Roche - CA, USA), com 25ul de volume da reação, sendo 5ul de volume da amostra na concentração de 5ng/ul. O termociclador (Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems®-CA, USA) foi ajustado para: 95°C por 3 min; 35 ciclos de 98° por 20s, 55°C por 20s, 72°C por 30s; 72°C por 1min, mantendo a 4°C após o término da reação. A amplificação foi verificada em gel de eletroforese e a purificação foi feita utilizando AMPure XP beads Beckman Coulter. Foi realizado a indexação utilizando o Nextera XT Index Kit (96 indexes, 384 samples) (Illumina®-CA, USA). O ciclo utilizado foi 95°C por 3 min, 8 ciclos de 95°C por 30s - 55°C por 30s - 72°C por 30s, finalizado por 72°C por 5 min, mantido em 4°C após o término da reação. O produto purificado foi quantificado utilizando o Qubit™ (Invitrogen- CA, USA). O tamanho da biblioteca foi mensurado utilizando 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies- CA, USA). A concentração de cada amostra foi reajustada para 4nM manualmente. Para o sequenciamento, utilizamos MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) Illumina e a concentração final de 15pM e 25% de Phix Library, biblioteca padrão da Illumina para controle da corrida.

2.3.3. Processamento dos dados

Os dados foram processados utilizando AMPtk (PALMER et al., 2018), com instruções e uso adaptado para processamento de dados de microbioma, que processa os dados utilizando USEARCH e VSEARCH (ROGNES et al., 2016). Primeiramente foi realizado a retirada das sequências de primers e adaptadores e para a junção das leituras

Paired-End. O agrupamento (clustering) em OTU (Unidade Taxonômica Operacional) foi feito mediante UNOISE3, integrado ao programa AMPtk. Os agrupamentos foram filtrados e realizada a classificação taxonômica das OTUs utilizando a base de dados UNITE, espécies hipotéticas agrupadas acima de 97% de similaridade (NILSSON et al., 2015). Os dados gerados pelo AMPtk foram intorduzidos no software QIIME v2.0 (BOLYEN et al., 2018) que permitiu a visualização prévia.

A sequência dos OTUs pertencentes a grupos patogênicos utilizados para o estudo foi conferida através dos dados do banco de genes (GenBank), utilizando NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), para garantir que sua classificação foi definida corretamente. Além disso, foi gerado uma árvore filogenética dos grupos que englobam os agentes dimórficos, como gênero *Sporothrix* (**Apêndice, Figura 10**) e ordem Onygenales.

2.3.4. Análise Estatística

Para a análise de da diversidade, realizamos mensuramos a diversidade alfa (ou diversidade local) e a diversidade beta, que mensura a variação na composição das espécies. A diversidade alfa das amostras foi estimada utilizando riqueza de OTUs (S) e o índice de Shannon (H') que leva em consideração dois componentes: riqueza e abundância relativa das espécies, expresso pela formula: $H' = -\sum p_i \cdot \ln p_i$, onde p_i é o resultado do número de indivíduos da espécie “i” na amostra dividido pelo número total de indivíduos.

Diferenças na estrutura da comunidade foi acessada a partir da construção de uma matriz de similaridade, que compara os locais, utilizando o coeficiente de dissimilaridade de Bray-Curtis. Essa dissimilaridade foi representada graficamente em escala multidimensional não-métrica (nMDS), que coloca pontos de amostras em um espaço bidimensional. Para descrever os ambientes, baseados em abundância dos táxons nas amostras (diversidade beta), foi utilizado análise de agrupamento. Para comparar a comunidade fúngica dos diferentes ambientes foi utilizado análise de variância multivariada baseada em permutação (PERMANOVA; $p < 0.05$)(ANDERSON, 2001) com teste *a posteriori* de comparação par a par entre os ambientes amostrados. Finalmente, foi utilizado a análise de redundância baseado em distância (dbRDA) para verificar a relação dos fatores ambientais entre a comunidade fúngica (GOTELLI; ELLISON, 2004) As

diferenças estatísticas dos eixos representados em dbRDA foi validado pelo teste de Monte Carlo, utilizando 9.999 simulações para cada análise. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico R (R Core Team, 2019), usando os pacotes “stats” para análises univariadas (R Core Team, 2019), “vegan” para a análise multivariada e para mensurar a diversidade (OKSANEN et al., 2015) e “iNEXT” para a rarefação (CHAO et al., 2014).

Para a análise dos fungos patogênicos, foram realizados Teste de homocedasticidade (teste de Levene) e normalidade (teste Shapiro-Wilk), anteriormente aos testes estatísticos ($\alpha = 0.05$) (Zar, 1999). Para comparar os táxons selecionados entre os ambientes foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (dados não paramétricos) com comparação *posteriori* par a par de Dunn.

2.4. Resultados e Discussões

2.4.1. Análise de dados

Após a filtragem dos dados, foram obtidos 11 060 447 reads, somando 8154 OTUs com a mediana de 1156 OTU por amostra. A maioria dos ambientes atingiu uma suficiência amostral, atingindo ou chegando próximo à riqueza extrapolada estimada em 2,5 milhões de reads, como mostra a curva de rarefação (**Figura 3, Tabela 1**).

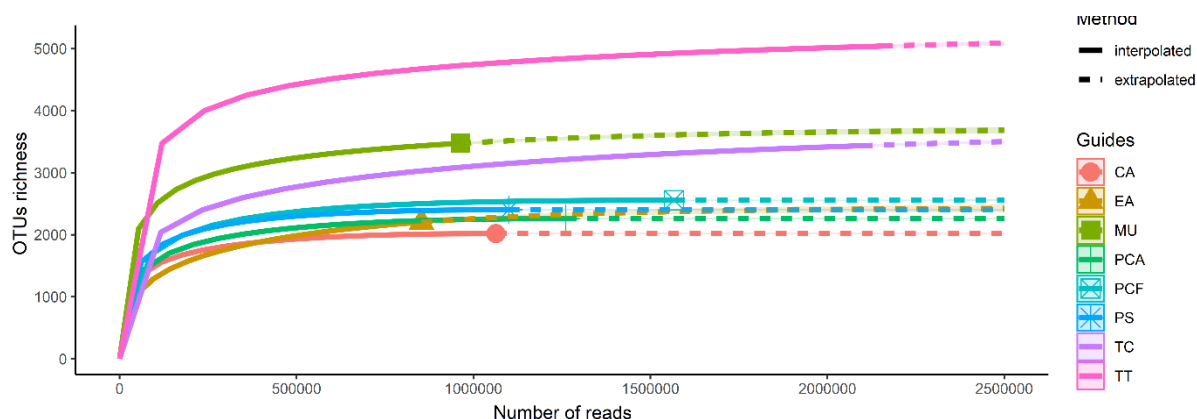


Figura 3. Curva de rarefação obtidas em diferentes ambientes. CA-cerrado aberto; TT-toca de tatu; PCA-plantação de cana de açúcar; PCF-plantação de café; PS-pastagem; TC-toca de coruja; MU-floresta sazonal semidecídua.

Tabela 1. Riqueza observada e riqueza estimada para 2,5 milhões de reads. CA-cerrado aberto; TT-toca de tatu; PCA-plantação de cana de açúcar; PCF-plantação de café; PS-pastagem; TC-toca de coruja; MU- floresta sazonal semidecídua.

Site	Observed richness	Estimator richness	s.e.	LCL	UCL
CA	2020	2020	5,66	2046	2068
EA	2204	2435	31,61	2381	2506
MU	3475	3713	34,8	3654	3792
PCA	2262	2262	6,21	2294	2319
PCF	2557	2557	5,3	2578	2599
PS	2404	2404	5,87	2432	2455
TC	3436	3700	34,61	3641	3777
TT	5042	5275	33,02	5218	5349

2.4.2. Diversidade alfa

As amostras de solo apresentaram uma grande diversidade de fungos. A maioria das sequências encontradas (99,73%) pertenciam ao reino fungi. O filo com maior frequência foi Ascomycota (77,15%), seguido de Basidiomycota (14,62%). Ainda obtivemos em menor porcentagem alguns representantes do antigo Zygomycota, como

Mortierellomycota (4,35%) e Mucoromycota (1,26%) e representante de Chytridiomycota (1,30%) e outros (1,32%) (**Figura 4-A**).

