

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

CAMILA BRANDA DOS REIS

**Perfil de virulência de *Candida* spp. isoladas de sistema de tratamento de
dejetos da pecuária leiteira com biodigestor anaeróbio**

**Belo Horizonte, MG
2020**

Camila Branda dos Reis

Perfil de virulência de *Candida* spp. isoladas de sistema de tratamento de dejetos da pecuária leiteira com biodigestor anaeróbio

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Dra. Viviane de Souza Alves

Co-orientador: Dr. Marcelo Henrique Otenio

043 Reis, Camila Branda dos.
 Perfil de virulência de *Candida* spp. isoladas de sistema de tratamento de
 dejetos da pecuária leiteira com biodigestor anaeróbio [manuscrito] / Camila
 Branda dos Reis. - 2020.
 121 f. : il. ; 29,5 cm.

 Orientadora: Dra. Viviane de Souza Alves. Co- orientador: Dr. Marcelo
 Henrique Otenio.

 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
 Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

 1. Microbiologia. 2. Candida. 3. Virulência. 4. Digestores de Biogás. I. Alves,
 Viviane de Souza. II. Otenio, Marcelo Henrique. III. Universidade Federal de
 Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME DO ALUNO: CAMILA BRANDA DOS REIS - 2016707113

Título do Trabalho: Perfil de virulência de *Candida* spp. isoladas de sistema de tratamento de dejetos da pecuária leiteira com biodigestor anaeróbio

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia.

Aprovada em 16 de novembro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Membros da banca:

Prof. Dr. Carlos Henrique Rosa.

Prof(a). Dra. Susana Johann

Prof(a). Dra. Rachel Basques Caligiorne

Profa Dra. Adriana Oliveira Medeiros

Profa. Dra. Viviane de Souza Alves - Orientadora

Professora. Dra. Daniele da Glória de Souza

*Coordenadora do Programa de
Pós-graduação em Microbiologia/UFMG*

Belo Horizonte, 16 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 29/06/2021, às 08:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0808392** e o código CRC **02BF3431**.

Referência: Processo nº 23072.204067/2021-14

SEI nº 0808392

AGRADECIMENTOS

Agradeço de forma especial,

Meus pais, pela educação, oportunidades e palavras de conforto concedidas nos momentos mais importantes pelos quais passei.

A Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, por me acolher e fornecer os aportes necessários ao desenvolvimento do presente trabalho.

A Fundação e Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

A Dra. Viviane de Souza Alves, pela orientação, apoio e, principalmente, por acreditar e confiar em minha capacidade.

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pelos ensinamentos e ajuda sempre que solicitada.

Ao professor e pesquisador Dr. Marcelo Henrique Otenio, por sempre me receber de braços abertos, pelos conselhos, ensinamentos e oportunidades.

Todos os pesquisadores da EMBRAPA Gado de Leite por me receberem mais uma vez e, principalmente, pela ajuda e ensinamentos passados.

Aos amigos que o Doutorado me concedeu, Paulo, João, Lucas e Melina pelos diversos momentos de descontração e conselhos. Ainda agradeço de forma especial ao João e ao Paulo, que me acompanharam e ajudaram na execução de experimentos essenciais ao trabalho.

Aos amigos da academia, que jamais serão esquecidos, Juliana, Daniele, Carla, Paula, Lucas, Luiz e Dayana.

A Roberta, por sempre está por perto em momentos difíceis, pelos conselhos, momentos de diversão e nossas horas de conversa.

Os amigos do Laboratório, Ana Carol, Ana Paula, Aline e Elisa pela ajuda e momentos alegres vividos.

A todos os amigos de Juiz de Fora por entenderem a minha ausência em momentos especiais.

E por último, porém o mais importante, FORA BOLSONARO!

RESUMO

O aproveitamento dos resíduos gerados pela agropecuária é consideravelmente elevado, dada a relevância desse setor, principalmente no Brasil, e os problemas acarretados quando ocorre seu descarte incorreto. Para estabelecer o risco clínico da utilização do biofertilizante, estudos envolvendo leveduras como potenciais patógenos são necessários, com isso, este trabalho propõe estabelecer o potencial risco clínico veterinário e humano de *Candida* spp. isoladas do processo de biodigestão anaeróbia de dejetos da bovinocultura leiteira. Foram realizadas 10 coletas do afluente, efluente do biodigestor e da lagoa de biofertilizante da fazenda experimental da EMBRAPA Gado de Leite. As amostras coletadas foram inoculadas no meio de cultivo seletivo e diferencial CHROMagar *Candida* acrescido do corante rosa de bengala. Foi feita a contagem direta de colônias para a quantificação, isolamento, identificação presuntiva e cálculo da eficiência do sistema quanto a remoção de *Candida* spp. Análises de pH, demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e carbono orgânico total (COT) também foram realizadas. O sistema removeu cerca 2,28 ciclos log de *Candida* spp. no inverno e 1,68 ciclos log no verão, contudo, a eficiência do sistema na remoção da matéria orgânica (DBO e COT) no verão foi maior (84,9% e 84,8%, respectivamente) que no inverno (71,9% e 56,8%, respectivamente), mostrando que a temperatura influenciou beneficemente na remoção desse gênero, mas não na qualidade do efluente. A eficiência total do sistema quanto a remoção de *Candida* spp. foi de 99,42% no inverno e de 98,44% no verão. Em relação ao pH, tanto no afluente quanto no efluente e biofertilizante, em ambas as estações do ano, girou em torno da neutralidade (7,1 – 7,4). Foram isoladas 376 cepas de *Candida* spp., sendo 177 no verão e 199 no inverno. No inverno as espécies de *Candida* identificadas foram *C. glabrata* (35%), *C. krusei* (27%), *C. albicans* (26%) e *C. tropicalis* (9%). No verão, as espécies encontradas foram *C. tropicalis* (36%), *C. albicans* (25%), *C. krusei* (21%) e *C. glabrata* (12%). As espécies identificadas são de interesse clínico veterinário por serem as mais comumente isoladas de leite proveniente de vacas com mastite, ou seja, apresentam elevado potencial de contaminação para o rebanho. As amostras isoladas foram estocadas por congelamento e após reativação 216 estavam viáveis. Estas foram avaliadas quanto ao potencial de dimorfismo e perfil de *fingerprint* da região (GTG)5. Então 38 cepas foram testadas quanto a virulência. Todos os isolados produziram biofilme, 52,6% produziram fosfolipase e apenas três isolados foram produtores de protease. Com relação ao perfil de susceptibilidade, todas as cepas foram resistentes ou dose-dependes a anfotericina B e ao itraconazol. Com relação ao fluconazol, as cepas de *C. albicans* foram em sua totalidade resistentes, *C. tropicalis* em 85,7% e *C. glabrata* 22,2%. A patogenicidade *in vivo*, utilizando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*, mostrou que em *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* a LT50 correlacionou com a habilidade de produzir biofilme, já em *C. tropicalis* todos os isolados tiveram a LT50 inferior a linhagem ATCC. Além disso, para *C. glabrata*, a LT50 está relacionada às características da cepas produzirem hifas e pseudohifas, fato esse inusitado e que merece estudos mais aprofundados, assim como os demais isolados que tiveram suas características de virulência semelhante ou mais forte que as cepas padrões.

Palavras-chave: biodigestor, *Candida*, dejetos bovinos leiteiros, virulência.

ABSTRACT

The use of waste generated by agriculture is considerably high, given the relevance of this sector, especially in Brazil, and the problems caused when its incorrect disposal occurs. To establish the clinical risk of biofertilizer use, studies involving yeasts as potential pathogens are also necessary, with this work, this work proposes to establish the potential veterinary and human risk of *Candida* spp. isolated from the anaerobic biodigestion process of dairy cattle waste. Ten collections of the tributary, biodigester effluent and biofertilizer pond from Embrapa Gado de Leite experimental farm were collected. The samples collected were inoculated in the selective and differential culture medium CHROMagar *Candida* plus the pink cane dye. Colonies were directly counting for quantification, isolation, presumptive identification and calculation of system efficiency regarding the removal of *Candida* spp. Analyses of pH, biochemical oxygen demand (BOD) and total organic carbon (TOC) were also performed. The system removed about 2.28 log cycles from *Candida* spp. in winter and 1.68 log cycles in summer, however, the efficiency of the system in the removal of organic matter (BOD and TOC) in summer was higher (84.9% and 84.8%, respectively) than in winter (71.9% and 56.8%, respectively), showing that temperature influenced beneficently in the removal of this genus, but not in the quality of the effluent. The overall efficiency of the system as the removal of *Candida* spp. was 99.42% in winter and 98.44% in summer. Regarding pH, both in the tributary and in the effluent and biofertilizer, in both seasons, it turned around neutrality (7.1 – 7.4). A number of 376 *Candida* spp. strains were isolated, 177 in summer and 199 in winter. In winter, the *Candida* species identified were *C. glabrata* (35%), *C. krusei* (27%), *C. albicans* (26%) and *C. tropicalis* (9%). In summer, the species found were *C. tropicalis* (36%), *C. albicans* (25%), *C. krusei* (21%) and *C. glabrata* (12%). The species identified are of clinical veterinary interest because they are the most commonly isolated from milk from cows with mastitis, that is, they have a high potential for contamination for the herd. The isolated samples were touched by freezing and after reactivation 216 were viable. These were evaluated for the potential of dimorphism and fingerprint profile of the region (GTG)5. Then 38 strains were tested for virulence. All isolates produced biofilm, 52.6% produced phospholipase and only three isolates were protease producers. Regarding the susceptibility profile, all strains were resistant or dose-dependent amphetericin B and itraconazole. Regarding fluconazole, the strains of *C. albicans* were in their entirety resistant, *C. tropicalis* in 85.7% and *C. glabrata* 22.2%. The *in vivo* pathogenicity, using the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*, showed that in *C. albicans*, *C. krusei* and *C. glabrata* the LT50 correlated with the ability to produce biofilm, while in *C. tropicalis* all isolates had the LT50 lower than the ATCC strain. Moreover, for *C. glabrata*, LT50 is related to the characteristics of the strains producing hyphae and pseudohyphae, a fact that is unusual and deserves further studies, as well as the other isolates that had their characteristics of virulence similar or stronger than the standard strains.

