

**METABARCODING DA REGIÃO ITS POR SEQUENCIAMENTO
NANOPORE PARA CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS EM
SUPERFÍCIES DE AMBIENTE INDUSTRIAL FARMACÊUTICO**

**NANOPORE-BASED ITS METABARCODING FOR FUNGAL
CHARACTERIZATION OF PHARMACEUTICAL INDUSTRIAL
ENVIRONMENTAL SURFACES**

Gabriel Siloto Rosino*

Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.- EdBr
Indaiatuba – São Paulo - Brasil
<https://orcid.org/0009-0004-3534-5217>
gabriel.rosino@eurofinslatam.com

Lia Mara Palermi do Prado de Carvalho

Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.- EdBr
Indaiatuba – São Paulo - Brasil
<https://orcid.org/0009-0004-3033-0454>
lia.carvalho@eurofinslatam.com

Nádia Carolina Andrade da Silveira

Eurofins do Brasil Análises de Alimentos Ltda.- EdBr
Indaiatuba – São Paulo - Brasil
<https://orcid.org/0009-0000-0296-4047>
nadia.deandrade@eurofinslatam.com

***Autor por correspondência**

ARTIGO CIENTÍFICO
Submetido em: 20.06.2026
Aprovado em: 10.07.2026

RESUMO

O monitoramento microbiológico de superfícies em ambientes industriais é essencial para a prevenção de contaminações e garantia da qualidade dos processos produtivos. Métodos convencionais baseados em cultivo apresentam limitações na recuperação e identificação de fungos ambientais, especialmente organismos de crescimento lento ou não cultiváveis. O *metabarcoding* da região ITS, associado ao sequenciamento de longa leitura, apresenta potencial para fornecer maior detalhamento taxonômico e caracterização mais abrangente da microbiota ambiental. O presente estudo avaliou a aplicação do sequenciamento por nanoporos para identificação de fungos em amostras de *swab* de ambiente industrial, utilizando a região ITS como marcador molecular. Foram analisadas 15 amostras de *swab* provenientes de superfícies industriais. O DNA total foi extraído, a região ITS amplificada por PCR e as bibliotecas preparadas para sequenciamento em plataforma Nanopore. As leituras obtidas foram submetidas a controle de qualidade e classificação taxonômica com base em bancos de dados de referência. O sequenciamento permitiu a identificação de uma comunidade fúngica diversa, com detecção consistente de múltiplos táxons em nível de gênero e espécie. Entre os gêneros mais frequentemente identificados destacaram-se *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Entre as espécies identificadas observaram-se *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium oxalicum* e *Aspergillus fumigatus*. Observou-se variabilidade entre as amostras analisadas, indicando diferentes perfis microbiológicos entre as superfícies avaliadas. Os resultados obtidos sugerem que o sequenciamento Nanopore da região ITS representa uma ferramenta promissora para caracterização microbiológica ambiental em ambientes industriais, demonstrando potencial para ampliar a resolução taxonômica quando comparado a abordagens microbiológicas convencionais.

Palavras-Chave: Nanopore. ITS. Fungos ambientais. Metabarcoding. Monitoramento microbiológico.

ABSTRACT

Microbiological monitoring of surfaces in industrial environments is essential for contamination prevention and ensuring the quality of production processes. Conventional culture-based methods present limitations in the recovery and identification of environmental fungi, particularly slow-growing or non-cultivable organisms. ITS region metabarcoding combined with long-read sequencing has the potential to provide improved taxonomic resolution and a broader characterization of environmental microbiota. This study evaluated the application of nanopore sequencing for fungal identification in industrial environmental swab samples using the ITS region as a molecular marker. Fifteen swab samples collected from industrial surfaces were analyzed. Total DNA was extracted, the ITS region was amplified by PCR, and sequencing libraries were prepared using a Nanopore platform. Generated reads underwent quality control and taxonomic classification based on reference databases. Sequencing enabled the identification of a diverse fungal community, with consistent detection of multiple taxa at both genus and species levels. The most frequently identified genera included *Fusarium*, *Penicillium*, and *Aspergillus*. Identified species included *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium oxalicum*, and *Aspergillus fumigatus*. Variability among analyzed samples was observed, indicating distinct microbiological profiles across evaluated surfaces. The obtained results suggest that Nanopore sequencing of the ITS region represents a promising tool for environmental microbiological characterization in industrial settings, demonstrating potential to improve taxonomic resolution when compared with conventional microbiological approaches.