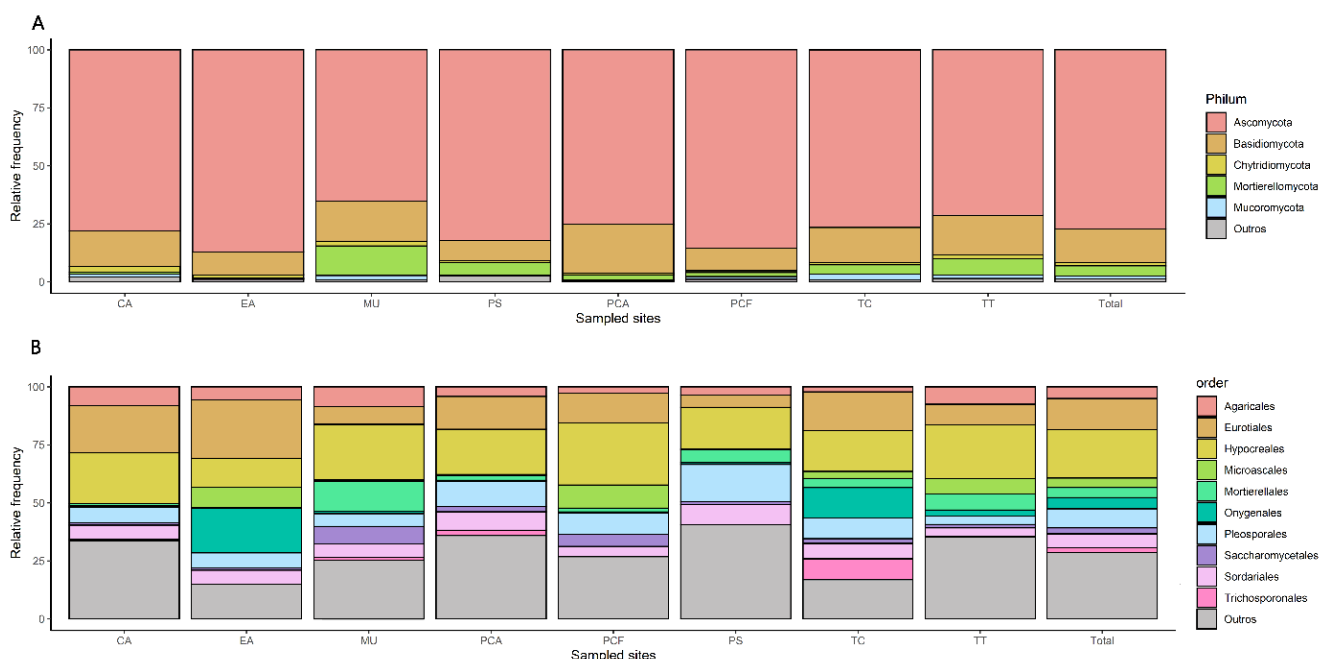


Figura 4. A-Frequência relativa dos filos em cada ambiente. B- Frequência relativa das dez ordens mais frequentes nos diferentes ambientes. CA-cerrado aberto; TT-toca de tatu; PCA-plantação de cana de açúcar; PCF-plantação de café; PS-pastagem; TC-toca de coruja; MU- floresta sazonal semidecídua

A estrutura da comunidade é semelhante aos descritos em trabalhos relacionados, com a maioria dos fungos sendo classificados como Ascomycota e Basidiomycota (BUÉE M. et al., 2009; O'BRIEN et al., 2005; VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015). A proporção destes filos, diferiram bastante dos trabalhos de O'Brien (2005) ou de Buée (2009), em que a proporção do Basidiomycota era muito maior que nas nossas amostras, mais semelhante ao descrito no Vargas-Gastélum (2015), com predominância de Ascomycotas (com abundância relativa variando de 65,24 - 87,03%). As proporções de Basidiomycotas/Ascomycotas das amostras de floresta (MU e TT) é um pouco maior, sendo um pouco mais semelhante ao descrito nas amostras florestais (BUÉE M. et al., 2009; O'BRIEN et al., 2005; TEDERSOO et al., 2014). Os nossos achados, apontando o predomínio de Ascomycota, deve estar refletindo um padrão de distribuição global de biodiversidade fúngica proposta em Tedersoo et al., 2014, que observou um maior pico na riqueza de Ascomycota saprófagos nos ecossistemas tropicais. Ainda, os fungos ectomicorrízicos, relacionados frequentemente a Basidiomycota, tem o seu pico de

riqueza nas florestas temperadas e biomas mediterrâneas, nas latitudes médias do hemisfério norte (40° to 60°N)(TEDERSSO et al., 2014).

A estrutura da comunidade fúngica não é uniforme, com dominância de algumas ordens que apresentam maior abundância relativa nos ambientes, apesar das variações dos grupos dominantes. Algumas ordens, como Hypocreales (20,83%), Eurotiales (13,41%) e Pleosporales (8,2%) foram os mais dominantes, seguido de Sordariales, Agaricales, Onygenales, Mortierellales, Microascales e Saccharomycetales (**Figura 4-B**). Apesar de haver uma variação da frequência relativa das ordens dependendo do ambiente, estas dez ordens mais frequentes constituíram quase 70% do total, dentro do reino fungi. O trabalho de Baldrian (2012) ressalta que a estrutura da comunidade fúngica diverge com a comunidade bacteriana, que apresentam uma uniformidade em sua comunidade, ainda que haja grupos mais dominantes. Os fungos saprotróficos mais generalistas foram dominantes, assim como esperado (GEML, 2019; NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

As ordens mais abundantes encontradas como Hypocreales, Sordariales, Microascales, Eurotiales, Onygenales, Chaetothyriales e Pleosporales pertencem a classe Sordariomycete, Eurotiomycetes e Dothideomycetes (Ascomycota), que segundo Tedersoo et al. (2014) é mais prevalente em ecossistemas tropicais. Destacamos ainda, que os fungos pertencentes a Mortierellomycota apresentaram uma abundancia relativa muito maior em amostras de MU (12, 73%) e TT (6.9%). Este fungo tem um pico de riqueza em condições ambientais mais amenas, caracterizadas por uma maior disponibilidade de nutrientes orgânicos, menor exposição e maior teor de humidade (GEML, 2019) e temperaturas mais frias (TEDERSSO et al., 2014). Isto poderia estar relacionado à florestação da MU e o ambiente protegido das TT que geralmente se inserem dentro da MU. Essa florestação poderia diminuir as temperaturas nessas áreas quando comparado a outras localizações como CA ou TC que abundam em áreas menos florestadas. A vegetação mostrou um efeito protetor em determinadas regiões, trazendo uma diminuição das temperaturas, aumento de detritos orgânicos e aumento da humidade(FETCHER; OBERBAUER; STRAIN, 1985; QUIDEAU et al., 2001).

Locais relacionados à mata, como a TT e MU apresentaram maior riqueza, enquanto que a amostra de CA, TC e EA, apresentaram as menores riquezas (**Figura 5**). Ainda os

ambientes mais ricos, apresentaram uma maior diversidade (índice de Shannon), enquanto que as amostras de EA e de TC, apresentaram os menores índices, apresentando diferença significativa com a amostra de TT ($p < 0,05$)(Figura 6).