Keywords: biodigester, *Candida*, dairy cattle manure, virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelos de biodigestor. A - Modelo Indiano; B - Modelo Chinês; C - Modelo Canadense	16
Figura 2: Esquema das etapas da biodigestão anaeróbia e os microrganismos envolvidos	19
Figura 3: Estrutura <i>free stall</i> utilizada para confinamento de rebanhos leiteiros, consistindo em áreas com camas individualizadas, corredores de acesso e pistas de trato.	41
Figura 4: Esquema do abastecimento e fluxo de operação do biodigestor modelo canadense localizado na fazenda experimental da EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG.	42
Figura 5: Esquema com as coletas e os procedimentos realizados posteriormente.	43
Figura 6: Esquema do delineamento experimental adotado na 2ª fase do trabalho.	47
Figura 7: Apresentação das diferentes espécies de <i>Candida</i> no meio seletivo e diferencial CHROMagar.	65
Figura 9: Fluxo de contaminação das leveduras do gênero <i>Candida</i> entre biodigestor/animal/homem.	67
Figura 10: Microscopia mostrando filamentos produzidos durante o teste de dimorfismo. Em A é mostrado o dimorfismo em um isolado de <i>Candida albicans</i> e em B, C e D as hifas/pseudohifas produzidas pelas cepas isoladas de <i>Candida glabrata</i> , 262, 299 e 307, respectivamente. Já em E é representado o controle negativo de <i>Candida glabrata</i> para produção de hifas/pseudohifas.	70
Figura 11: Zona de precipitação observada no teste de produção da exoenzima fosfolipase, em que “A” é a cepa 253, “B” a cepa 258, “C” a cepa 276 e “D” a ATCC 20298 controle negativo.	79
Figura 12: Zona de precipitação observada no teste de produção da exoenzima protease, em que “A” é a cepa não produtora, “B” a cepa 210, “C” a cepa 116 e “D” a cepa 157.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de ponto de corte (<i>breakpoints</i>) estabelecidos para caracterizar as espécies de <i>Candida</i> como resistentes ou susceptíveis a antifúngicos.	54
Tabela 2: Análises físico-químicas do afluente, efluente e biofertilizante no período de verão e inverno.	57
Tabela 3: Isolados de <i>Candida</i> a partir do afluente, efluente e biofertilizante, no período do verão.	63
Tabela 4: Isolados de <i>Candida</i> a partir do afluente, efluente e biofertilizante, no período do inverno.	64
Tabela 5: Porcentagem das espécies de <i>Candida</i> encontradas no inverno e verão, nos três pontos amostrais.	66
Tabela 6: Isolados viáveis obtidos após congelamento e transporte.	69
Tabela 7: Teste de dimorfismos dos isolados, numerados no canto esquerdo e cepas padrões.	71
Tabela 8: Impressão digital da região (GTG) ₅ dos 216 isolados.	72
Tabela 9: Isolados selecionados para análise de virulência.	76
Tabela 10: Produção de biofilme, <i>in vitro</i> , dos isolados de <i>Candida</i>	78
Tabela 11: Produção de exoenzimas, <i>in vitro</i> , dos isolados de <i>Candida</i>	79
Tabela 12: Leitura da CIM ₈₀ dos isolados de <i>Candida</i> frente aos agentes antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B.	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Densidade populacional de <i>Candida</i> spp. no abastecimento inicial do biodigestor em ambas as estações do ano.	56
Gráfico 2: Densidade de <i>Candida</i> spp. no afluente do biodigestor e no decorrer do processo de biodigestão anaeróbia, em ambas as estações do ano.	58
Gráfico 3: Densidade de <i>Candida</i> spp. no biofertilizante e efluente, no verão e inverno, durante o período de fermentação.	60
Gráfico 4: Visão geral da densidade populacional de <i>Candida</i> spp no afluente, efluente e biofertilizante, durante o processo de biodigestão anaeróbia em ambos períodos do ano.	61
Gráficos 5 e 6: Sobrevivência de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida albicans</i> e cepa a padrão SC 5314 durante 12 dias.	86
Gráficos 7 e 8: LT50 do <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida albicans</i> e cepa ATCC SC 5314.	87
Gráfico 9: Sobrevivência de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida tropicalis</i> e cepa a padrão ATCC 750 durante 12 dias.	88
Gráfico 10: LT50 de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida tropicalis</i> e cepa a padrão ATCC 750.	89
Gráfico 11: Sobrevivência de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida krusei</i> e cepa a padrão ATCC 20298 durante 12 dias.	90
Gráfico 12: LT50 de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida krusei</i> e cepa a padrão ATCC 20298.	90
Gráficos 13 e 14: Sobrevivência de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida glabrata</i> e a cepa ATCC ATCC 90030 durante 12 dias.	91
Gráficos 15 e 16: LT50 de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de <i>Candida glabrata</i> e cepa a padrão ATCC 90030.	92
Gráfico 17: Sobrevivência de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais sem identificação pelo CHROmagar durante 12 dias.	93
Gráfico 18: LT50 de <i>C. elegans</i> na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais sem identificação pelo CHROmagar.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ASD** Ágar Sabouraud Dextrose
- BHI** Agar *Brain Heart Infusion*
- CGC** *Caenorhabditis Genetics Center*
- CIM** Concentração Inibitória Mínima
- CLSI** *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- COT** Carbono Orgânico Total
- DBO** Demanda Bioquímica de Oxigênio
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- EMBRAPA** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FUdR** 5 – fluoro -2'- deoxiuridina
- IBGE** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- INMET** Instituto Nacional de Meteorologia
- LB** Luria-Bertani
- LBCM** Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos
- NGM** *Nematode Growth Media*
- PBS** Tampão fosfato-salino
- pH** Potencial Hidrogeniônico
- RPMI-1640** *Roswell Park Memorial Institute - 1640*
- TRH** Tempo de Retenção Hidráulica
- UFC** Unidades Formadoras de Colônias
- YPD** *Yeast extract - Peptone - Dextrose*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 PECUÁRIA LEITEIRA	12
2.1.1 Problemas ambientais no descarte incorreto de resíduos.....	12
2.1.2 Disseminação de microrganismos e/ou genes de resistência no ambiente	13
2.2 BIODIGESTOR ANAERÓBIO	14
2.3 BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	17
2.3.1 Etapas da biodigestão e microrganismos envolvidos.....	17
2.3.2 Fatores que alteram o equilíbrio microbiano na biodigestão	19
2.3.3 Leveduras envolvidas na biodigestão.....	22
2.4 BIOGÁS E BIOFERTILIZANTE	23
2.4.1 Biogás	23
2.4.2 Biofertilizante.....	24
2.5 O GÊNERO <i>CANDIDA</i>	27
2.5.1 Fatores de virulência	29
2.5.2 Tratamento e Resistência.....	33
2.5.3 Relevância clínica.....	35
2.6 MODELO DE INFECÇÃO INVERTEBRADO – <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i>	37
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 LOCAL DE COLETA DE AMOSTRAS	41
4.2 CONDIÇÕES DO BIODIGESTOR ANAERÓBIO	41
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA FASE 1	43
4.3.1 Análises Microbiológicas	44
4.3.2 Análises Físico-Químicas	44
4.3.3 Eficiência do Sistema Quanto a Remoção Microbiana e a Matéria Orgânica ..	44
4.4 CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	46
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA FASE 2	46
4.5.1 Triagem dos Isolados	47

4.5.2 Produção de biofilme	49
4.5.3 Produção de Exoenzimas.....	50
4.5.4 Perfil de Susceptibilidade aos Antifúngicos	52
4.5.5 Virulência <i>in vivo</i>	54
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>CANDIDA</i> SPP. NO PROCESSO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	56
5.2 ISOLADOS DE <i>CANDIDA</i> SPP. DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA.....	62
5.3 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS	69
5.4 TRIAGEM DOS ISOLADOS	70
5.5 AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA	77
5.5.1 Produção de biofilme.....	77
5.5.2 Produção de exoenzimas (fosfolipase e protease).....	78
5.5.3 Susceptibilidade <i>in vitro</i> dos isolados aos antifungicos	81
5.5.4 Análise de patogenicidade no modelo invertebrado <i>C. elegans</i>	84
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A criação do gado leiteiro, principalmente nos sistemas de confinamento ou semiconfinamento, gera grande quantidade de dejetos em pouco espaço de área. Esse dejetos além de conter alta carga microbiana e alto teor de matéria orgânica, normalmente, está acompanhado de restos de rações, pelos, areias, mato, águas residuárias e, em alguns casos, restos de antimicrobianos de uso veterinário e genes de resistência a esses microbianos, o que determina um resíduo inadequado para ser lançado diretamente no ecossistema.

Os prejuízos ambientais do descarte incorreto desses resíduos são devidos, principalmente, por possuírem alta Demanda Bioquímica de Oxigênio que em contato com um corpo d'água reduzem o teor de oxigênio da água. Além disso, são constituídos por nutrientes, principalmente nitrogênio, fósforo e potássio, que estimulam o crescimento de plantas aquáticas e a eutrofização dos corpos d'água. O risco à saúde humana e animal é devido à existência de inúmeros microrganismos que, embora nos seus hospedeiros exerçam papel biológico bem definido, ao serem descartadas no ambiente podem se portar como microrganismos potencialmente patogênicos. Este fato torna-se mais significativo à medida que esses microrganismos podem ser resistentes a uma gama de antimicrobianos e são espalhados no solo como contaminantes.

Estudos recentes buscam o direcionamento correto desse resíduo e uma alternativa é sua biodigestão anaeróbia. O processo anaeróbio estabelecido dentro do biodigestor reduz a carga microbiana e a concentração da matéria orgânica, gerando biogás e biofertilizante, o que contribui beneficentemente para o ambiente e para o produtor. As condições climáticas do Brasil permitem esse tipo de processo. Contudo, é relevante ressaltar que o biofertilizante produzido ainda possui carga microbiana associada a casos clínicos, nesse sentido, o biofertilizante, assim como a biodigestão anaeróbia, requerem conhecimento e controle microbiológico eficazes.

Estudos envolvendo a diversidade microbiana do biofertilizante são vastos, porém, estão voltados para o conhecimento de bactérias e arqueas. Entretanto, para um controle microbiológico eficaz é necessário conhecer também a microbiota

leveduriforme, principalmente pelo potencial risco patogênico que apresenta. Como as espécies de *Candida* são ubíquas, comensais aos humanos e ao gado, apresentam diversos mecanismos de adaptação e fatores de virulência e são patógenos oportunistas, a verificação da sua presença no biofertilizante torna-se importante tanto para o animal quanto para o homem.

Na fazenda experimental da EMBRAPA Gado de Leite, Coronel Pacheco – MG, além do uso do biofertilizante para a irrigação, ele também é utilizado para a lavagem dos currais, como uma medida de reaproveitamento e economia de água, porém esse fato aumenta o risco de contaminação dos animais e/ou homem e precisa ser monitorado.