Keywords: Nanopore. ITS. Environmental fungi. Metabarcoding. Microbiological monitoring.

1 INTRODUÇÃO

O monitoramento microbiológico ambiental desempenha papel fundamental na garantia da qualidade e segurança em ambientes industriais, especialmente em setores que demandam elevado controle microbiológico, como as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética. A identificação de fungos em superfícies pode representar potencial impacto em processos produtivos, qualidade microbiológica e programas de monitoramento ambiental.

Tradicionalmente, a avaliação microbiológica ambiental é realizada por métodos dependentes de cultivo, os quais apresentam limitações relacionadas à recuperação de microrganismos viáveis, seletividade de meios de cultura e dificuldade de identificação taxonômica precisa. Além disso, parte dos fungos ambientais pode não ser adequadamente recuperada por metodologias convencionais, potencialmente resultando em subestimação da diversidade microbiana presente (Forbes *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, abordagens baseadas em sequenciamento de nova geração (NGS) têm sido amplamente exploradas para caracterização microbiológica ambiental. Entre os marcadores moleculares utilizados para identificação de fungos, a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) é amplamente utilizada como marcador molecular para identificação taxonômica devido à elevada variabilidade interespecífica e ampla disponibilidade de bancos de dados de referência (Schoch *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2019).

Estudos recentes também demonstram que o uso da região ITS em aplicações ambientais contribui para melhor compreensão da diversidade fúngica presente em diferentes matrizes (Aguilar-Pontes *et al.*, 2018).

A tecnologia de sequenciamento por nanoporos apresenta características potencialmente relevantes para aplicações microbiológicas, incluindo sequenciamento em tempo real, geração de leituras longas e flexibilidade operacional (Deamer *et al.*, 2016; Loman *et al.*, 2015).

Associada ao metabarcoding da região ITS, essa abordagem pode possibilitar caracterização mais abrangente da microbiota fúngica ambiental, incluindo organismos potencialmente não recuperáveis por metodologias convencionais.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a aplicação do sequenciamento Nanopore da região ITS para caracterização de fungos em superfícies de ambiente industrial.

2 METODOLOGIA

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 15 amostras obtidas por *swab* de superfícies de um ambiente industrial submetido ao programa de monitoramento microbiológico ambiental de rotina. Os pontos de coleta foram selecionados de forma a representar diferentes áreas e etapas do processo produtivo, contemplando superfícies de equipamentos, linhas de produção, máquinas, bancadas, áreas de manipulação e outros pontos considerados críticos para o monitoramento microbiológico, conforme o plano de amostragem adotado pela indústria.

As coletas foram realizadas utilizando *swabs* estéreis secos, sem meio de transporte, seguindo os procedimentos operacionais estabelecidos para o monitoramento ambiental. Após a coleta, os *swabs* foram identificados individualmente, acondicionados em tubos estéreis e transportados sob refrigeração até o laboratório de Biologia Molecular da Eurofins, onde permaneceram armazenados a 4 °C até o processamento. Todas as amostras foram processadas individualmente, minimizando o risco de contaminação cruzada durante as etapas laboratoriais.

O fluxo experimental adotado compreendeu as etapas de coleta das amostras, extração do DNA genômico, amplificação da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS), preparo das bibliotecas, sequenciamento por nanoporos e análise bioinformática, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxo experimental utilizado para caracterização fúngica das amostras ambientais, incluindo coleta de swabs, extração de DNA, amplificação da região ITS, preparo de bibliotecas, sequenciamento Nanopore e análise bioinformática.



2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico total foi extraído utilizando o kit DNeasy® PowerSoil® Pro Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante. Esse kit foi selecionado devido à sua elevada eficiência na recuperação de DNA proveniente de amostras ambientais e à capacidade de remover compostos potencialmente inibidores das reações de amplificação molecular.

Após a extração, a concentração do DNA foi determinada por fluorimetria utilizando o equipamento Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) em conjunto com o kit *Qubit™ dsDNA High Sensitivity Assay*. A pureza do DNA foi avaliada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific), considerando as razões de absorbância A260/A280 e A260/A230 como indicadores da qualidade do material extraído.