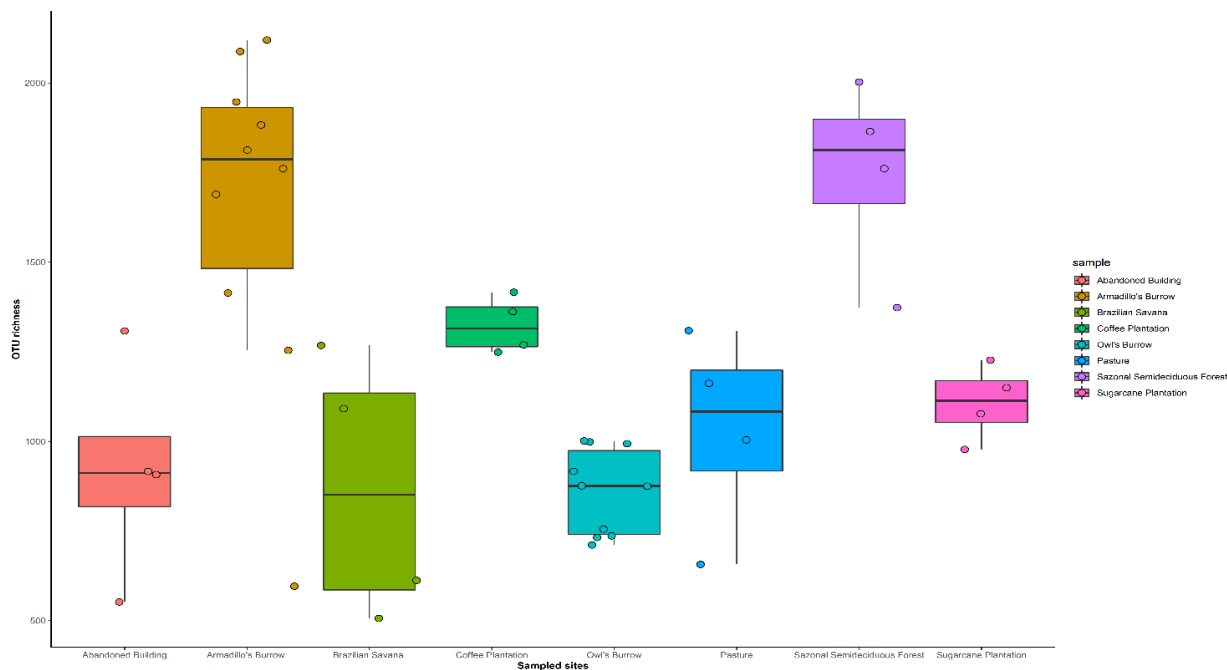


Figura 5. Boxplot amostrando mediana da riqueza encontrada em cada ambiente. Os pontos representam cada amostra coletada.

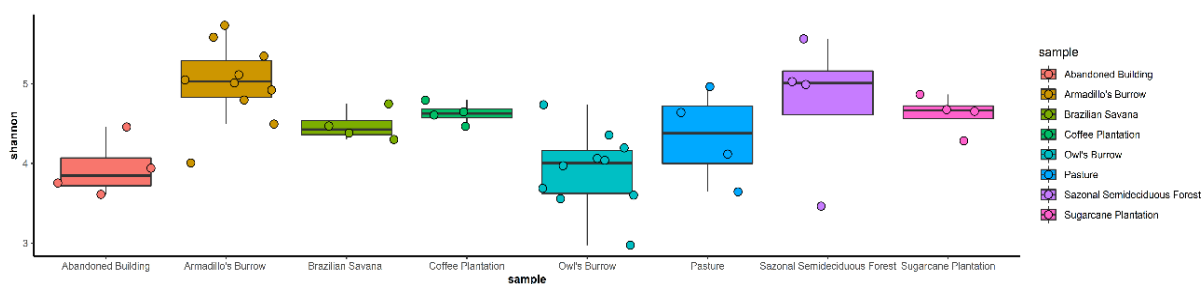


Figura 6. Boxplot representando a mediana da diversidade de Shannon em cada ambiente.

A alta umidade comum entre as florestas semidecíduais pode estar fortemente associada a alta diversidade local, juntamente com a proteção que a vegetação local oferece contra raios solares (UV) e contra variações bruscas de temperaturas. Outros fatores que

podem contribuir são: a alta porcentagem de matéria orgânica e serrapilheira, que favorece o estabelecimento de fungos decompositores; e alta densidade de raízes, característico de florestas maduras, que contribuem para estabelecimento de fungos simbiotes como os ectomicorrízicos (ECM) (GEMPL, 2019; TEDERSOO et al., 2014).

A riqueza nas amostras de CA e EA foram menores. Estes ambientes tem baixo pH (pH 4,25-4,3) quando comparado com outros ambientes (pH 5,25 -6,35), o que pode influenciar, de forma direta ou indireta, na prevalência de alguns fungos (GEMPL, 2019). Maioria dos fungos toleram variações de pH (WHEELER, 1991), porém esta pode alterar a disponibilidade de nutriente, o crescimento da vegetação ou a microbiota local (como prevalência de bactérias)(BALDRIAN et al., 2012) , causando alterações na estrutura fúngica. Além disso, os prédios ou construções abandonadas apresenta baixa umidade devido a cobertura artificial, que pode desfavorecer a prevalência da diversidade fúngica e o crescimento vegetal (ausente no local). O cerrado tem baixa taxa de material orgânico, juntamente com algumas amostras de tocas de coruja, o que também pode selecionar os fungos saprófagos mais generalistas e pouco exigentes. Assim, enquanto que em ambientes mais hostis, os fungos resistentes e generalistas tendem a ser favorecido, em condições ambientais amenas oferecidos pela presença da cobertura vegetal densa permitem a instalação de outros fungos mais exigentes ou especialistas, o que contribui para a alta diversidade/ riqueza deste ambiente (GEMPL, 2019). Ressaltamos que em termo de diversidade, TC, juntamente com o EA, apresentaram menor índice de Shannon que o CA, mostrando que esta diversidade, deve estar associada à umidade e à presença de vegetação/matéria orgânica.

2.4.3. Diversidade beta

A análise de agrupamento (cluster) pela dissimilaridade de Bray-Curtis agrupou a maioria das amostras por ambiente, mostrando a semelhança da estrutura da comunidade fúngica de acordo com o tipo de ambiente (**Figura 7**). A similaridade (ou a diferença) do micobioma foi graficamente representado no nMDS A sobreposição da elipse no espaço de ordenação mostra a similaridade dos ambientes (**Figura 8**).

Nos ambientes de MU e TT houve agrupamento de determinadas amostras. O agrupamento das amostras de MU com as amostras de TT pode ser explicado pela localização geográfica destes locais, sendo que a toca se insere na floresta, tal como semelhança das características e condições ambientais que deriva de sua localização. Além da semelhança entre amostras do mesmo ambiente, o agrupamento mostrou similaridade de ambientes com condições semelhantes, como PCA e PCF, ambos de plantações de monoculturas e utilização de fertilizantes e agrotóxicos.

Diferentemente do observado no trabalho de Vargas-Gastélum 2015, não foi possível diferenciar os grupos por período de coleta (variação sazonal), mostrando que similaridade da comunidade fúngica pode estar mais fortemente associado ao ambiente de coleta quando muito diferenciadas. É importante ressaltar que apesar de temporalmente não apresentarem uma diferenciação, a coleta se deu em apenas dois períodos (maio e novembro) em período de transição de estações e com clima relativamente ameno. Além disso, foi obtida pouca amostragem por estação (2 a 5 amostras dependendo do ambiente), o que limita possíveis inferências estatísticas.

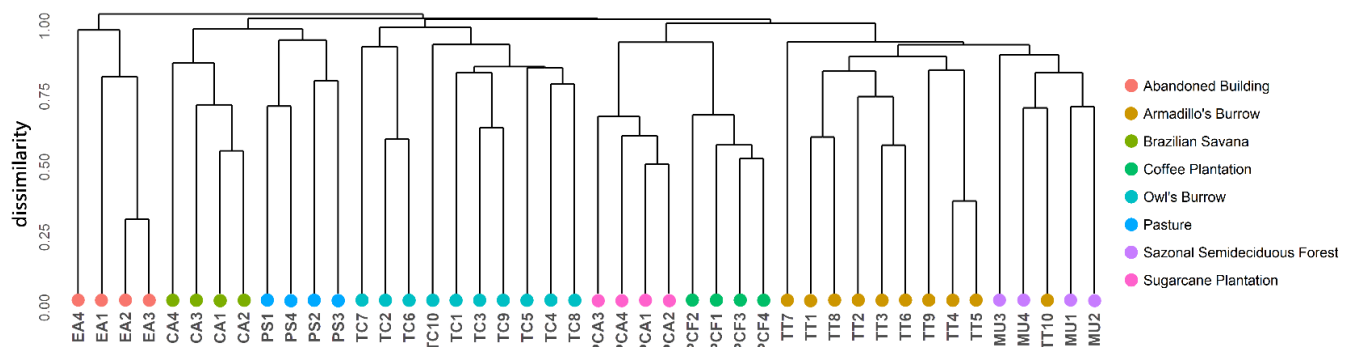


Figura 7. Análise de agrupamento pela dissimilaridade de Bray-Curtis, baseados em abundância dos táxons.