A presença de *Candida* no efluente de irrigação pode acarretar a contaminação do solo e a disseminação de cepas patogênicas ao homem e aos animais, assim como genes de resistência a antifúngicos. Os animais contaminados por essas leveduras podem apresentar quadros de mastites fúngicas, o que afeta diretamente a economia do produtor, visto que há redução na produção do leite e gasto com o tratamento. Além disso, o homem também pode ser acometido por essas leveduras tanto ingerindo o leite cru contaminado, quanto em contato com o solo e biofertilizante também contaminados.

A análise da população de *Candida* spp. e a identificação de outras espécies clinicamente relevantes são úteis para se conhecer melhor e avaliar o risco clínico microbiológico dos efluentes da biodigestão anaeróbia, o que pode minimizar a disseminação desses patógenos oportunistas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PECUÁRIA LEITEIRA

A pecuária brasileira contabiliza um rebanho de mais de 210 milhões de cabeças, proporcionando lucro a partir da cadeia produtiva da carne e do leite (IBGE, 2019). Na pecuária leiteira, em 2018 o número total de vacas ordenhadas no Brasil foi de mais de 16 milhões de cabeças (IBGE, 2019). O maior rebanho leiteiro está no Sudeste, com mais de 4,5 milhões de vacas ordenhadas (IBGE, 2019). A estimativa de dejetos gerados nesta região é de mais de 105 milhões de toneladas ao ano (SCHNEIDER *et al.*, 2012), já que cerca de 1.000 cabeças de gado resultam em 4.200t de resíduo sólido por dia, dependendo também, do volume de água utilizado na limpeza (MATOS, PINHEIRO *et al.*, 2017).

Neste contexto, embora a pecuária de bovinos favoreça o desenvolvimento socioeconômico do Brasil, também pode contribuir para a geração de graves problemas ambientais (FERNANDES *et al.*, 2018). A quantidade de resíduo gerada por animais em confinamento é elevada e concentrada, caso esse resíduo seja descartado no ecossistema sem tratamento prévio, seu elevado índice de matéria orgânica acarreta prejuízos irreparáveis ao ambiente (BATISTA *et al.*, 2014; NASIR *et al.*, 2014).

2.1.1 Problemas ambientais no descarte incorreto de resíduos

No Brasil a Resolução CONAMA Nº 430/2011 trata das condições que um efluente deve estar para ser lançado em corpos de água, abrangendo desde pH, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), quanto concentrações de nutrientes inorgânicos, como nitrogênio, fósforo e potássio (BRASIL, 2011).

Quando o resíduo não tratado, com alta taxa de matéria orgânica, entra em contato com um corpo d'água, eleva a DBO da água, diminuindo o oxigênio dissolvido e aumentando a concentração de sólidos suspensos e dissolvidos nela. Juntamente com a elevada taxa de DBO, pode acontecer a eutrofização do corpo hídrico, devido

aos nutrientes em excesso que estimulam o crescimento acelerado de plantas aquáticas. E ainda, pode ocorrer a proliferação de doenças veiculadas pela água (CLAUDINO, TALAMINI, 2013; DIVYA *et al.*, 2015; MENDOZA-GRIMÓN *et al.*, 2019).

Se o resíduo for lançado no solo sem nenhum tratamento prévio, eleva a emissão de gases poluentes (metano, amônia, sulfeto de hidrogênio, sulfato de hidrogênio e dióxido de enxofre), pode ocorrer à infiltração da água residuária no lençol freático, ocorre a poluição do solo com excesso de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio e ainda, os microrganismos existentes, patógenos ou não, continuam seu ciclo biológico, elevando ainda mais o risco de contaminação e propiciando a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (RAMASAMY *et al.*, 2004; BATISTA *et al.*, 2014; TASNIM; IQBAL; CHOWDHURY, 2017).

2.1.2 Disseminação de microrganismos e/ou genes de resistência no ambiente

Antimicrobianos veterinários são amplamente utilizados para tratar ou prevenir doenças e promover o crescimento do animal. A quantidade de antimicrobiano aplicada aos animais seleciona microrganismos resistentes, predominantemente, no trato gastrointestinal, o que torna o dejetos animal um potencial depósito desses microrganismos/genes de resistência a antimicrobianos (HE *et al.*, 2020; XIE, *et al.*, 2019).

O resíduo não tratado descartado em um corpo d'água ou no solo propicia o crescimento de microrganismos resistentes e ainda a transferência horizontal desses genes de resistência, o que é crucial para sua disseminação (GROS *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016). Além de tudo, esses genes apresentam baixa degradabilidade e elevada tendência em ser adsorvido por partículas do solo, ou seja, permanecem por mais tempo íntegros e capazes de se ligarem a uma nova célula (TURKER *et al.*, 2018).

Embora a maioria dos antimicrobianos usados em fazendas estejam voltados para prevenir ou controlar doenças bacterianas, como tetraciclina, sulfonamida e β -lactâmico, os autores Acosta *et al.* (2016), Erbaş *et al.* (2017) e Sartori, Santos e Marin (2014) mostraram que infecções por leveduras, principalmente *Candida* spp., também

estão entre as principais causas da mastite e o uso de antifúngicos, principalmente anfotericina B, fluconazol e nistatina, ocasiona da mesma forma a seleção de genes de resistência. A mastite é causada pelo contato do microrganismo com o teto do animal, contato este que pode ocorrer ao encostar em uma superfície ou outro animal contaminado, sendo o curso clínico da doença dependente da capacidade do microrganismo colonizar o úbere e outras regiões do animal (ACOSTA *et al.*, 2016).

Uma alternativa para o tratamento desses resíduos antes de ser descartado, tanto para estabilizar o teor de matéria orgânica e nutrientes quanto para amenizar a disseminação de microrganismos e genes de resistência a antimicrobianos, é a degradação desses resíduos em biodigestores anaeróbicos, na qual microrganismos específicos sobrevivem as condições do biodigestor e são responsáveis por degradar a biomassa em componentes mais simples, aptos para serem utilizados no solo como biofertilizante, gerando ainda um produto secundário que é o biogás (BI *et al.*, 2020; MERLIN-CHRISTY; GOPINATH; DIVYA, 2014).

2.2 BIODIGESTOR ANAERÓBIO

O biodigestor é uma estrutura física, selada com ausência de oxigênio, que possibilita a rápida decomposição da matéria orgânica por microrganismos, gerando biogás e biofertilizante líquido rico em minerais (ANDRADE; OLIVEIRA; COELHO, 2017). Por isso são amplamente utilizados como forma de tratamento de resíduos orgânicos, industriais ou rurais (MACHADO, 2016).

Ele é uma alternativa vantajosa para o tratamento da elevada quantidade de resíduos gerados em fazendas de animais confinados/semiconfinados. Além disso, seu uso favorece a sustentabilidade e integra as práticas agropecuárias, agregando valor e aumentando a produção agrícola (CARVALHO *et al.*, 2017; QUADROS *et al.*, 2010). Dessa forma vários modelos de biodigestores têm sido desenvolvidos e adaptados, para aumentar a eficiência do equipamento e do processo, além da viabilidade econômica para as propriedades rurais (ANDRADE; OLIVEIRA; COELHO, 2017; MACHADO, 2016).

Em geral os biodigestores são compostos por três partes, um tanque para acumular e permitir a digestão da biomassa, a campânula, que armazena o biogás e o motor gerador de energia elétrica. Esse sistema ainda pode ser acoplado a uma lagoa de estabilização onde, após a fermentação da biomassa, os efluentes são depositados para estabilização dos componentes químicos (ANDRADE; OLIVEIRA; COELHO, 2017).

Os biodigestores podem ter alimentação por batelada, contínua ou semi-contínua, com relação aos intervalos em que o sistema funciona. O biodigestor tipo batelada opera de forma descontínua, ou seja, a alimentação do sistema ocorre uma vez a cada ciclo. O biodigestor tipo contínuo é alimentado sucessivamente por meio de dutos de alimentação. O biodigestor semi-contínuo é abastecido em determinados intervalos de tempo (DUARTE, 2018).

O Brasil iniciou a implantação de biodigestor em 1980. Os modelos mais conhecidos são o indiano, o chinês, e o canadense, sendo ambos um sistema contínuo (ANDRADE; OLIVEIRA; COELHO, 2017). A diferença dos três modelos está principalmente na maneira como cada um foi construído e no tipo de campânula (FIGURA 1). A campânula do indiano é feita geralmente de ferro ou de fibra, sendo móvel e se ajustando de acordo com a maior ou menor produção de biogás. O chinês é um modelo de peça única, todo construído de alvenaria, sendo enterrado no solo. O canadense é um modelo que tem largura maior e uma profundidade menor do que o indiano e o chinês, por isso sua área de exposição solar é maior, o que acarreta uma maior produção de biogás. Sua campânula é de plástico maleável, que infla com a produção de gás (CALZA *et al.*, 2015; MARTÍNEZ *et al.*, 2013).