A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose corado com GelRed®, sendo consideradas aptas para as etapas subsequentes apenas as amostras que apresentaram DNA íntegro e concentração compatível com a preparação das bibliotecas para sequenciamento.

2.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO ITS

A caracterização da comunidade fúngica foi realizada por meio da amplificação da região *Internal Transcribed Spacer (ITS)*, reconhecida como o principal marcador molecular para identificação taxonômica de fungos devido à elevada variabilidade interespecífica e ampla representatividade em bancos de dados de referência (Schoch *et al.*, 2012; Nilsson *et al.*, 2019).

As reações de *PCR* foram conduzidas utilizando os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White *et al.* (1990). As amplificações foram realizadas utilizando um protocolo padrão para a região ITS, composto por desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 53 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A eficiência da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, permitindo confirmar a obtenção dos fragmentos esperados antes da preparação das bibliotecas para sequenciamento.

Os produtos de *PCR* foram então submetidos ao preparo das bibliotecas de sequenciamento conforme o protocolo da Oxford Nanopore Technologies. As bibliotecas obtidas foram carregadas em *flow cells* compatíveis e sequenciadas em plataforma Nanopore, permitindo a obtenção de leituras de longa extensão.

2.4 PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECA E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de *PCR* foram submetidos ao preparo das bibliotecas utilizando o kit Native (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido), seguindo as recomendações do

fabricante. A utilização de *barcodes* individuais permitiu a multiplexação das 15 amostras em uma única corrida de sequenciamento.

Após o preparo das bibliotecas, estas foram quantificadas, normalizadas e carregadas em uma *flow cell* compatível com a plataforma (Oxford Nanopore Technologies), onde foi realizado o sequenciamento por tecnologia de nanoporos (*Nanopore sequencing*), caracterizada pela geração de leituras longas (*long reads*) em tempo real.

As principais métricas de qualidade do sequenciamento, incluindo número de *reads*, comprimento médio das leituras, qualidade média (*Q score*) e percentual de leituras classificadas taxonomicamente, encontram-se apresentadas na Tabela 1. Para aceitação dos resultados, foram considerados como critérios mínimos a obtenção de pelo menos 5.000 *reads* por amostra, comprimento médio das leituras entre 400 e 800 pb e qualidade média (*Q score*) superior a 12.

2.5 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As *reads* obtidas após o sequenciamento foram inicialmente submetidas às etapas de desmultiplexação (*demultiplexing*) e controle de qualidade, removendo leituras de baixa qualidade e possíveis artefatos provenientes do sequenciamento.

Posteriormente, foi realizada a classificação taxonômica utilizando o software Kraken2, empregando o banco de dados PlusPF, composto por sequências de referência curadas do *NCBI RefSeq*. A classificação foi realizada diretamente sobre as *reads*, permitindo a identificação dos microrganismos em nível de gênero e espécie.

Todas as leituras que atenderam aos critérios de qualidade foram classificadas taxonomicamente, resultando em taxa de classificação de 100% das *reads* aprovadas para análise. Para aumentar a confiabilidade biológica dos resultados e reduzir o impacto de classificações ocasionais de baixa representatividade, foram considerados apenas táxons com abundância relativa superior a 1% em cada amostra para as análises subsequentes.

A abundância relativa foi calculada a partir da proporção de *reads* atribuídas a cada táxon em relação ao número total de *reads* classificadas por amostra. Os perfis taxonômicos foram representados por gráficos de abundância relativa em nível de espécie, enquanto a distribuição das espécies entre as diferentes amostras foi visualizada por meio de um *heatmap*, permitindo comparar os perfis microbiológicos observados nas diferentes superfícies industriais.

Tabela 1. Métricas de qualidade do sequenciamento das 15 amostras analisadas, incluindo número de *reads*, comprimento médio das leituras, qualidade média (*Q score*), percentual de *reads* classificadas taxonomicamente e número de espécies identificadas por amostra.