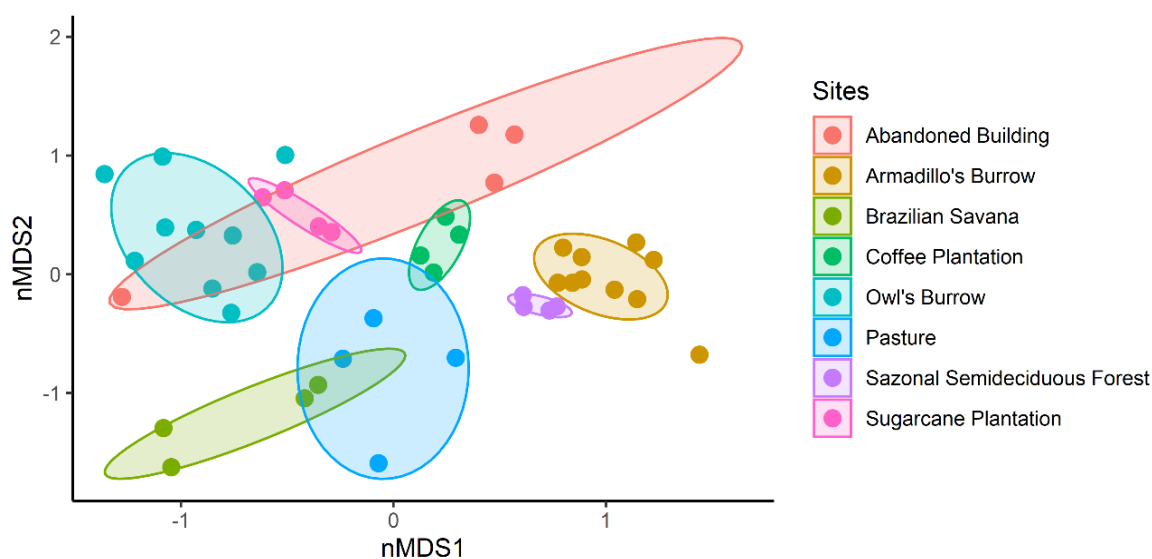


Figura 8. Análise multivariada nMDS da comunidade fúngica de diferentes ambientes baseada em dissimilaridade de Bray-Curtis.

O teste de PERMANOVA mostrou uma diferença significativa em algumas comunidades fúngicas por ambiente, como entre amostras de TC e PCF, TT e PS e entre as TC e TT (**Apêndice, Tabela 3**, $p\text{-ajustado} < 0.05$). Ainda, foi obtido valores de $p\text{-ajustado}$ muito próximo do significativo estatisticamente em várias outras amostras, quando combinadas com as amostras de tocas. Esta comunidade fúngica pode ser resultante do micro-habitat diferenciado criado neste tipo de ambiente (tocas de animais), muitas vezes difícil de ser mensurada (VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015), como menor exposição ao sol e variação de temperatura e material orgânico diferenciado (como queratina), que pode favorecer o estabelecimento de alguns fungos especialistas.

2.4.4. A distribuição de agentes patogênicos

Fungos da ordem Onygenales foram encontrados com maior frequência nas amostras de EA e nas amostras de TC. Observou-se uma diferença significativa na prevalência ($p=0,006$) dependendo do ambiente, sendo favorecido no ambiente de EA, que apresentou maior frequência deste grupo, em relação amostras de PCA (**Figura 9**). Esta ordem é constituída por fungos de importância clínica, que vai desde fundos que causam infecção cutânea, como as dermatofitoses, até agentes responsáveis de micoses sistêmicas, como os fungos termodimórficos. Aparentemente os fungos desta Ordem são favorecidos em ambientes menos competitivos, provavelmente por apresentar maior resistência às condições adversas, como baixa umidade e ausência de vegetação.

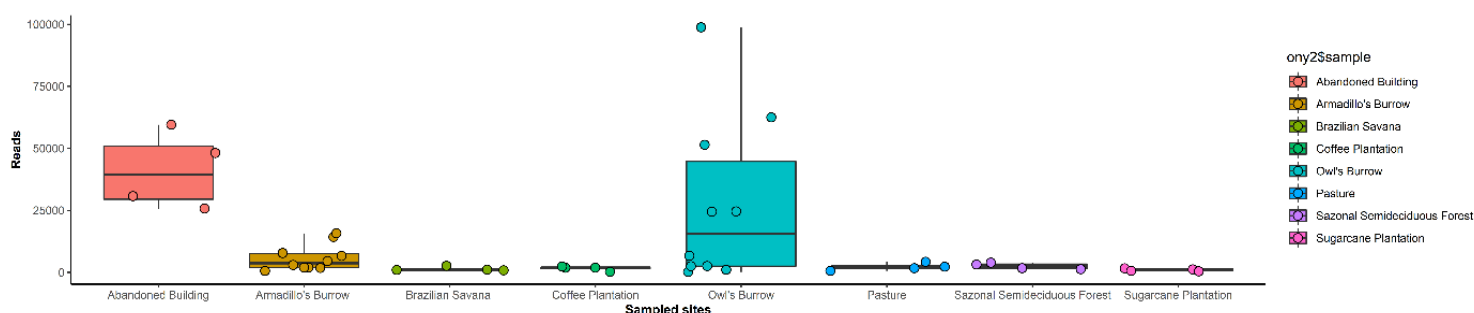


Figura 9. Boxplot representando a mediana de reads dos fungos da ordem Onygenales em diferentes amostras.

Na família Arthrodermataceae, onde são inseridos os fungos dermatofitos, responsáveis por uma das micoses cutâneas mais comuns (dermatofitose), a maioria dos OTUs encontrados foram de fungos geofílicos, que são encontrados mais facilmente no solo e raramente causam infecções em humanos ou animais (DE HOOG et al., 2017; ELLABIB M. S.; KHALIFA Z.; KAVANAGH K., 2003; ZAITZ, 2010). A maior frequência de dermatófitos foi encontrada em TC, enquanto que a menor frequência foi encontrado no EA, dando uma diferença significativa entre estes ambientes ($p= 0,001$). Apesar de EA apresentar uma prevalência dos OTUs da ordem Onygenales, a maior parte dos fungos encontrados eram saprotróficos generalistas, como *Malbranchea* spp., apresentando baixa frequência dos fungos dermatófitos. Esta família possui a característica

queratinofílica que é rara em fungos, e mesmo as espécies geofílicas da família frequentemente são encontradas associadas à queratina (DE HOOG et al., 2017; SUMMERBELL RC, 2000), o que pode explicar a associação destes a TC, onde a presença e hábitos do animal pode favorecer o aumento deste tipo de matéria orgânica (MARTIN, 1973; YORK; ROSENBERG; STURM, 2002). O único OTU classificados como dermatófito não-geofílico foi pertencente a *Trichophyton mentagrophytes* (OTU5745), encontrado em pouca frequência, provavelmente devido a sua ecologia, sendo considerado zoofílico. Ainda, nenhum dermatófito antropofílico foi encontrado, confirmando dados publicados que traz a transmissão entre humano-humano ou mais raramente humano-animal como via para a disseminação destes organismos (MORIELLO; DEBOER, 1991), não ocorrendo transmissão do ambiente para humanos. Alguns destes agentes que são extremamente adaptados à infecção e causam lesões crônicas e sem inflamações, não tem uma fase saprofítica sexuada conhecida até a data, como é o caso de *T. rubrum* e *E. floccosum* (DE HOOG et al., 2017).

Ainda dentro da ordem Onygenales, ressaltamos a importância dos fungos dimórficos, considerados patogênicos verdadeiros, responsáveis pelas micoses sistêmicas. Na cidade de Botucatu, região considerada área hiperendêmica de paracoccidioidomicose (PCM), se obtiveram amostras positivas para a presença de *Paracoccidioides* spp. em vários ambientes nos dois métodos empregados (Nested-PCR e NGS). Apesar do consenso entre a detecção do agente e os casos de doenças reportados na região, os métodos empregados mostraram resultados discordantes quanto a locais positivos (**Apêndice, Tabela 4**). Esta diferença pode se dar pelas limitações das técnicas, que trata-se de modelos estocásticos, especialmente o NGS, que depende fortemente da profundidade de leitura e quantidade de DNA ambiental. No trabalho de Vargas-Gastélum et al., 2015 observou dificuldades para a detecção de *Coccidioides* spp. por técnicas de NGS (454 pirosequenciamento), pela baixa profundidade de leitura nas amostras. Além disso, estes fungos provavelmente estão presentes no ambiente em baixa densidade, com baixa produção de esporos e lento crescimento resultando em pouco DNA relativo no ambiente e baixa leitura desde fungos pela técnica. Assim, observamos que o OTU (OTU3839), correspondentes a *Paracoccidioides brasiliensis*, obteve uma frequência relativa muito baixa. A ocorrência do *Paracoccidioides* spp. não apresentou diferença significativa entre os ambientes. Isso evidencia que a prevalência deste agente endêmico pode não estar,

necessariamente, em ambientes restritos e associada a tatus, seu hospedeiro silvestre já conhecido. Este fungo poderia ser mais resistente a diferentes características ambientais do que se pensa. É importante ressaltar que diferentemente dos resultados de cultivo, a viabilidade do fungo não é mensurada, o que significa que a presença detectada não corresponde necessariamente aos locais com risco de infecção.