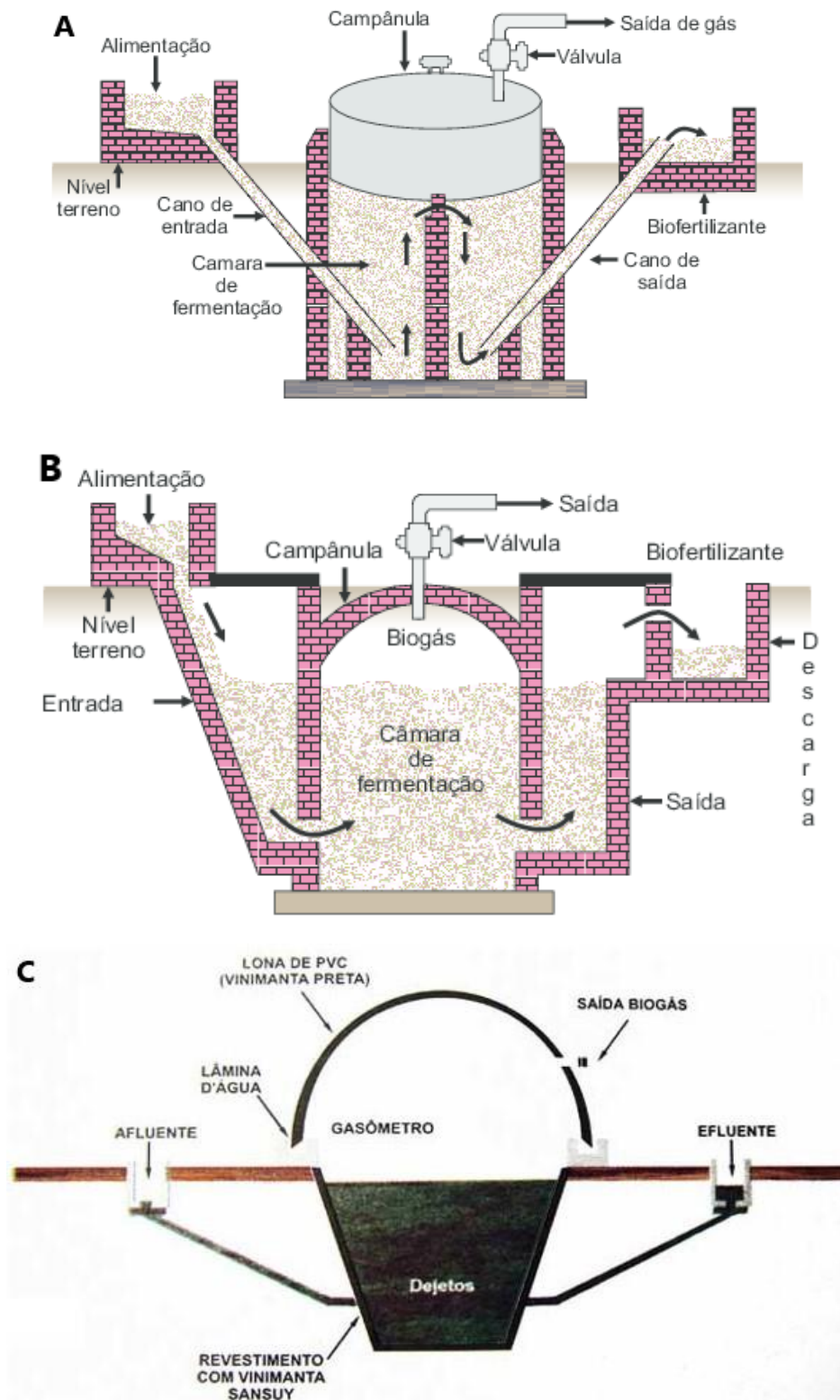


Figura 1: Modelos de biodigestor. A - Modelo Indiano; B - Modelo Chinês; C - Modelo Canadense
Fonte: Martínez *et al.* (2013).

2.3 BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

2.3.1 Etapas da biodigestão e microrganismos envolvidos

Biodigestão anaeróbia é a decomposição da matéria orgânica por microrganismos em condições de anaerobiose, com produção de biogás (60% metano, 35% dióxido de carbono e 5% de outros gases) e biofertilizante (adubo orgânico líquido rico em nutrientes) (BAWEJA, 2018; GRANDO *et al.*, 2017; MULLO *et al.*, 2018).

O processo de digestão anaeróbia está diretamente relacionado com a comunidade microbiana presente no biodigestor e nos dejetos de animais há uma enorme variedade de compostos orgânicos biodegradáveis, resultando na existência de uma comunidade microbiana diversificada. Além disso, por se tratar de um material constituído por proteínas, carboidratos e lipídeos, existem vários caminhos metabólicos possíveis, realizados principalmente por microrganismos heterotróficos (RESENDE *et al.*, 2014).

O que se sabe até hoje, é que a biodigestão é composta de quatro fases simultâneas, a hidrólise, a acidogênese, a acetogênese e a metanogênese (WANG *et al.*, 2018) (FIGURA 2). Espécies do domínio *Bacteria* participam da biodigestão desde a hidrólise até a oxidação dos intermediários. A formação de metano (CH₄) é obtida principalmente pela ação de microrganismos metanogênicos do domínio *Archea*. Assim, o equilíbrio entre a interação dos microrganismos é fundamental para a transformação contínua da biomassa em biogás e biofertilizante (FRANCISCI *et al.*, 2015; SUNDBERG *et al.*, 2013).

Dentre os filos de *Bacteria* mais encontrados no sistema de biodigestão de dejetos bovinos e suínos estão *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (ST-PIERRE; WRIGHT, 2013; WIRTH *et al.*, 2012). No domínio *Archea*, o filo comumente identificado é o *Euryarchaeota* (BAREITHER *et al.*, 2013; SUNDBERG *et al.*, 2013; WIRTH *et al.*, 2012). Contudo, a composição e abundância relativa desses microrganismos estão relacionadas ao tipo de matéria orgânica inoculada no biodigestor (WANG *et al.*, 2018).

A fase de hidrólise envolve a transformação de compostos complexos, como carboidratos, proteínas e lipídios em compostos solúveis, mais simples, aumentando a biodisponibilidade do substrato (FRANCISCI *et al.*, 2015; MANYI-LOH *et al.*, 2013). Nesta fase encontramos as bactérias aeróbias facultativas e/ou estritas, também denominadas hidrolíticas ou fermentadoras, que produzem enzimas extracelulares, como celulase, xilanase, amilase, lipase e protease, para a degradação dos compostos complexos. Os gêneros produtores de amilases e lipases mais encontrados são *Clostridium*, *Staphylococcus* e *Micrococcus*. Os principais gêneros produtores de proteases são *Bacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Proteus* e *Bacillus* (BAJPAI, PRATIMA, 2017; FRANCISCI *et al.*, 2015; SWIATCZAK; CYDZIK-KWIATKOWSKA; RUSANOWSKA, 2017).

Na fase de acidogênese, os microrganismos fermentam os produtos resultantes da fase anterior em ácido acético e em outros ácidos orgânicos, além de hidrogênio (H) e dióxido de carbono (CO₂) (FRANCISCI *et al.*, 2015; MANYI-LOH *et al.*, 2013). Aqui uma complexa comunidade de microrganismos aeróbios facultativos e/ou estritos é participante, sendo a maioria pertencentes aos gêneros *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e *Eubacterium* (BAJPAI, PRATIMA, 2017; FRANCISCI *et al.*, 2015; SWIATCZAK; CYDZIK-KWIATKOWSKA; RUSANOWSKA, 2017).

Simultaneamente a acidogênese, dá-se início à acetogênese, cuja principal função é a metabolização do ácido acético em acetato, H e CO₂ (FRANCISCI *et al.*, 2015; MANYI-LOH *et al.*, 2013). As bactérias atuantes nesta fase são anaeróbias estritas e podem ser divididas em bactérias acetogênicas, produtoras obrigatórias de H, além de produzirem também CO₂ e H₂O e bactérias homoacetogênicas, que são anaeróbias estritas e catalisam a formação de acetato a partir de CO₂ e H (FRANCISCI *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2013).

Na última fase chamada metanogênese, tanto a metabolização de H e CO₂ quanto a degradação de acetato podem produzir o CH₄, em condições estritamente anaeróbias. Sendo que cerca de 70% do CH₄ formado provêm da degradação do acetato (FRANCISCI *et al.*, 2015; MANYI-LOH *et al.*, 2013). Nesta fase estão

presentes as bactérias do domínio *Archea*, classificadas como metanogênicas e subdivididas em 2 grupos, as hidrogenotróficas, que utilizam CO₂ e H₂O para formar CH₄ e H₂O e as acetoclásticas, que produzem CH₄ e CO₂ a partir da redução do acetato (FRANCISCI *et al.*, 2015).

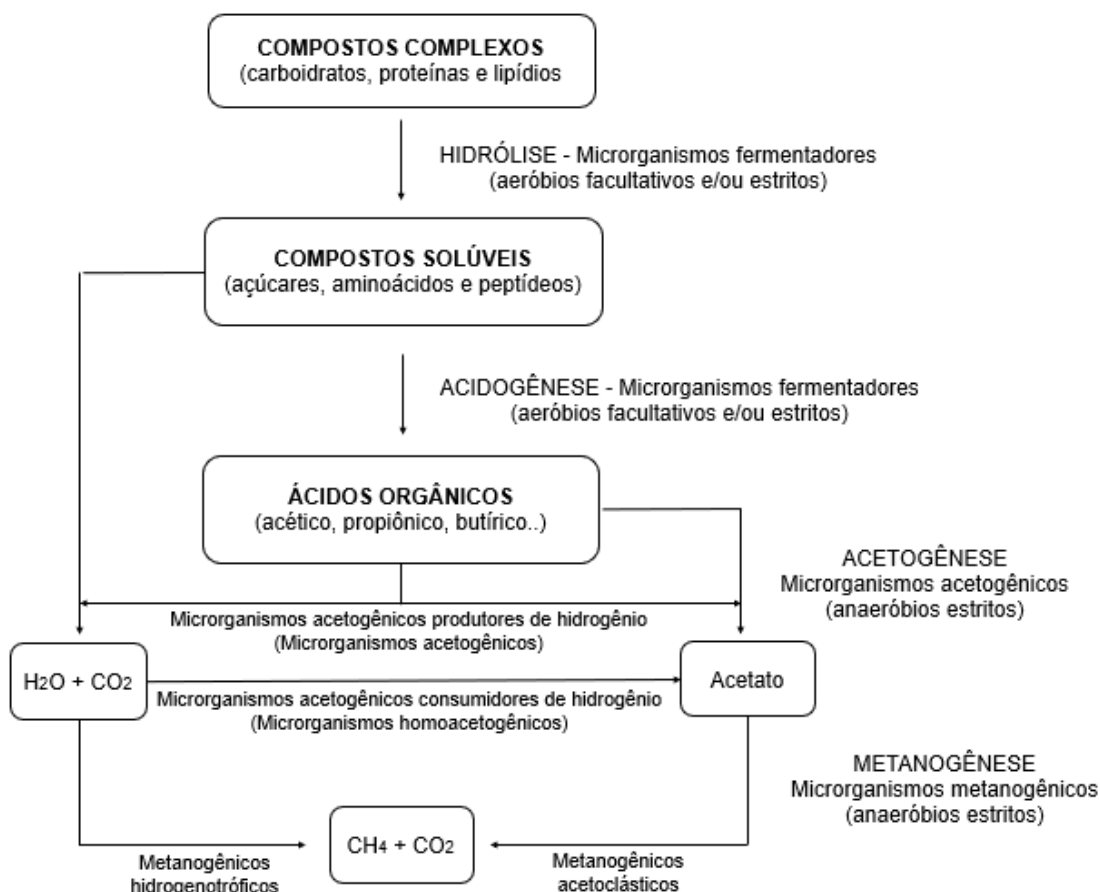


Figura 2: Esquema das etapas da biodigestão anaeróbia e os microrganismos envolvidos
Fonte: Adaptado de Chernicharo (1997).

2.3.2 Fatores que alteram o equilíbrio microbiano na biodigestão

A biodigestão anaeróbia eficiente depende do equilíbrio entre as comunidades microbianas e de condições de fermentação específicas. Os nutrientes, pH, compostos inibitórios presentes no substrato e as condições de funcionamento do biodigestor, como temperatura e tempo de retenção, influenciam diretamente o desempenho dos microrganismos (KUMAR *et al.*, 2013).