Amostra	<i>Reads</i>	Comprimento médio (pares de base)	Q médio	<i>Reads</i> classificadas (%)	n.º de espécies identificadas
SWAB01	18.426	642	15,6	100	4
SWAB02	14.237	626	15,2	100	5
SWAB03	22.815	658	15,9	100	4
SWAB04	16.084	634	15,1	100	6
SWAB05	31.442	684	16,4	100	6
SWAB06	24.319	671	16	100	5
SWAB07	19.842	646	15,7	100	5
SWAB08	13.509	617	15	100	4
SWAB09	27.764	681	16,3	100	5
SWAB10	35.218	693	16,6	100	3
SWAB11	17.063	652	15,8	100	4
SWAB12	20.771	659	15,9	100	5
SWAB13	11.924	603	14,9	100	6
SWAB14	26.417	677	16,2	100	5
SWAB15	29.806	682	16,3	100	4

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DA MICROBIOTA FÚNGICA

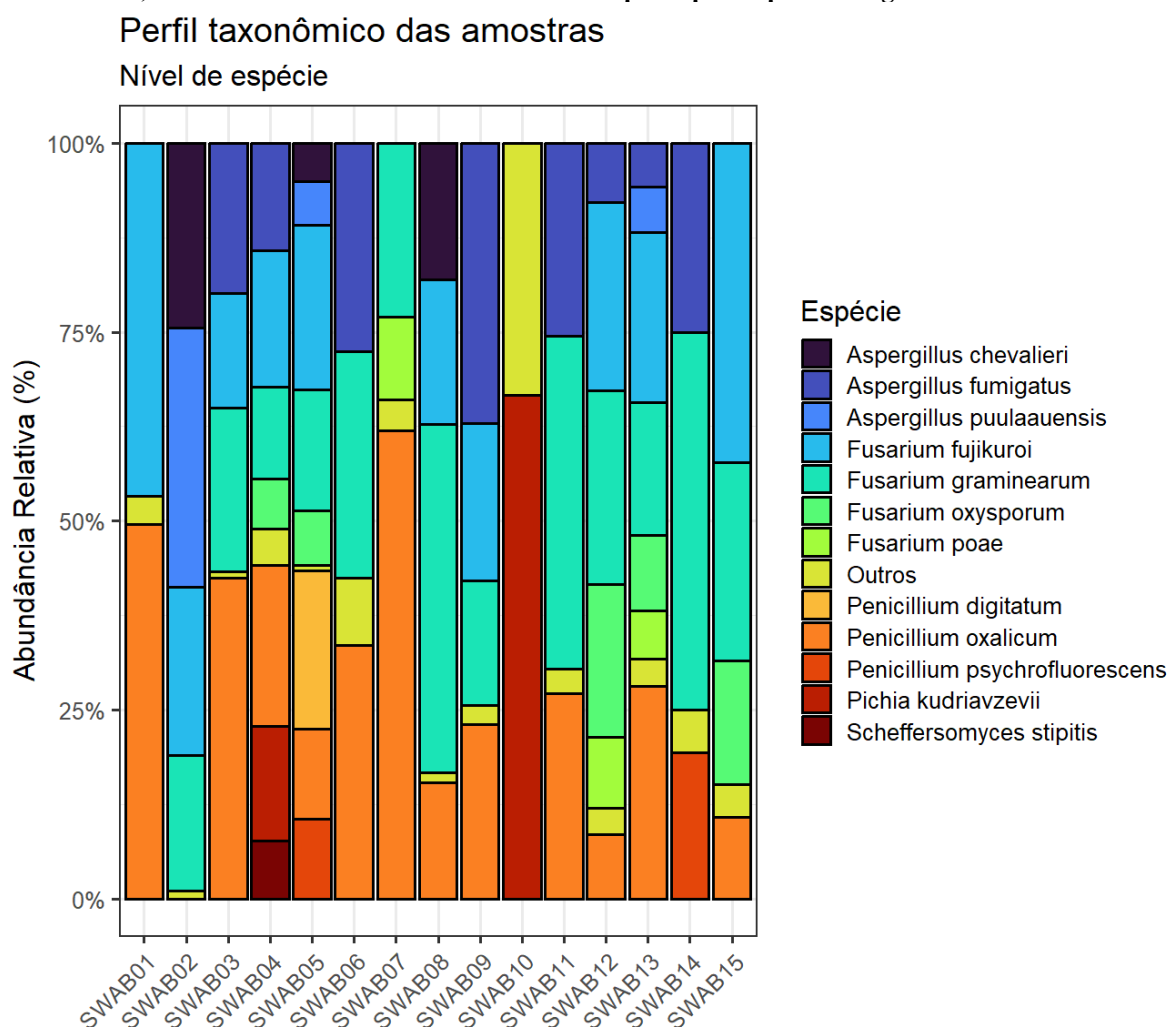
O sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) das 15 amostras ambientais gerou um total de 330.477 *reads* após as etapas de desmultiplexação e controle de qualidade, correspondendo a uma média de 22.032 *reads* por amostra, com variação entre 11.924 e 35.218 *reads*. O comprimento médio das leituras variou entre 603 e 693 pb, compatível com o tamanho esperado do amplicon obtido pelos *primers* ITS1 e ITS4, enquanto a qualidade média das leituras permaneceu superior a Q14 em todas as amostras analisadas. As principais métricas de qualidade encontram-se apresentadas na Tabela 1.