Outros agentes de micoses sistêmicas endêmicas da ordem Onygenales, como *Histoplasma* e *Coccidioides*, não foram detectados. *Histoplasma* spp. está fortemente associado à excretas de aves e de morcegos e principalmente a ambiente de cavernas (HOFF; BIGLER, 1981; TAYLOR et al., 2005), o que pode explicar a ausência deste agente nas amostras. (COLOMBO et al., 2011). Já a coccidioidomicose é prevalente na América do Norte e, no Brasil, apenas na região árida de nordeste não tendo ocorrência de casos na região de sudeste (COLOMBO et al., 2011), onde as amostras foram coletadas. Assim como traz a literatura, a sua presença pode ser favorecida em regiões áridas, onde há pouca competição devido à hostilidade do ambiente (BROWN et al., 2013; NGUYEN et al., 2013; VARGAS-GASTÉLUM et al., 2015). Em uma primeira análise, o OTU2724 e OTU7366 corresponderam a *Histoplasma capsulatum* e OTU3967 a *Coccidioides posadasii*. Porém, em uma análise da árvore filogenética dos Onygenales, tal como na conferência de dados com GenBank, através do NCBI, mostrou que estas classificações não eram verdadeiras. Assim, ressaltamos a necessidade de revisão da classificação de principais OTUs, para garantir correta interpretação de dados.

A prevalência de *Sporothrix* spp. não variou de acordo com o ambiente. Este fungo, responsáveis pela crescente epidemia de esporotricose, tem sua virulência possivelmente associada a sua melanina e sua alta capacidade de sobreviver em diversas condições (como variações de temperatura, pH, etc.), podendo ser este, um fator que permite sua prevalência em quase todos os ambientes amostrados (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; GHOSH et al., 2002). O OTU1623 classificada como *Sporothrix* spp., foi analisada manualmente através da utilização do NCBI e não conseguiu diferenciar *Sporothrix schenckii* de *S. brasiliensis* (números de acesso: MH865638.1 e MF765977.1, respectivamente), os quais obtiveram 100% de identidade. A diferenciação destas espécies é muito precária utilizando ITS2, pois há uma grande proximidade filogenética entre estas duas espécies (ZHOU et al., 2013). Em menor frequência, obtivemos também o OTU

relacionada a *S. globosa* (OTU2003), outro agente pertencente ao clado patogênico (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016). Esta baixa proporção de *S. globosa* reflete a epidemiologia da doença, sendo esta espécie o agente menos comum nas Américas. Enquanto que 50-61% dos casos causados por *S. schenckii* e 100% dos casos causados por *S. brasiliensis* ocorre nas Américas, apenas 11% dos casos de esporotricose causada por *S. globosa* ocorre no continente, sendo mais comum no continente asiático (CHAKRABARTI et al., 2015; ZHOU et al., 2013).

Muitos agentes de micoses oportunistas estavam presentes abundantemente na maioria das amostras. Esses agentes atuam como saprotróficos no ambiente, e estão mais amplamente distribuídos. Entre estes fungos encontramos espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estas espécies apresentaram uma diferença significativa em sua frequência relativa ($p < 0,05$), principalmente nas amostras de EA, o que pode derivar das condições diferenciadas deste ambiente quando comparada a outros ambientes, como: baixa taxa de matéria orgânica, grande intervenção antrópica, ausência de cobertura vegetal, baixa umidade pela construção da cobertura artificial, que levam a baixa diversidade deste local e comunidade fúngica diferenciada. A prevalência destes agentes variou. *Aspergillus* spp. teve a maior frequência em EA, enquanto que *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. tiveram menor frequência neste ambiente. Ainda destacamos que outros fungos, como *Candida* spp. e *Malassezia* spp., não apresentaram diferenças nas suas prevalências, sendo amplamente distribuídos em todos os ambientes.

Ainda, *Cryptococcus. neoformans* (OTU2797) apresentou uma distribuição diferenciada entre os ambientes ($p = 0,002$). A sua prevalência é favorecida no EA quando comparada a vários ambientes, estando presente quase que exclusivamente neste ambiente. Esta espécie, em conjunto com *C. gattii*, é responsável por causar uma micose sistêmica com uma alta morbidade e mortalidade conhecida como criptococose. *C. neoformans* é um fungo oportunista que atingem os indivíduos com baixa imunidade, enquanto que *C. gattii* é capaz de causar infecções mesmo em indivíduos imunocompetentes. *C. neoformans* pode ter sido favorecido no ambiente de EA, pois estes fungos vivem em associação com fezes de aves e este ambiente é propício para atrair aves urbanas, especialmente pombos. O OTU correspondente a *C. gattii* não foi encontrado em nenhuma das amostras, sendo condizente

com a literatura, que coloca seu provável habitat mais restrito, sendo associado a eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensi*)(ELLIS; PFEIFFER, 1990; LEVITZ, 1991).

Bastante OTUs da família Herpotrichiellaceae, relacionada a fungos dematiáceos conhecidos como black yeast foram encontrados. Estes fungos são responsáveis por micoses cutâneas e cromoblastomicose. Entre as OTUs que chegaram à classificação a nível de gênero na família, *Exophiala* spp. foi o mais comum. Ainda foi encontrado outros representantes patogênicos como *Cladophialophora* spp. e *Phialophora* spp. (HOOG; GUARRO, 1995). Maioria destes fungos, como *Exophiala*, é encontrada comumente no ambiente atuando como saprófagos e podem ocasionalmente causar micose superficial/cutânea ou excepcionalmente infecções sistêmica em indivíduos imunocomprometidos (HOOG et al., 2003; VICENTE et al., 2008; ZENG et al., 2007). Não foi encontrado nenhuma OTU correspondente a *Fonsecaea pedrosoi*. Este fungo, é considerado o principal agente responsável por cromoblastomicose incluso em indivíduos imunocompetentes, sendo isolado em 95% dos casos clínicos no Paraná (FILHO; DE, 1997). Apesar disso, tentativa de isolamento de leveduras negras na região mostrou resultados negativos para *F. pedrosoi*, que parece ter distribuição mais restrita e apresentar uma maior virulência (VICENTE et al., 2008).

2.5. Conclusão

. Esse trabalho evidenciou a influência do ambiente nas comunidades fúngicas mesmo em locais geograficamente próximas. Os diversos ambientes sustentaram comunidades diversificada, reforçando a necessidade de estudo de micro-habitats e o impacto de sua alteração na estruturação da comunidade fúngica. Uma diminuição brusca da diversidade fúngica foi observada especialmente quando comparada as amostras florestais com as amostras sem vegetação, como no edifício abandonado com alta interferência humana. Assim, a diversidade da comunidade fúngica refletiu as condições e variações do ambientais, mostrando-se um importante indicador de mudanças ambientais. Ainda, reforçamos a necessidade do estudo da comunidade fúngica em escala temporal (ao curto e ao longo prazo), que não foi evidenciado em nosso trabalho, e estudos que associe a estruturação da microbioma com estudo de sua atividade. Os fungos patogênicos são mais

seletivos e menos frequentes quando comparado aos fungos oportunistas. Para muitos fungos patogênicos, como o *Paracoccidioides* spp., endêmicos da região, não foi possível estabelecer uma relação do ambiente e a frequência/ocorrência do fungo. Isto pode decorrer da baixa frequência destes agentes no ambiente e limitação da técnica que consiste em modelo estocástico, mas pode estar evidenciando a resistência destes agentes a diferentes condições ambientais. Ainda, alguns fungos oportunistas específicos têm uma distribuição restrita e específica, como o caso de *C. neoformans*. O EA parece ser um ambiente bastante diferenciado, favorecendo a prevalência de alguns fungos e diminuindo a frequência de outros grupos. Isto pode refletir, em maior ou menor grau, a mudança da comunidade fúngica em locais urbanos. Por último, ressaltamos a limitação da técnica em mostrar precisamente os agentes com baixa prevalência, principalmente em amostras com profundidade de leitura menor (menor número de reads) e a necessidade de apuração das classificações das OTUs para uma análise mais consistente.