A sobrevivência dos microrganismos durante a biodigestão é dependente dos nutrientes contidos nos dejetos, que são específicos para cada espécie (WANG, P. *et al.*, 2018). A disponibilidade de carbono (C) e outros macro e micronutrientes são essenciais para todos os processos biológicos, mas devem ser oferecidos na proporção correta (KUMAR *et al.*, 2013). Dessa forma a dieta dos animais influencia diretamente o dejetos animal e a população microbiana na biodigestão, por exemplo, alimentos fibrosos necessitam de enzimas específicas (celulases, por exemplo) e acarretam lentidão ao processo de degradação (WANG, P. *et al.*, 2018).

Alterações no pH do meio podem afetar a integridade dos microrganismos envolvidos na digestão anaeróbia, ocasionando a morte ou perda de suas características originais. Além disso, grupos distintos podem ter melhor crescimento em intervalos de pH diferentes, assim, deve-se buscar uma faixa de pH apropriada que proporcione o desenvolvimento da maior parte dos microrganismos relacionados ao processo. Por exemplo, arqueas metanogênicas crescem em uma faixa de pH de 6,5 a 8,5 e as bactérias fermentadoras crescem em pH entre 4 e 8,5, então o processo de fermentação tem faixa de pH ideal na neutralidade, entre 6,8 e 7,4. Além disso, o conhecimento da comunidade microbiana envolvida no processo e dos fatores que podem alterar o pH é essencial para garantir uma fermentação bem sucedida (BOE *et al.*, 2010; KOTHARI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2013; MAO *et al.*, 2015). Leveduras do gênero *Candida* crescem em uma ampla gama de pH, entre 2 e 8, portanto apresentam alto potencial de permanência no biofertilizante (BENGELSDORF *et al.*, 2013).

Agentes químicos e físicos dificultam o processo de fermentação. Por exemplo, antimicrobianos apresentam ação bactericida/fungicida ou diminuem o metabolismo microbiano, assim como agentes de limpeza, detergentes, sanitizantes e pesticidas. Todos esses agentes inibidores de microrganismos, que por ventura possam ir para o biodigestor, devem ser evitados (BITTON G., 2005).

A temperatura é um fator diretamente relacionado ao metabolismo microbiano, sendo o maior responsável pela inativação de microrganismos (MAO *et al.*, 2015; RESENDE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018). Se a temperatura estiver acima ou abaixo da faixa ótima de desenvolvimento, os microrganismos relevantes ao processo podem

ser inibidos. Os microrganismos envolvidos na decomposição, divididos de acordo com sua temperatura de crescimento, são os psicrófilos (inferior a 20°C), mesófilos (entre 20 e 45°C) e os termófilos (entre 50 e 65°C) (KOTHARI *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2013). Existem trabalhos que indicam que a alta temperatura melhora a solubilidade de compostos orgânicos e acelera o metabolismo microbiano, mas em contrapartida, libera efeitos inibitórios aos microrganismos, como ácidos que abaixa o pH e diminui a qualidade do biofertilizante (MAO *et al.*, 2015). Temperaturas baixas são pouco usuais atualmente, principalmente pelas bactérias responsáveis pela fermentação serem inibidas em condições psicrófilas (KUMAR *et al.*, 2013; MARTÍ-HERRERO *et al.*, 2015). Embora os sistemas mesofílicos exibam melhor estabilidade do processo e maior riqueza de bactérias, eles proporcionam baixo rendimento de metano, devido ao metabolismo mais lento dos microrganismos e consequente baixa biodegradabilidade da biomassa (MAO *et al.*, 2015). Portanto, de acordo com Mao *et al.* (2015) as condições ideais para uma biodigestão anaeróbica de qualidade seriam a hidrólise em termofília e a acidogênese e metanogênese na mesofília. O Brasil é o país que apresenta condições climáticas na faixa mesofílica, o que garante que a maioria das fases da digestão anaeróbia seja em temperatura ambiente durante todo o ano (MAO *et al.*, 2015; MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017; RESENDE *et al.*, 2016).

Tempo de retenção hidráulica (TRH) é o tempo necessário para a mistura ser digerida no biodigestor, o que ocorre quando a produção de gás é máxima, definindo o ponto de melhor qualidade do biogás (MAO *et al.*, 2015; SOUZA, C. DE F. *et al.*, 2008). O TRH depende das características dos afluentes, das condições de temperatura e do tipo de biodigestor, devendo ser suficientemente longo para permitir a degradação eficiente da biomassa (BITTON G., 2005; MAO *et al.*, 2015). Em países tropicais, por exemplo, o TRH varia de 30 a 50 dias, enquanto em países mais frios pode chegar a 100 dias (KUMAR *et al.*, 2013; RESENDE *et al.*, 2016).

2.3.3 Leveduras envolvidas na biodigestão

Com relação a comunidade leveduriforme presente no processo de biodigestão, poucos relatos são encontrados na literatura, principalmente em biodigestores escala real. Os poucos estudos sobre leveduras e até mesmo fungos filamentosos, são em sua maioria voltados a uma análise inespecífica de presença ou ausência em afluentes e efluentes (MCCARTHY *et al.*, 2013; OSCAR BETANCUR *et al.*, 2016). Foi encontrado apenas um trabalho, realizado por Ravella *et al.* (2010), no Reino Unido, em que foi isolado e caracterizado a nova espécie *Cryptococcus shivajii*, a partir de biodigestor em escala laboratorial abastecido com material vegetal.

Outros autores estudam sobre o reaproveitamento de águas residuais da indústria cervejeira, as quais possuem quantidade elevada de fermento (levedura), que atua como co-substrato na biodigestão anaeróbia (EKPENI *et al.*, 2014; ZUPANČIČ; PANJIČKO; ZELIĆ, 2017). A utilização de leveduras na biodigestão anaeróbica está em ascensão, pois esses microrganismos produzem enzimas extracelulares que bactérias não são capazes, como celulases e xilanases, possibilitando uma maior degradabilidade da biomassa e melhor qualidade do biogás e biofertilizante (CHOMINI; JOSHUA, 2019; WERKNEH; BEYENE; OSUNKUNLE, 2019; SOLÉ-BUNDÓ *et al.*, 2019).

Os autores Olcay e Kocasoy (2004) estudaram o efeito da adição da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em biodigestor escala laboratorial abastecido com substrato sintético padronizado e o resultado foi o aumento da taxa de decomposição da matéria orgânica e da produção de biogás, após 40 dias de retenção hidráulica. O trabalho de Syaichurrozi *et al.* (2016) utilizou água residual de uma indústria de tofu, na Indonésia, adicionada de *Saccharomyces cerevisiae* e demonstrou que a produção de biogás foi maior quando comparado ao controle, sem adição de levedura. Já os autores Sosa-Hernández *et al.* (2016) utilizaram a água residuária de 3 tanques de cervejas distintas para avaliar a performance na produção de biogás e concluíram que ambas apresentaram bom desempenho comparado aos processos tradicionais.

Os autores Bengelsdorf *et al.* (2013) acreditam que leveduras presentes no ambiente, possam estar envolvidas no processo de biodigestão, principalmente

aquelas potencialmente patogênicas, como *Candida* spp., por apresentarem relevantes mecanismos de adaptação. Espécies do gênero *Candida* são encontradas na maioria dos ambientes e são altamente tolerantes a uma ampla gama de condições ambientais, por exemplo, ao pH entre 2 e 10 (BENGELSDORF *et al.*, 2013).

Por outro lado, é amplo o número de estudos que envolvam o isolamento de bactérias patogênicas obrigatórias ou putativas. Nesses trabalhos é possível observar que o perfil da microbiota bacteriana é diversificado e compreende diferentes potenciais patógenos humanos, como *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp. (MANYI-LOH *et al.*, 2013; MATOS *et al.*, 2017; MEZZARI *et al.*, 2017).

2.4 BIOGÁS E BIOFERTILIZANTE

2.4.1 Biogás

Para o desenvolvimento sustentável é necessário a busca, ampliação e incentivo de tecnologias que utilizem fontes renováveis de energia a baixo custo. Neste contexto, é notório o destaque da utilização de biomassa, que no ponto de vista da geração de energia, é definida como toda matéria orgânica de origem animal e vegetal, que é decomposta por efeito biológico. Sendo assim, ao contrário da energia obtida por combustíveis fósseis, é uma fonte amplamente disponível e benéfica ao acúmulo de CO₂ na atmosfera terrestre (MAO *et al.*, 2015).

O biogás é um gás natural produzido pelo processo de biodigestão da biomassa. Ele é composto por cadeias curtas de hidrocarbonetos, sendo 60% CH₄, 35% CO₂ e 5% de outros gases, podendo essas concentrações variarem (BAWEJA, 2018; GRANDO *et al.*, 2017; MULLO *et al.*, 2018).

A concentração de CH₄ presente no biogás é que determina o seu potencial energético, ou seja, o poder calorífico do gás (MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017). A produção energética do biodigestor varia em função da quantidade de resíduo gerado para abastecimento e o tipo desse resíduo (MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017).

2.4.2 Biofertilizante

O biofertilizante é o efluente resultante da digestão da biomassa em biodigestor anaeróbio, que promove o aumento da produtividade agrícola, com redução da necessidade de fertilizantes comerciais (ABUBAKER; RISBERG; PELL, 2012; LUSTE; HEINONEN-TANSKI; LUOSTARINEN, 2012).

O seu reconhecimento como insumo agrícola ocorreu pelo decreto 4.954, de 14 de janeiro de 2004 (BRASIL, 2004) onde biofertilizante é definido como um “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre toda ou parte da planta cultivada, elevando sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”.

O método de preparo, o tempo de decomposição (TRH), a população microbiana, a temperatura, o pH e, principalmente, o substrato utilizado, interferem na composição química do biofertilizante. Em geral o biofertilizante contém células de microrganismos, metabólitos (proteínas, enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos) e compostos orgânicos. À medida que ocorre a estabilização do biofertilizante, há a redução desses metabólitos, permanecendo apenas os nutrientes minerais (ABDULKARIM *et al.*, 2019).

A aplicação do biofertilizante promove o aumento da produtividade agrícola, principalmente pelo fato da digestão da biomassa diminuir drasticamente o teor de carbono nas formas de CH₄ e CO₂. Com isso, há um aumento do teor de nitrogênio e demais nutrientes. Assim, microrganismos do solo conseguem fixar melhor o N, além de o próprio biofertilizante conter alguns nutrientes solubilizados (ABDULKARIM *et al.*, 2019; WALSH *et al.*, 2012).

Além disso, tem a capacidade de retenção de umidade no solo, favorecendo o crescimento das plantas no período de seca, aumenta a velocidade de decomposição dos microrganismos, facilitando a assimilação dos nutrientes pelas plantas e controla doenças em plantas por antibiose (presença de substâncias inibitórias em sua composição) (WALSH *et al.*, 2012).