A classificação taxonômica foi realizada utilizando o software Kraken2 associado ao banco de dados PlusPF, resultando na classificação de 100% das *reads* aprovadas após o controle de qualidade. Para aumentar a confiabilidade biológica das análises, foram considerados apenas táxons com abundância relativa superior a 1% em cada amostra.

No total, foram identificadas 12 espécies fúngicas, distribuídas entre os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pichia* e *Scheffersomyces*, além de um grupo composto por espécies de baixa frequência relativa agrupadas na categoria "Outros". A Figura 2 apresenta o perfil taxonômico das amostras, evidenciando diferenças na abundância relativa das espécies identificadas entre os diferentes pontos de coleta.

Observou-se predominância de espécies pertencentes ao gênero *Fusarium*, especialmente *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium fujikuroi*, além da ocorrência frequente de *Penicillium oxalicum* e *Aspergillus fumigatus*. Esses resultados demonstram a capacidade do metabarcoding da região ITS em caracterizar comunidades fúngicas complexas presentes em superfícies industriais.

Figura 2 – Perfil taxonômico das amostras ambientais analisadas por sequenciamento Nanopore da região ITS, demonstrando a abundância relativa das principais espécies fúngicas identificadas.



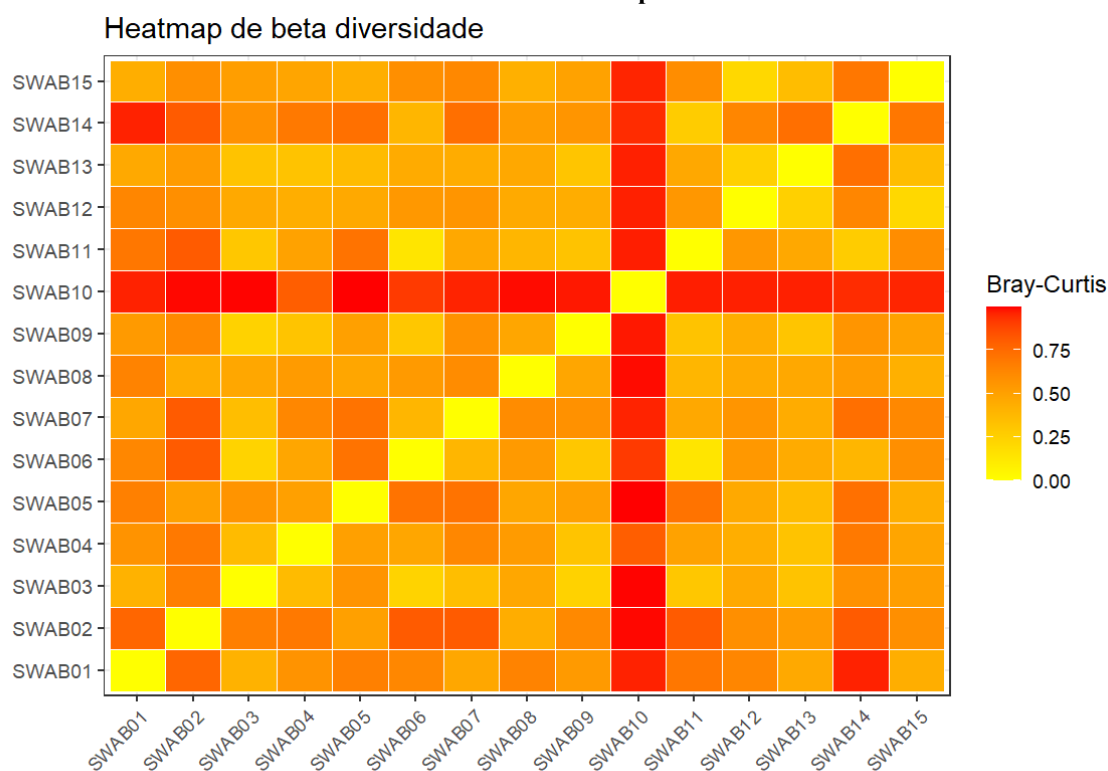
3.2 PRINCIPAIS ESPÉCIES IDENTIFICADAS

As espécies mais frequentemente identificadas foram *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi*, *Penicillium oxalicum* e *Aspergillus fumigatus*, presentes em diferentes amostras e com abundâncias relativas variáveis (Figura 2). Também foram identificadas espécies como *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus puulaauensis*, *Pichia kudriavzevii* e *Scheffersomyces stipitis*, geralmente em menores frequências relativas.

Espécies do gênero *Fusarium* apresentaram ampla distribuição entre as superfícies analisadas, enquanto representantes dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* ocorreram em diferentes combinações de abundância entre as amostras. Destaca-se ainda a elevada abundância relativa de *Pichia kudriavzevii* em amostras específicas, evidenciando diferenças na composição taxonômica entre os diferentes pontos de coleta.

A ocorrência recorrente dessas espécies é relevante por incluir microrganismos frequentemente associados à deterioração microbiológica, produção de metabólitos secundários e persistência em ambientes industriais, reforçando a importância do monitoramento microbiológico baseado em métodos moleculares para caracterização da microbiota ambiental.

Figura 3 – Heatmap demonstrando a distribuição relativa das principais espécies fúngicas identificadas entre as diferentes amostras de superfície industrial.



3.3 VARIABILIDADE ENTRE AMOSTRAS