2.6. Referências

- ALVES, S. H. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 523–525, out. 2010.
- ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, n. 1, p. 32–46, 2001.
- ARANTES, T. D. et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, v. 51, n. 1, p. 83–92, 1 jan. 2013.
- ASCIIOGLU, S. et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 2002.
- BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 505–512, abr. 1998.
- BAGAGLI, E. et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, v. 41, n. 3, p. 217–223, 1 jan. 2003.
- BALDRIAN, P. et al. Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. **The ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 248–258, fev. 2012.
- BARR, D. J. S. Chytridiomycota. In: MCLAUGHLIN, D. J.; MCLAUGHLIN, E. G.; LEMKE, P. A. (Eds.). **Systematics and Evolution: Part A. The Mycota**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2001. p. 93–112.
- BARROS, M. B. DE L.; PAES, R. DE A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, 1 out. 2011.
- BOLYEN, E. et al. **QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science**. [s.l.] PeerJ Inc., 3 dez. 2018. Disponível em: <<https://peerj.com/preprints/27295>>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 19 dez. 2012.
- BROWN, J. et al. Coccidioidomycosis: epidemiology. **Clinical Epidemiology**, v. 5, p. 185–197, 2013.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, abr. 1993.

BUÉE M. et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v. 184, n. 2, p. 449–456, 25 set. 2009.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiology & Infection**, v. 111, n. 1, p. 121–133, ago. 1993.

CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, jan. 2015.

CHAO, A. et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs**, v. 84, n. 1, p. 45–67, 2014.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 1 nov. 2011.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, p. 165–191, 1 mar. 2016.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1, p. 5–31, 2017.

DIGHTON, J.; WHITE, J. F.; WHITE, J. F. **Fungal Communities of Desert Ecosystems: Links to Climate Change**. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/>>. Acesso em: 24 set. 2019.

ELLABIB M. S.; KHALIFA Z.; KAVANAGH K. Dermatophytes and other fungi associated with skin mycoses in Tripoli, Libya. **Mycoses**, v. 45, n. 3-4, p. 101–104, 16 dez. 2003.

ELLIS, DAVIDH.; PFEIFFER, TANIAJ. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **The Lancet**, Originally published as Volume 336, Issue 8720. v. 336, n. 8720, p. 923–925, 13 out. 1990.

FETCHER, N.; OBERBAUER, S. F.; STRAIN, B. R. Vegetation effects on microclimate in lowland tropical forest in Costa Rica. **International Journal of Biometeorology**, v. 29, n. 2, p. 145–155, 1 jun. 1985.

FILHO, Q.-T.; DE, F. A cromoblastomicose no Estado do Paraná: etiologia, epidemiologia, clínica e terapêutica com itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 4, p. 345–346, ago. 1997.

FRANCO, M. et al. **Paracoccidioidomycosis**. 1 edition ed. Boca Raton: CRC Press, 1993.

GEMPL, J. Soil fungal communities reflect aspect-driven environmental structuring and vegetation types in a Pannonian forest landscape. **Fungal Ecology**, v. 39, p. 63–79, 1 jun. 2019.

GHOSH, A. et al. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v. 45, n. 11–12, p. 449–454, 2002.

GOTELLI, N. J.; ELLISON, A. M. **Princípios de Estatística em Ecologia**. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=BFJCDQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=Gotelli,+N.+J.,+%26+A.+M.+Ellison,+2016.+Princ%C3%ADpios+de+estat%C3%ADstica+em+ecologia.+Artmed+Editora,+Porto+Alegre&ots=DOvo8pT_X_&sig=dekbNLZYjKna4SGA5Ru_K3hwz1A#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 30 set. 2019.

GRÄSER, Y. et al. Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. **Medical Mycology**, v. 37, n. 2, p. 105–114, 1 jan. 1999.

GUPTA, R. K.; GUPTA, P. Opportunistic Fungal Infections. In: **Pathology of Opportunistic Infections**. [s.l.] Springer, Singapore, 2017. p. 53–130.

GWEON, H. S. et al. PIPITS: an automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 8, p. 973–980, ago. 2015.

HAVLICKOVA, B.; CZAICA, V. A.; FRIEDRICH, M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. **Mycoses**, v. 51 Suppl 4, p. 2–15, set. 2008.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, v. 95, n. 6, p. 641–655, 1 jun. 1991.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, dez. 2001.

HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, n. 5, p. 509–547, 1 maio 2007.

HILLEBRAND, H. On the Generality of the Latitudinal Diversity Gradient. **The American Naturalist**, v. 163, n. 2, p. 192–211, fev. 2004.

HOFF, G. L.; BIGLER, W. J. THE ROLE OF BATS IN THE PROPAGATION AND SPREAD OF HISTOPLASMOSIS: A REVIEW. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 2, p. 191–196, abr. 1981.

HOOG, G. S. DE et al. Species Diversity and Polymorphism in the *Exophiala spinifera* Clade Containing Opportunistic Black Yeast-Like Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4767–4778, 1 out. 2003.

HOOG, G. S. DE; GUARRO, J. Atlas of clinical fungi. **Atlas of clinical fungi**., 1995.

HRYCYK, M. F. et al. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Medical Mycology**, 2018.

- HU, Y. et al. Contrasting latitudinal diversity and co-occurrence patterns of soil fungi and plants in forest ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 131, p. 100–110, abr. 2019.
- JAMES, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818–822, out. 2006.
- LEE, P. P.; LAU, Y.-L. Cellular and Molecular Defects Underlying Invasive Fungal Infections—Revelations from Endemic Mycoses. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 2017.
- LEE TAYLOR, D. et al. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, 2016.
- LEVITZ, S. M. The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 1163–1169, 1 nov. 1991.
- LIU, B. et al. Accurate and fast estimation of taxonomic profiles from metagenomic shotgun sequences. **Genome Biology**, v. 12, n. 1, p. P11, 19 set. 2011.
- LIU, L. et al. **Comparison of Next-Generation Sequencing Systems**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/251364/>>. Acesso em: 30 set. 2019.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. 126–143, 1 abr. 2018.
- LUO, C. et al. Direct Comparisons of Illumina vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30087, 10 fev. 2012.
- MARQUES, S. A.; FRANCO, M. F.; MENDES, R. P. ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS DA PARACOCIDIOIDOMICOSE NA AREA ENDEMICA DE BOTUCATU (SAO PAULO - BRASIL). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, p. 87–92, 1 jan. 1983.
- MARTIN, D. J. Selected Aspects of Burrowing Owl Ecology and Behavior. **The Condor**, v. 75, n. 4, p. 446–456, 1973.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, jan. 2006.
- MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, p. 224–282, 31 out. 2017.
- MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J. Fungal flora of the coat of pet cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 602–606, abr. 1991.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Medical Microbiology E-Book**. [s.l.] Elsevier Health Sciences, 2015.

NAIFF, R. D. et al. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19–27, fev. 1986.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: major ecological adaptations and evolutionary transitions. **Biological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1443–1476, 2019.

NGUYEN, C. et al. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological, and clinical dimensions of coccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 505–525, jul. 2013.

NILSSON, R. H. et al. A Comprehensive, Automatically Updated Fungal ITS Sequence Dataset for Reference-Based Chimera Control in Environmental Sequencing Efforts. **Microbes and Environments**, v. 30, n. 2, p. 145–150, 2015.

O'BRIEN, H. E. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5544–5550, set. 2005.

OLLÉ, M. S. **Caracterización morfológica y molecular de hongos queratinofílicos: el orden onygenales**. <http://purl.org/dc/dcmitype/Text>—[s.l.] Universitat Rovira i Virgili, 2006.

PALMER, J. M. et al. Non-biological synthetic spike-in controls and the AMPtk software pipeline improve mycobiome data. **PeerJ**, v. 6, p. e4925, 28 maio 2018.

PEAY, K. G.; KENNEDY, P. G.; TALBOT, J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434–447, jul. 2016a.

PEAY, K. G.; KENNEDY, P. G.; TALBOT, J. M. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 434–447, jul. 2016b.

PESSOA FILHO. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do Cerrado. 1 abr. 2011.