O trabalho de Walsh *et al.* (2012) relatou que o solo em que foi aplicado o biofertilizante produzido a partir de dejetos bovinos leiteiros, aumentou cerca de 25%

o rendimento da planta, em comparação com o grupo controle. Os autores Oliveira *et al.* (2018) também mostraram que a aplicação de biofertilizante de dejetos bovinos aumentou a produção e a produtividade de maracujazeiro. Outro trabalho que mostrou a melhoria nas características das plantas adubadas com biofertilizante de dejetos bovinos foi conduzido pelos autores Soares Filho *et al.* (2018), em que adubaram a forragem de capim mulato II em condições controladas de crescimento na Universidade Estadual de São Paulo.

O biofertilizante de dejetos bovinos também foi relatado por Matos *et al.* (2017) como um potencial adubador orgânico, visto que, possui menor condutividade elétrica, menor teor de sódio e teor de nutrientes adequados.

2.4.2.1 Microrganismos potencialmente patogênicos em biofertilizantes

A infectividade é a capacidade de um agente causar uma infecção. Patogenicidade é a capacidade de o agente causar uma doença, pois os microrganismos podem ser eliminados pelo sistema imune sem o hospedeiro apresentar nenhum sinal ou sintoma. Virulência é a capacidade de um agente gerar uma doença grave ou fatal. A denominação virulência é atribuída ao conjunto dos fatores microbianos que podem agredir o hospedeiro. Os fatores de virulência incluem, dentre outros, a capacidade de adesão ou invasão e ainda o poder de fuga do sistema imune, por inibição da fagocitose ou mesmo pela capacidade de sobrevivência intracelular. A resistência a antibióticos também pode ser vista como um fator de virulência, já que complica o tratamento médico de uma infecção microbiana (DIARD; HARDT, 2017).

A aplicação do biofertilizante no solo apresenta inúmeros benefícios, mas é de suma importância a avaliação da persistência de microrganismos potencialmente patogênicos. Dentre os fatores que possibilitam a eliminação de possíveis patógenos, a temperatura e o tempo de retenção são peças-chaves (MAHANTY *et al.*, 2017; MASSÉ; GILBERT; TOPP, 2011). Vários estudos têm verificado a presença e persistência de patógenos importantes nos efluentes gerados pelos biodigestores (MASSÉ; GILBERT; TOPP, 2011; ABDULKARIM *et al.*, 2019).

Em um trabalho realizado na Suécia por Bagge *et al.* em 2005, os efluentes de 4 biodigestores, em escala real, alimentados com resíduos bovinos e lácteos, apresentaram *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp e bactérias esporuladas, como *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp, após a pasteurização e biodigestão.

Um estudo feito por García-Feliz *et al.* (2007) na Espanha, determinou a prevalência de *Salmonella* entérica em biofertilizante de dejetos suínos. *Salmonella* spp. é predominante em efluentes, pois estão no meio ambiente e além disso é excretada por pelo menos 0,1% da população animal (VENGLOVSKY; MARTINEZ; PLACHA, 2006).

O gênero *Clostridium* é bem difundido em sistemas de produção de biogás, pois realiza as primeiras etapas da digestão anaeróbia. Este gênero compreende alguns agentes patogênicos importantes, como *C. botulinum*, *C. difficile*, *C. perfringense* e *C. tetani*. Diante deste fato Bagge, Persson e Johansson (2010) em diferentes fazendas de bovinos leiteiros, na Suíça, identificaram a presença do *Clostridium botulinum* nos dejetos de animais que iriam alimentar os biodigestores, correlacionando a propagação desse patógeno nos efluentes.

Em maio de 2011, na Alemanha, um surto de *Escherichia coli* enterohemorrágica O104:H4 foi um exemplo de uma doença de origem alimentar. Cerca de 3.800 pacientes foram infectados e sofreram de gastroenterite aguda. Estudos epidemiológicos e de vigilância foram realizados e conduziram à hipótese de que os vegetais fertirrigados poderiam estar envolvidos na propagação de bactérias patogênicas (ALTMANN *et al.*, 2011; EIKMEYER *et al.*, 2013).

Os autores Alfa *et al.* (2014) encontraram os gêneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Shigella* e *Salmonella* em biofertilizante produzido a partir de dejetos bovinos.

No trabalho de Resende *et al.* em 2014, no Brasil, foi avaliado a persistência de grupos microbianos potencialmente patogênicos, em biodigestor escala laboratorial abastecido com dejetos bovinos. Neste trabalho os grupos mais prevalentes, após 60 dias de TRH, foram os cocos Gram positivos catalase negativo e bactérias Gram negativas não fermentadoras.

Em outro trabalho realizado também por Resende *et al.* em 2014 no Brasil, foi avaliado por metagenômica a persistência de patógenos em biofertilizante de dejetos bovinos em biodigestor escala laboratorial, sendo que os gêneros mais identificados foram *Clostridium*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas*. Mas outros gêneros potencialmente patogênicos como *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Vibrio*, também foram identificados.

Do exposto, é notável o maior conhecimento da prevalência e dinâmica de bactérias clinicamente relevantes. Porém, para um controle microbiológico eficaz é necessário conhecer também a microbiota leveduriforme, principalmente pelo potencial risco patológico que apresentam (MCCARTHY *et al.*, 2013).

2.5 O GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* compreende cerca de 200 espécies, porém apenas 15 são consideradas patogênicas, sendo elas *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis* (MCCARTHY *et al.*, 2013; NIGAR *et al.*, 2016). As cinco principais espécies patogênicas de *Candida*, de acordo com Douglass *et al.* (2018), na ordem de prevalência em todo o mundo são, *C. albicans* (52%), *C. glabrata* (21%), *C. tropicalis* (14%), *C. parapsilosis* (9%) e *C. krusei* (2%).

A espécie do gênero *Candida* comumente isolada e relacionada como o principal agente causador da candidíase é a *C. albicans*, contudo, espécies não-*albicans* estão sendo crescentemente relatadas, como, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (CLANCY; NGUYEN, 2018; KAUR *et al.*, 2016). Nas últimas décadas a prevalência combinada de espécies de *Candida* não-*albicans* superou as infecções por *Candida albicans* em várias regiões geográficas em todo o mundo, destacando a necessidade de aprofundar os estudos e evitar surtos futuros (TÓTH *et al.*, 2019).

Além dessas espécies já conhecidas, está emergente uma nova espécie conhecida como *Candida auris*, que teve seu primeiro relato em 2009 no Japão e hoje

já está bem difundido no mundo, sendo encontrado em todos os continentes e mais de 40 países (JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018; MEIS; CHOWDHARY, 2020).

As leveduras do gênero *Candida* vivem como comensais aos humanos e dessa forma, alterações metabólicas ou imunológicas no hospedeiro podem proporcionar um distúrbio no crescimento dessas leveduras ou ainda sua translocação (MESINI *et al.*, 2017; HIRAYAMA *et al.*, 2020). Além dos humanos, esse gênero vive em comensalismo, principalmente, na cavidade oral e no trato digestivo de animais como vacas e boi (DALVAND *et al.*, 2018).

A espécie *C. albicans* pode ser encontrada principalmente nas mucosas oral, vaginal e gastrointestinal e também na pele, sendo a espécie mais bem estudada e conhecida do gênero (MCMANUS; COLEMAN, 2014; NAGLIK *et al.*, 2017). *C. glabrata* já foi encontrada colonizando a boca, o esôfago, o intestino e a mucosa vaginal, porém, pouco dessa interação com o hospedeiro é conhecida e estudada, o que se sabe até o momento é que pode ocorrer uma interação com as hifas produzidas por *C. albicans*, facilitando sua interação com o hospedeiro (ROETZER; GABALDÓN; SCHÜLLER, 2011; GABALDÓN; GÓMEZ-MOLERO; BADER, 2019). *C. tropicalis* já foi isolada da pele, tratos gastrointestinal e urinário e também do trato respiratório, sendo a não-*albicans* mais relacionada a casos de mortalidade (BASU *et al.*, 2003; BIASOLI; TOSELLO; MAGARÓ, 2002; EKPENI *et al.*, 2014; HIRAYAMA *et al.*, 2020). *C. parapsilosis* está presente principalmente na pele e mãos (ROETZER; GABALDÓN; SCHÜLLER, 2011; TÓTH *et al.*, 2019). *C. krusei* é a espécie menos estudada e apesar de ser incomum na microbiota humana normal pode ser transportada via intestino por indivíduos saudáveis (DOUGLASS *et al.*, 2018; NAVARRO-ARIAS *et al.*, 2019).

Além de tudo, essas leveduras são ubíquas (COOPER, 2011; CLANCY; NGUYEN, 2018). Tendo espécies isoladas do solo, ambientes marinhos, fezes de aves e mamíferos e insetos (DOUGLASS *et al.*, 2018; LORLIAM *et al.*, 2013; PONGSANAT; MIYUKI, 2018).

A candidíase é o processo patológico caracterizado pela infecção micótica da levedura *Candida* spp. Essa infecção pode se dar na forma superficial, acometendo a pele, unhas e mucosas e também sob a forma invasiva/sistêmica/candidemia, na qual

os fungos atingem a corrente sanguínea do hospedeiro e chegam até os órgãos internos (CLANCY; NGUYEN, 2018; INGHAM *et al.*, 2012; PANWAR; FAUJDAR, 2016; PEIXOTO *et al.*, 2014; SILVA, SÓNIA *et al.*, 2012; FRASER *et al.*, 2020).