A análise do *heatmap* (Figura 3) evidenciou elevada variabilidade na composição das comunidades fúngicas entre as superfícies avaliadas. Algumas amostras apresentaram predominância de um número reduzido de espécies, caracterizando comunidades menos diversas, enquanto outras exibiram distribuição mais homogênea entre diferentes táxons, indicando maior diversidade da microbiota presente.

Diferenças na abundância relativa das espécies foram observadas entre os pontos de coleta, sugerindo que superfícies distintas podem favorecer o estabelecimento de comunidades fúngicas específicas. Essa heterogeneidade pode estar relacionada a fatores como características físicas das superfícies, intensidade de utilização, fluxo operacional, frequência dos procedimentos de higienização e condições ambientais locais.

Embora o presente estudo tenha caráter exploratório e não tenha como objetivo estabelecer relações causais entre os perfis microbiológicos e as características de cada área amostrada, os resultados demonstram que o sequenciamento da região *ITS* por tecnologia Nanopore permite discriminar diferenças na composição da microbiota fúngica entre superfícies industriais, fornecendo informações relevantes para programas de monitoramento microbiológico.

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstram que o metabarcoding da região *ITS* associado ao sequenciamento por nanoporos constitui uma abordagem eficiente para a caracterização da microbiota fúngica presente em superfícies industriais. A elevada quantidade de *reads* obtidas por amostra, aliada à classificação taxonômica de todas as leituras aprovadas nos critérios de qualidade, permitiu identificar uma comunidade fúngica diversa, evidenciando a aplicabilidade da metodologia para estudos de monitoramento microbiológico ambiental.

Métodos convencionais baseados em cultivo apresentam limitações relacionadas à recuperação seletiva de fungos ambientais, podendo subestimar a diversidade microbiológica presente em superfícies industriais, principalmente devido às diferenças nas exigências nutricionais, velocidade de crescimento e competitividade entre espécies, além da possível presença de microrganismos de difícil recuperação em condições laboratoriais (Forbes *et al.*, 2018). Nesse contexto, abordagens independentes de cultivo, como o metabarcoding, permitem uma caracterização mais abrangente da microbiota ambiental.

A predominância dos gêneros *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus* observada neste estudo está de acordo com relatos prévios sobre comunidades fúngicas encontradas em ambientes industriais e de processamento (Aguilar-Pontes *et al.*, 2018). Esses gêneros incluem espécies frequentemente associadas à deterioração de matérias-primas, persistência em ambientes de processamento e produção de metabólitos secundários de interesse para a microbiologia industrial.