QUIDEAU, S. A. et al. A direct link between forest vegetation type and soil organic matter composition. **Geoderma**, v. 104, n. 1, p. 41–60, 1 nov. 2001.

RESTREPO, A. et al. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Medical Mycology**, v. 38 Suppl 1, p. 67–77, 2000.

RESTREPO M, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* : a puzzle still unsolved. **Medical Mycology**, v. 23, n. 5, p. 323–334, jan. 1985.

RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, 1 ago. 2004.

RIPPON, J. W. **Medical Mycology: Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. 2nd edition ed. Philadelphia: W B Saunders Co Ltd, 1982.

RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 199–206, abr. 2014.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 7, 14 jul. 2016.

ROGNES, T. et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ**, v. 4, p. e2584, 2016.

SAN-BLAS, G. Biochemical and physiological aspects in the dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of Medical Research**, v. 24, n. 3, p. 267–268, 1993.

SANCHOTENE, K. O. et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.

SCHWARTZ, I. S. et al. *Emergomyces*: The global rise of new dimorphic fungal pathogens. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 9, 19 set. 2019.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose - 2017*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. esp, nov. 2018.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. Brasília: Editora Universidade De Brasília, 1984.

SIGRIST, T. **Avifauna Brasileira: Guia De Campo Avis Brasilis: The Avis Brasilis Field Guide to the Birds of Brazil**. Vinhedo, SP: Avis Brasilis, 2009.

SOLÉ, M. et al. Aquatic hyphomycete communities as potential bioindicators for assessing anthropogenic stress. **Science of The Total Environment**, v. 389, n. 2, p. 557–565, 25 jan. 2008.

SUMMERBELL RC. **Form and function in the evolution of dermatophytes**. Disponível em: <<https://www.dermatophytes.reviberoammicol.com/contents.php?030043>>. Acesso em: 29 set. 2019.

TAYLOR, D. L. et al. Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7217–7226, 15 dez. 2016.

TAYLOR, M. L. et al. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 451–458, 2005.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1256688, 28 nov. 2014.

- TEIXEIRA, M. DE M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 19–28, jan. 2014a.
- TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 2014b.
- TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. e1004397, 30 out. 2014c.
- THEODORO, R. C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725–729, 1 dez. 2005.
- TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal genetics and biology: FG & B**, v. 106, p. 9–25, 2017.
- UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 1 jul. 2004.
- VARGAS-GASTÉLUM, L. et al. Impact of seasonal changes on fungal diversity of a semi-arid ecosystem revealed by 454 pyrosequencing. **FEMS microbiology ecology**, v. 91, n. 5, maio 2015.
- VĚTROVSKÝ, T. et al. A meta-analysis of global fungal distribution reveals climate-driven patterns. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, dez. 2019.
- VICENTE, V. A. et al. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology, Black fungal extremes**. v. 61, p. 137–144, 1 jan. 2008.
- WENKER, C. J. et al. Sporotrichosis in a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians**, v. 29, n. 4, p. 474–478, dez. 1998.
- WHEAT, L. J.; KOHLER, R. B.; TEWARI, R. P. Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis by Detection of *Histoplasma capsulatum* Antigen in Serum and Urine Specimens. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 2, p. 83–88, 9 jan. 1986.
- WHEELER, K. Improving My Average. **The Missouri Review**, v. 14, n. 2, p. 141–157, 1991.
- WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols : a Guide to Methods and Applications**, p. 315–322, 1990.
- WIJAYAWARDENE, N. N. et al. Notes for genera: basal clades of Fungi (including Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota and Zoopagomycota). **Fungal Diversity**, v. 92, n. 1, p. 43–129, 1 set. 2018.

XU, J. Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1713–1731, jun. 2006.

YORK, M.; ROSENBERG, D.; STURM, K. Diet and food-niche breadth of Burrowing Owls (*Athene cunicularia*) in the Imperial Valley, California. **Western North American Naturalist**, v. 62, n. 3, 30 jul. 2002.

ZAITS, C. **Compendio de Micologia Medica**. Medicina e Saude edition ed. [s.l.] Editora Guanabara Koogan, 2010.

ZENG, J. S. et al. Spectrum of Clinically Relevant *Exophiala* Species in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3713–3720, 1 nov. 2007.

ZHOU, X. et al. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, 2013.

3. Apêndice

Tabela 2. Informações de coleta das amostras: tipo de amostras, pontos de coleta e data da coleta.

Sample	Site Type	Location	Collection date
TC1	Owl's Burrow	22°53'29.0"S 48°27'13.1"W	May 4, 2018
TC2	Owl's Burrow	22°52'13.1"S 48°27'37.4"W	May 4, 2018
TC3	Owl's Burrow	22°53'36.3"S 48°29'43.0"W	May 4, 2018
TC4	Owl's Burrow	22°53'36.3"S 48°29'43.0"W	May 4, 2018
TC5	Owl's Burrow	22°53'36.3"S 48°29'43.0"W	May 4, 2018
TC6	Owl's Burrow	22°52'13.1"S 48°27'37.4"W	October 31, 2018
TC7	Owl's Burrow	22°53'29.0"S 48°27'13.1"W	October 31, 2018
TC8	Owl's Burrow	22°53'36.3"S 48°29'43.0"W	October 31, 2018
TC9	Owl's Burrow	22°53'36.3"S 48°29'43.0"W	October 31, 2018
TC10	Owl's Burrow	22°53'36.3"S 48°29'43.0"W	October 31, 2018
TT1	Armadillo's Burrow	22°50'22.1"S 48°25'40.1"W	May 3, 2018
TT2	Armadillo's Burrow	22°50'22.1"S 48°25'40.1"W	May 3, 2018
TT3	Armadillo's Burrow	22°50'22.1"S 48°25'40.1"W	May 3, 2018
TT4	Armadillo's Burrow	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	May 3, 2018
TT5	Armadillo's Burrow	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	May 3, 2018
TT6	Armadillo's Burrow	22°50'22.1"S 48°25'40.1"W	October 30, 2018
TT7	Armadillo's Burrow	22°50'22.1"S 48°25'40.1"W	October 30, 2018
TT8	Armadillo's Burrow	22°50'22.1"S 48°25'40.1"W	October 30, 2018
TT9	Armadillo's Burrow	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	October 30, 2018
TT10	Armadillo's Burrow	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	October 30, 2018
CA1	Brazilian Savana	22°53'09.3"S 48°30'24.9"W	May 4, 2018
CA2	Brazilian Savana	22°53'09.3"S 48°30'24.9"W	May 4, 2018
CA3	Brazilian Savana	22°53'09.3"S 48°30'24.9"W	October 31, 2018
CA4	Brazilian Savana	22°53'09.3"S 48°30'24.9"W	October 31, 2018
EA1	Abandoned Building	22°50'37.1"S 48°25'41.2"W	May 3, 2018
EA2	Abandoned Building	22°50'37.1"S 48°25'41.2"W	May 3, 2018
EA3	Abandoned Building	22°50'37.1"S 48°25'41.2"W	October 30, 2018
EA4	Abandoned Building	22°50'37.1"S 48°25'41.2"W	October 30, 2018
MU1	Sazonal Semideciduous Forest	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	May 3, 2018
MU2	Sazonal Semideciduous Forest	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	May 3, 2018
MU3	Sazonal Semideciduous Forest	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	October 30, 2018
MU4	Sazonal Semideciduous Forest	22°48'54.8"S 48°23'37.3"W	October 30, 2018
PCA1	Sugarcane Plantation	22°47'12.8"S 48°24'35.9"W	May 3, 2018
PCA2	Sugarcane Plantation	22°47'12.8"S 48°24'35.9"W	May 3, 2018
PCA3	Sugarcane Plantation	22°47'12.8"S 48°24'35.9"W	October 30, 2018
PCA4	Sugarcane Plantation	22°47'12.8"S 48°24'35.9"W	October 30, 2018
PCF1	Coffee Plantation	22°46'57.8"S 48°24'42.7"W	May 3, 2018
PCF2	Coffee Plantation	22°46'57.8"S 48°24'42.7"W	May 3, 2018
PCF3	Coffee Plantation	22°46'57.8"S 48°24'42.7"W	October 30, 2018
PCF4	Coffee Plantation	22°46'57.8"S 48°24'42.7"W	October 30, 2018
PS1	Pasture	22°48'52.8"S 48°24'05.4"W	May 3, 2018
PS2	Pasture	22°48'52.8"S 48°24'05.4"W	May 3, 2018
PS3	Pasture	22°48'52.8"S 48°24'05.4"W	October 30, 2018
PS4	Pasture	22°48'52.8"S 48°24'05.4"W	October 30, 2018

Tabela 3. Análise de variância multivariada baseada em permutação (PERMANOVA; $p < 0.05$) com teste *a posteriori* de comparação par a par entre os ambientes amostrados.