A candidíase oral e a vulvovaginal são as manifestações superficiais mais comuns, em que apesar de não serem infecções graves, prejudicam a qualidade de vida do hospedeiro e em pacientes imunossuprimidos são a porta de entrada para a disseminação sistêmica da infecção (RUIZ; PEREIRA, 2016; WILLEMS *et al.*, 2020). A candidemia é frequente em pessoas que apresentam as barreiras mucosas e cutâneas comprometidas e que de certa forma tiveram o equilíbrio hospedeiro-patógeno comprometido, como queimados, aqueles que passaram por procedimentos médicos invasivos, imunocomprometidos (uso de medicamentos imunossupressores ou estão acometidos por alguma doença imunossupressora) e prematuros (CLANCY; NGUYEN, 2018; COLOMBO *et al.*, 2013; NUCCI *et al.*, 2012). Essa forma invasiva da candidíase apresenta alta taxa de mortalidade, chegando à 60%

A principal forma de transmissão é endógena, na qual as espécies de *Candida* que fazem parte da microbiota do hospedeiro tornam-se patógenos oportunistas. Mas a transmissão também pode ser exógena, principalmente por meio de mãos e materiais contaminadas (CLANCY; NGUYEN, 2018; COLOMBO *et al.*, 2013; INGHAM *et al.*, 2012; KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

2.5.1 Fatores de virulência

O gênero *Candida* compreende patógenos importantes devido a sua grande versatilidade e capacidade de adaptação para sobrevivência em vários sítios anatômicos (CALDERONE; FONZI, 2001; STANISZEWSKA, 2020). Antigamente acreditava-se que a imunossupressão era o único fator responsável pelas infecções oportunistas por *Candida*, entretanto hoje é sabido que estes microrganismos participam ativamente da fisiopatologia da doença, por meio de seus fatores de virulência, como aderência, formação de biofilmes, dimorfismo, secreção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas) e comutação fenotípica. Estes

fatores são melhores conhecidos em *C. albicans* (STANISZEWSKA, 2020; TAMURA *et al.*, 2007; AHMED *et al.*, 2019).

a) Adesão e formação de biofilme

O processo de adesão é induzido e controlado por várias vias de sinalização celular, no patógeno e no hospedeiro (HO *et al.*, 2019). A fixação inicial das células de *Candida* aos tecidos e/ou superfícies é mediada por fatores inespecíficos (hidrofobicidade e forças eletrostáticas) e promovida por adesinas específicas, presentes na superfície das células fúngicas, que reconhecem ligantes como proteínas, fibrinogênio e fibronectina e também medeiam a adesão às superfícies abióticas (EL-KIRAT-CHATEL *et al.*, 2020; HO *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2018). O processo de adesão é um importante mecanismo pois possibilita à célula microbiana uma maior ligação ao hospedeiro, sendo o passo inicial para a formação de biofilme (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; NETT; ANDES, 2020).

Assim como em outros patógenos microbianos, a capacidade das leveduras do gênero *Candida* formarem biofilme em superfícies hospedeiras é um diferencial para a colonização bem sucedida e sua persistência durante a infecção, visto que a maioria das infecções por espécies de *Candida* está associada a essa capacidade (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; GULATI; NOBILE, 2016; NETT; ANDES, 2020). O crescimento em biofilme permite aos microrganismos a sobrevivência em ambientes hostis, especialmente devido à sua maior tolerância aos antimicrobianos (NETT; ANDES, 2020; TAFF *et al.*, 2013). Além disso a vida dentro de um biofilme também inclui proteção contra o meio ambiente, resistência a estresses físicos e químicos, cooperação metabólica e regulação conjunta da expressão gênica dos microrganismos associados e ainda há estudos que comprovam redução na morte pelo sistema imunológico do hospedeiro (AHMED *et al.*, 2019).

Essas estruturas de crescimento formam-se por meio de um processo sequencial que inclui a aderência das células de levedura ao substrato, a proliferação das leveduras, a formação de hifas na parte superior do biofilme, o acúmulo de matriz

extracelular e, finalmente, a dispersão de leveduras deste complexo (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016)

Dessa forma, os biofilmes são comunidades de microrganismos que se desenvolvem em superfícies vivas ou inertes, sob uma matriz extracelular polissacarídica, formando uma arquitetura tridimensional complexa (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016; NETT; ANDES, 2020).

Essa matriz extracelular é composta basicamente por proteínas (55%), carboidratos (25%), lipídios (15%) e DNA (5%) (NETT; ANDES, 2020). A função dos polissacarídeos já é bem definida como uma estrutura complexa de sustentação da matriz, já as proteínas, estudos iniciais apontam que além de também estarem envolvidas com a sustentação, atuam no metabolismo de degradação de biopolímeros extracelulares para obtenção de energia (NETT; ANDES, 2020). Com relação a porção lipídica e de ácidos nucleicos da matriz, pouco se tem estudado (NETT; ANDES, 2020).

Os biofilmes maduros são muito mais resistentes aos agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro em comparação com as células planctônicas. Os fatores responsáveis pela elevada resistência incluem a complexa arquitetura dos biofilmes, a matriz protetora, o aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas e a plasticidade metabólica, e ainda a dispersão de leveduras do biofilme contribuem diretamente para a virulência, sendo as células dispersas mais virulentas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; GULATI; NOBILE, 2016; NETT; ANDES, 2020).

b) Enzimas extracelulares hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *Candida* desempenham um papel importante na nutrição, aderência, dano, invasão e destruição dos tecidos e sistema imunológico do hospedeiro (AKINJOGUNLA; AJAYI; NKANGA, 2018; GARG *et al.*, 2018). As principais classes enzimáticas produzidas são as proteases, lipases e hemolisinas (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017).

As proteases ou proteases aspárticas segregadas (Saps) são responsáveis por degradarem proteínas do tecido hospedeiro e se aderirem ao tecido epitelial. Além

disso, também degradam proteínas relacionadas à defesa imunológica dos hospedeiro, como os anticorpos, permitindo que o fungo escape da primeira linha de defesa (AHMED *et al.*, 2019).

As lipases degradam um dos principais constituintes das membranas celulares, os fosfolipídios, induzindo a permeabilização e morte das células hospedeiras (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017). Além disso degradam lipídios para aquisição de nutrientes, adesão aos tecidos hospedeiros, interações sinérgicas com outras enzimas, hidrólise inespecífica e início de processos inflamatórios, provocando células do sistema imunológico e autodefesa (AHMED *et al.*, 2019).

A produção de hemolisina está relacionada com a aquisição de ferro que favorece o estabelecimento do processo infeccioso (ELLEPOLA *et al.*, 2015). Essas enzimas promovem a lise dos glóbulos vermelhos, destruindo sua membrana celular, liberando a hemoglobina que é usada pelas células fúngicas como nutriente para promover seu crescimento e desenvolvimento. Além disso, facilitam a disseminação de *Candida* spp. através da corrente sanguínea (RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017). Contudo, comparado com outras enzimas, a hemolisina é a menos estudada, com poucas pesquisas enumerando sua atividade.

c) Dimorfismo

O dimorfismo em *Candida* também está relacionado à virulência, pois o desenvolvimento de hifas ou pseudohifas desempenha uma função importante na invasão e penetração do tecido e também aumenta a resistência à fagocitose (BOMMANAVAR; GUGWAD; MALIK, 2017; KORNITZER, 2019)

A transição que separa células leveduriformes das formas filamentosas é regulada por uma série de fatores ambientais. O crescimento na forma leveduriforme, por exemplo, ocorre predominantemente com pH ácido (<6), enquanto que em pH neutro/alto (>7) o crescimento é predominantemente na forma filamentosa. Outros estímulos ambientais conhecidos por promover a produção de hifas são a falta de carbono, falta de nitrogênio, baixo oxigênio e CO₂ elevado e a presença de N-acetilglucosamina (HUANG, G., 2012; KIM; SUDBERY, 2011; KORNITZER, 2019).

Embora a maioria das espécies de *Candida não-albicans* só consiga formar pseudohifas, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. auris* também são capazes de formar hifas verdadeiras, embora com menos eficiência e sob uma faixa mais restrita de condições ambientais (KORNITZER, 2019).

2.5.2 Tratamento e Resistência

As classes de antifúngicos utilizadas no tratamento de infecções por *Candida* mais comuns compreendem os azóis, os polienos e as equinocandinas. Lembrando que a detecção do tipo e local de infecção e a identificação do agente infectante e sua susceptibilidade a antifúngicos são fundamentais para escolher a estratégia farmacológica adequada ao tratamento, de forma que se possa controlar e extinguir a infecção com o mínimo de danos ao paciente, buscando também minimizar os custos e evitar o aparecimento de cepas resistentes (PAPPAS *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2017).

Durante o desenvolvimento fúngico, um dos processos mais importantes é a biossíntese do ergosterol, que é um componente fundamental na constituição da membrana dos fungos. Dessa forma, alguns antifúngicos atuam diretamente no ergosterol ou interrompendo sua síntese, em alguma fase da cascata, para conter a replicação fúngica (PAPPAS *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2017)

Os antifúngicos azólicos são compostos por moléculas sintéticas diferenciadas de acordo com seu núcleo que pode ser imidazólico (exemplos: cetoconazol e miconazol) ou triazólico (exemplos: fluconazol, voriconazol e itraconazol). Essa classe atua inibindo a via de biossíntese do ergosterol, componente específico da membrana fúngica, resultando na alteração da fluidez da membrana e comprometendo o crescimento fúngico (MARTÍNEZ-MATÍAS; RODRÍGUEZ-MEDINA, 2018; MUSIOL; KOWALCZYK, 2012).

Os polienos mais comuns são a anfotericina B e a nistatina. Sendo que a nistatina é utilizada no tratamento de infecções superficiais e a anfotericina B é considerada uma das opções chave para o tratamento de candidíase disseminada (JANOUT *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2017). Essas moléculas se ligam ao ergosterol

da membrana celular e formam canais transmembranares que aumenta a permeabilidade da membrana e ocasiona a liberação do conteúdo interno da célula, alteração da sua homeostase e sua morte. A anfotericina B apresenta baixa resistência antifúngica, mas pode interagir com o colesterol presente na membrana da célula humana e provocar efeitos colaterais graves como a nefrotoxicidade (COLOMBO *et al.*, 2013).

As equinocandinas, como a caspofungina e micafungina, são importantes alternativas no tratamento de infecções por *Candida*. Essas moléculas são lipopeptídeos sintéticos modificados a partir de substâncias proveniente de fungos filamentosos. Elas atuam inibindo a síntese de 1,3-β-D-glucana, polímero de função estrutural fundamental na parede celular, acarretando a ruptura da parede e a morte celular de cepas de *Candida* resistentes aos azólicos e polienos. Além de sua notável atividade antifúngica, essa classe produz menos efeitos adversos que anfotericina B no tratamento de candidíase sistêmica (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015).

Os antifúngicos azólicos são amplamente utilizados, principalmente por terem baixo efeito tóxico ao hospedeiro (PFALLER *et al.*, 2010), contudo algumas espécies não-*albicans*, como *C. krusei*, exibem resistência intrínseca a essa classe (GONG, X. *et al.*, 2016; WHALEY *et al.*, 2017) e, além de tudo, é crescente o desenvolvimento de resistência em espécies antes susceptíveis (FOTHERGILL *et al.*, 2014; WHALEY *et al.*, 2017).

No trabalho de Doi *et al.* (2016) foi estudado isolados de *Candida* de 16 hospitais distribuídos geograficamente pelo Brasil e eles encontraram quatro cepas de *C. glabrata* resistente a fluconazol. O estudo realizado por Autmizguine *et al.* (2018) avaliou isolados de *Candida* a partir de pacientes neonatais e encontrou duas cepas de *C. albicans* e uma *C. glabrata* resistente ao fluconazol.