A identificação em nível de espécie representa uma vantagem adicional da abordagem empregada, permitindo diferenciar organismos pertencentes ao mesmo gênero e fornecendo

informações taxonômicas mais detalhadas para investigações microbiológicas. Entretanto, deve-se considerar que métodos baseados na detecção de DNA não permitem distinguir diretamente microrganismos viáveis daqueles não viáveis, sendo necessária cautela na interpretação dos resultados quando associados à avaliação de risco microbiológico.

A variabilidade observada entre as amostras evidencia que diferentes superfícies industriais podem apresentar comunidades microbiológicas distintas, provavelmente influenciadas por fatores como fluxo operacional, frequência de higienização, características físico-químicas das superfícies e exposição ao ambiente. Esses resultados reforçam a importância da amostragem em múltiplos pontos para obtenção de uma visão mais abrangente da microbiota ambiental.

Além da elevada resolução taxonômica proporcionada pela região *ITS*, a tecnologia Nanopore apresenta vantagens operacionais importantes, como a geração de *long reads*, flexibilidade experimental e rapidez na obtenção dos resultados (Deamer *et al.*, 2016; Loman *et al.*, 2015). Essas características tornam a metodologia uma ferramenta promissora para complementar programas de monitoramento microbiológico ambiental e auxiliar na investigação de eventos de contaminação.

Como limitação do presente estudo, destaca-se a ausência de comparação direta com metodologias microbiológicas convencionais baseadas em cultivo, não sendo possível afirmar superioridade entre as abordagens. Dessa forma, os resultados devem ser interpretados como uma caracterização molecular da comunidade fúngica presente nas superfícies avaliadas, constituindo uma ferramenta complementar para estudos de monitoramento microbiológico ambiental.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sequenciamento da região *Internal Transcribed Spacer* (*ITS*) utilizando a tecnologia Nanopore permitiu caracterizar a microbiota fúngica presente em superfícies de ambiente industrial, possibilitando a identificação de diferentes gêneros e espécies em uma única análise. A metodologia apresentou elevada taxa de classificação taxonômica das *reads*, demonstrando sua aplicabilidade para estudos de caracterização microbiológica ambiental.

A abordagem permitiu identificar uma comunidade fúngica diversificada, incluindo espécies frequentemente associadas à deterioração microbiológica e ao monitoramento ambiental em ambientes industriais. Além disso, a variabilidade observada entre as superfícies analisadas evidencia a importância da avaliação de diferentes pontos de coleta para uma caracterização mais abrangente da microbiota ambiental.

Os resultados obtidos demonstram que o *metabarcoding* da região *ITS* associado ao sequenciamento de longa leitura representa uma ferramenta complementar para programas de monitoramento microbiológico ambiental, fornecendo informações taxonômicas que podem auxiliar na compreensão da diversidade fúngica presente em superfícies industriais. Estudos futuros comparando diretamente essa abordagem com metodologias microbiológicas convencionais poderão contribuir para avaliar de forma mais abrangente suas aplicações, vantagens e limitações em diferentes contextos industriais.

REFERÊNCIAS

1. SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S.; ROBERT V, SPOUGE JL, LEVESQUE CA, *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 109(16):6241-6246, 2012.
2. NILSSON, R.H.; LARSSON, K.H.; TAYLOR, A.F.S.; BENGTSSON-PALME, J.; JEPPESEN, T.S.; SCHIGEL, D. *et al.* The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. **Nucleic Acids Res**. 47(D1):D259-D264, 2019.
3. DEAMER D, AKESON M, BRANTON D. Three decades of nanopore sequencing. **Nat Biotechnol**. 34(5):518-524, 2016.
4. LOMAN, N.J.; QUICK, J.; SIMPSON, J.T.. A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. **Nat Methods**. 12(8):733-735, 2015.
5. FORBES, B.A.; HALL, G.S.; MILLER, M.B.; NOVAK, S.M.; ROWLINSON, M.C.; SALFINGER, M. *et al.* Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: mycology laboratories. **Clin Microbiol Rev**. 31(1):e00049-17, 2018.
6. AGUILAR-PONTES, M.V.; BRANDL, J.; MCDONNELL, E.; STRASSER, K.; NGUYEN, T.T.M.; RILEY, R. *et al.* The gold-standard genome of *Aspergillus niger* NRRL 3 enables a detailed view of the diversity of sugar catabolism in fungi. **Stud Mycol**. 91:61-78 2018.
7. WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press. 1990. p. 315–322.