PERMANOVA pairs	F Model	R ²	p-adjusted
Brazilian Savana vs Abandoned Building	4,15	0,409	0,924
Brazilian Savana vs Sazonal Semideciduous Forest	4,71	0,440	0,784
Brazilian Savana vs Sugarcane Plantation	6,07	0,503	0,98
Brazilian Savana vs Coffee Plantation	5,79	0,491	0,868
Brazilian Savana vs Pasture	3,26	0,352	0,84
Brazilian Savana vs Owl's Burrow	4,11	0,255	0,056
Brazilian Savana vs Armadillo's Burrow	5,29	0,306	0,056
Abandoned Building vs Sazonal Semideciduous Forest	4,83	0,446	0,644
Abandoned Building vs Sugarcane Plantation	5,15	0,462	0,812
Abandoned Building vs Coffee Plantation	4,90	0,449	0,728
Abandoned Building vs Pasture	3,17	0,346	0,56
Abandoned Building vs Owl's Burrow	3,42	0,222	0,056
Abandoned Building vs Armadillo's Burrow	4,65	0,279	0,084
Sazonal Semideciduous Forest vs Sugarcane Plantation	7,72	0,563	0,728
Sazonal Semideciduous Forest vs Coffee Plantation	5,84	0,493	0,868
Sazonal Semideciduous Forest vs Pasture	3,98	0,399	0,7
Sazonal Semideciduous Forest vs Owl's Burrow	4,53	0,274	0,084
Sazonal Semideciduous Forest vs Armadillo's Burrow	2,24	0,157	0,112
Sugarcane Plantation vs Coffee Plantation	7,34	0,550	0,728
Sugarcane Plantation vs Pasture	4,27	0,416	0,784
Sugarcane Plantation vs Owl's Burrow	4,02	0,251	0,084
Sugarcane Plantation vs Armadillo's Burrow	6,55	0,353	0,112
Coffee Plantation vs Pasture	4,59	0,433	0,7
Coffee Plantation vs Owl's Burrow	4,23	0,260	0,028
Coffee Plantation vs Armadillo's Burrow	5,12	0,299	0,084
Pasture vs Owl's Burrow	3,17	0,209	0,056
Pasture vs Armadillo's Burrow	4,31	0,264	0,028
Owl's Burrow vs Armadillo's Burrow	6,34	0,260	0,028

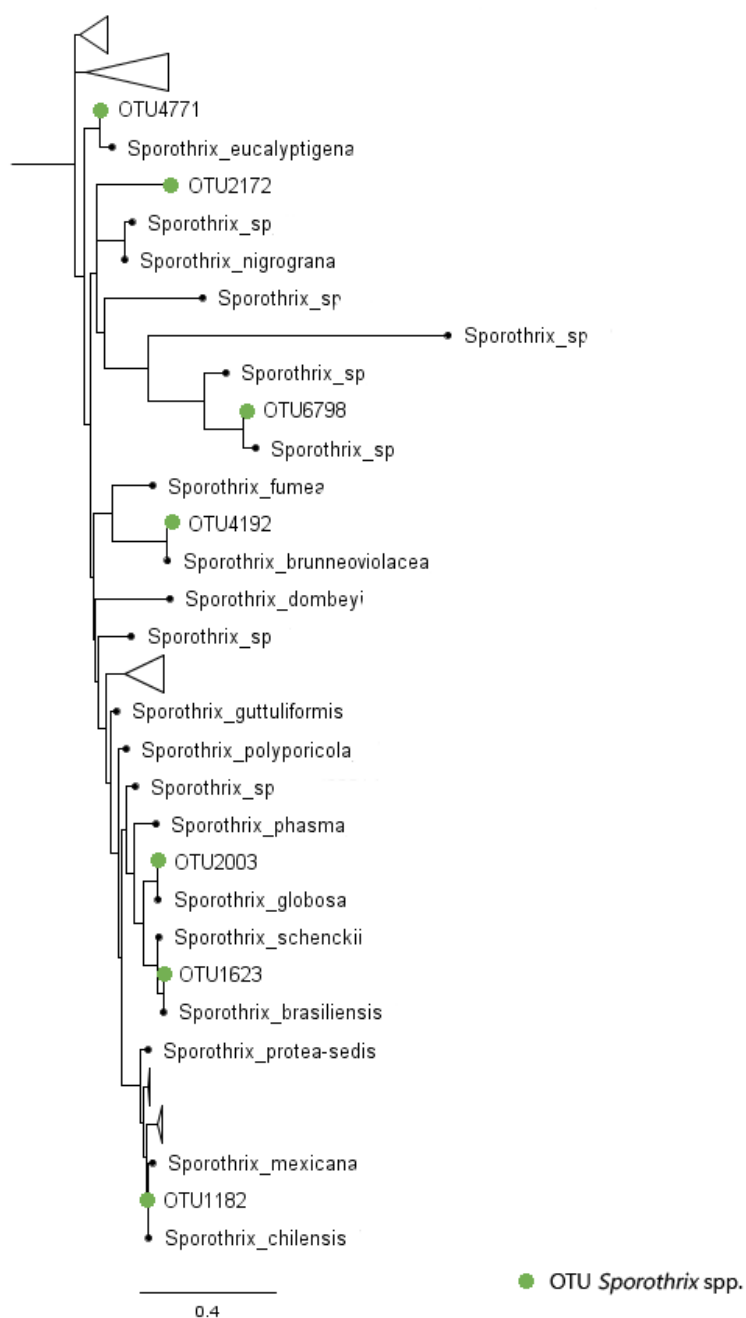


Figura 10. Árvore filogenética de *Sporothrix* spp. gerada para verificação da classificação taxonômica de OTUs. A sequência foi conferida também através dos dados do banco de genes (GenBank), utilizando NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

Tabela 4. Detecção de *Paracoccidioides* spp. em diferentes amostras pelo método de Nested PCR e NGS.

Sample	Site Type	Nested <i>Paracoccidioides</i>	NGS <i>Paracoccidioides</i> (N reads)
TC1	Owl's Burrow	-	-
TC2	Owl's Burrow	+	2
TC3	Owl's Burrow	+	-
TC4	Owl's Burrow	-	-
TC5	Owl's Burrow	-	-
TC6	Owl's Burrow	-	-
TC7	Owl's Burrow	-	-
TC8	Owl's Burrow	-	41
TC9	Owl's Burrow	-	-
TC10	Owl's Burrow	+	-
TT1	Armadillo's Burrow	+	-
TT2	Armadillo's Burrow	+	36
TT3	Armadillo's Burrow	-	-
TT4	Armadillo's Burrow	+	15
TT5	Armadillo's Burrow	-	-
TT6	Armadillo's Burrow	-	3
TT7	Armadillo's Burrow	-	-
TT8	Armadillo's Burrow	-	-
TT9	Armadillo's Burrow	-	-
TT10	Armadillo's Burrow	-	-
CA1	Brazilian Savana	+	23
CA2	Brazilian Savana	+	-
CA3	Brazilian Savana	+	-
CA4	Brazilian Savana	+	-
EA1	Abandoned Building	-	7
EA2	Abandoned Building	-	-
EA3	Abandoned Building	-	-
EA4	Abandoned Building	-	-
MU1	Sazonal Semideciduous Forest	-	3
MU2	Sazonal Semideciduous Forest	+	7
MU3	Sazonal Semideciduous Forest	-	-
MU4	Sazonal Semideciduous Forest	+	95
PCA1	Sugarcane Plantation	-	-
PCA2	Sugarcane Plantation	-	-
PCA3	Sugarcane Plantation	-	-
PCA4	Sugarcane Plantation	-	-
PCF1	Coffee Plantation	-	9
PCF2	Coffee Plantation	+	-
PCF3	Coffee Plantation	-	-
PCF4	Coffee Plantation	-	3
PS1	Pasture	+	27
PS2	Pasture	-	-
PS3	Pasture	-	-
PS4	Pasture	-	-