Os autores Aigner *et al.* (2017) avaliaram 104 isolados de *Candida* spp. de um Centro Médico da Áustria e nenhum foi resistente à caspofungina e micafungina. Em uma análise realizada pelos autores McCarty *et al.* (2018) entre os anos de 2005 e 2015 de 3.876 isolados de *Candida*, eles encontraram apenas 33 cepas com susceptibilidade reduzida à micafungina.

Como a anfotericina B é o mais usual tratamento para candidemia, o estudo de Benjamin *et al.* (2018) comparou sua atividade antifúngica com a micafungina, ambos tratamentos intravenosos em bebês com mais de 120 dias, e o resultado mostrou que ambos os agentes foram eficazes e bem tolerados.

2.5.3 Relevância clínica

Esse gênero está sendo estudado exaustivamente nos últimos anos, principalmente pela sua importância clínica e o aumento de infecções fúngicas ocasionadas por ele. Esse aumento pode ser relacionado ao uso de medicamentos imunossupressores, procedimentos cirúrgicos invasivos e também à utilização indiscriminada de antifúngicos de amplo espectro (KOUTSERIMPAS *et al.*, 2019; NASIR *et al.*, 2014; PANWAR; FAUJDAR, 2016).

Investigações epidemiológicas realizadas nos Estados Unidos e na Europa demonstraram que, desde a década de 80, as leveduras do gênero *Candida* foram responsáveis por 85% dos casos de fungemia, sendo a quarta causa mais comum nessas regiões (PAPPAS *et al.*, 2018; QUINDÓS, 2014). No Brasil, segundo Doi *et al.* (2016), *Candida* é a sétima causa mais prevalente em infecções sanguíneas.

No Brasil, os autores Wille *et al.* (2013) conduziram um estudo epidemiológico de 388 casos de candidemia e concluíram que *C. tropicalis* foi a espécie não-*albicans* de maior prevalência. Tal fato se repetiu no estudo de Xisto *et al.* (2017). Já *C. glabrata* mostrou-se a espécie não-*albicans* mais predominante em outras partes do mundo (AZIE *et al.*, 2012; LORTHOLARY *et al.*, 2014; MILAZZO *et al.*, 2014; PFALLER, MICHAEL *et al.*, 2013).

Em 2008, no Japão, ocorreu a primeira descrição do patógeno *Candida auris* como agente da candidemia em humanos. Desde então essa nova espécie já foi relatada na candidíase invasiva em estudos por todo o mundo. Essa espécie é considerada um patógeno emergente, multirresistente e associada a elevadas taxas de mortalidade, visto que há estudos comprovando sua resistência a azóis, polienos e equinocandinas. Além disso apresentam todos os principais fatores de virulência encontrados no gênero *Candida*, como aderência, formação de biofilme e produção

de exoenzimas (CHAABANE *et al.*, 2019; JEFFERY-SMITH *et al.*, 2018; MEIS; CHOWDHARY, 2020; NETT, 2019).

Além dos humanos, animais como vacas, porcos, aves, cachorros e gatos também são suscetíveis às infecções fúngicas por *Candida* spp., sugerindo que os animais podem ser vetores de transmissão ou reservatório de cepas que causam doenças em humanos e um risco para pacientes imunocomprometidos (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2020; EDELMANN; KRÜGER; SCHMID, 2005). Além disso, os autores Dalvand *et al.* (2018) afirmam que cepas isoladas de animais não diferem molecularmente de cepas isoladas de humano e que isso merece atenção devido à alta chance de transferência cruzada cepas de *Candida*, tanto do homem para o animal quanto do animal para o homem.

O trabalho de Edelmann, Krüger e Schmid (2005) avaliou a diferença genética entre os isolados de *Candida* obtidos de pacientes diagnosticado com candidemia e isolados de diversos animais (gato, cachorro, porco, entre outros) oriundos de um banco de dados da Alemanha e conclui que não houve diferença genética específica entre os isolados, mostrando que a barreira de transmissão entre humano e animal pode ser facilmente superada.

Castelo-Branco *et al.* (2020) verificou a resistência de isolados de *Candida* obtidos a partir de diversos animais, como aves e cães, mostrando que houve elevada resistência ao fluconazol pelas espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*, o que os autores consideram interessante pois o uso de antifúngico não é tão comum na prática veterinária e opinou que tais resistências possam ser devido a transferência horizontal de genes de resistência.

Os autores Erbaş *et al.* (2017) e Campos, Valente e Avancini (2016) relatam que a mastite causada pelo gênero *Candida*, mesmo que em menor taxa que a mastite bacteriana, têm aumentado nos últimos anos, sendo causada por espécies patogênicas oportunistas que colonizam o úbere da vaca ou ainda pelo uso abuso de antibacteriano e falta de higiene, que favorecem a colonização dessa levedura.

Um estudo recente realizado por Du *et al.* (2018) obteve 60 isolados a partir de vacas diagnosticadas com mastite, dentre eles a espécie mais prevalente foi *C. krusei*, sendo que todos os isolados dessa espécie eram resistente ao fluconazol,

fluorocitosina, itraconazol e cetoconazol e 14,3% resistente a anfotericina B. Já no trabalho de Erbaş *et al.* (2017) *C. tropicalis* foi a espécie predominante mas nenhuma cepa foi resistente a anfotericina B. Em ambos os trabalhos a segunda espécie predominante foi *C. parapsilosis*.

Contudo as principais espécies patogênicas oportunistas de *Candida* já foram encontradas em estudos envolvendo mastite fúngica (ACOSTA *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2016; COSTA, GERALDO MARCIO DE *et al.*, 2012; DU *et al.*, 2018). Além disso, Sartori, Santos e Marin (2014) relatam que espécies de *Candida* são observadas no úbere e em leite de vacas mesmo sem a infecção fúngica.

2.6 MODELO DE INFECÇÃO INVERTEBRADO – *Caenorhabditis elegans*

Compreender os mecanismo de interação entre o patógeno e o hospedeiro permite um maior conhecimento sobre doenças associadas aos microrganismos (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013), além disso os aspectos fisiológicos das infecções podem ser entendidos e levar ao entendimento dos fatores de virulência e possíveis alvos terapêuticos e antifúngicos (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013; HUANG *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2018).

Para entender essa interação é necessário modelos animais para *estudos in vivo*. Na maioria dos estudos são utilizados modelos vertebrados mamíferos, como (como camundongos e coelhos), devido às semelhanças fisiológicas com o homem (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013). Contudo, há dificuldades relacionados à questões éticas, dificuldade de manuseio, manutenção e tratamento e também ao longo tempo exigido para o estudo (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

Diante disso os modelos de infecção invertebrados surgiram como alternativa, que mesmo sendo distantes dos mamíferos em relação à evolução, apresentam similaridade de genes relacionados a imunidade inata (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

O nematoide *Caenorhabditis elegans* é atualmente o organismo invertebrado mais amplamente utilizado na avaliação de diferentes parâmetros de infecções

fúngicas (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; HUANG *et al.*, 2014; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011; SOUZA *et al.*, 2018; YILMAZ; WALHOUT, 2017).

Caenorhabditis elegans é um nematoide de vida livre encontrado no solo de regiões temperadas, de fácil manipulação e cultivo e sua biologia molecular bem descrita (DIOGO; BRATANICH, 2014; ZHANG; HOU, 2013). A aplicação do *C. elegans* na pesquisa/saúde é extremamente abrangente, envolvendo estudos com o ciclo celular, da apoptose, de regulação gênica, de funções metabólicas, na determinação do sexo, na toxicidade de compostos, relacionados ao câncer, da funcionalidade da sinalização e da polaridade celular e com doenças neurodegenerativas (KALETTA; HENGARTNER, 2006; OKOLI *et al.*, 2009). Com isso, ele é amplamente utilizado na avaliação da patogenicidade e fatores de virulência de microrganismos, como modelo de infecção invertebrado, principalmente por não envolver conselho de ética e burocracias (FÉLIX; BRAENDLE, 2010; KALETTA; HENGARTNER, 2006; STERKEN *et al.*, 2015).

As características que o tornam um modelo de infecção favorável são, seu ciclo de vida rápido, simplicidade fisiológica, produção de descendentes geneticamente idênticos (auto-fertilização), a transparência da sua cutícula que permite a observação direta dos processos que se passam dentro do nematódeo, tem genoma completamente sequenciado e é de fácil e econômico cultivo (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

O *C. elegans* se alimenta da bactéria *E. coli* OP50, sendo essa sua fonte primária de macronutrientes (MARSH; MAY, 2012). O seu tamanho gira em torno de 1,5mm, o que facilita seu armazenamento (KALETTA; HENGARTNER, 2006; YILMAZ; WALHOUT, 2017). O ciclo de vida, entre a transição do ovo para o adulto em temperatura entre 15 e 15°C, é de apenas três dias, compreendendo quatro fases larvais (L1, L2, L3 e L4). A reprodução ocorre por dimorfismo, sendo que a grande maioria dos nematódeos são hermafroditas e apenas a menor parcela corresponde aos machos (KALETTA; HENGARTNER, 2006; MARSH; MAY, 2012). Além de tudo, apresenta uma estrutura transparente, facilitando a observação de suas estruturas no

microscópio e também possibilita o uso de fluorescência para a avaliação de marcadores específicos (DIOGO; BRATANICH, 2014).

Como dito anteriormente, o *C. elegans* possui o genoma completamente sequenciado, sendo constituído por cerca de 20.000 genes com 60 a 80% de similaridade com os genes humanos. Além disso, a maior parte do DNA é conservada e associada a doenças humanas e vias de infecção (KALETTA; HENGARTNER, 2006).

Devido as características citadas o *C. elegans* está cada vez mais sendo estudado e se tornando um modelo invertebrado ideal para estudos *in vivo* de alvos diversificados, como doenças infecciosas, resposta imunológica, virulência de microrganismos e resposta de novos antimicrobianos (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013; KALETTA; HENGARTNER, 2006).

A interação do *C. elegans* com os patógenos ocorre, principalmente, através da alimentação, pela faringe e intestino (KALETTA; HENGARTNER, 2006; MARSH; MAY, 2012). Contudo, espécies de bactérias e fungos tem capacidade de aderir à cutícula do verme e invadir seus tecidos, com suas hifas/pseudohifas (ENGELMANN; PUJOL, 2010). O controle das infecções se dá pelo sistema imune inato, pela liberação de moléculas com ação antimicrobiana, como lecitinas, lisozimas e peptídeos antimicrobianos, localizado principalmente nas células intestinais (MARSH; MAY, 2012).

Como *C. elegans* é cultivado sob alimentação normal de *Escherichia coli* OP50, para que seja utilizado em ensaios de infecção, é transferido para meio de cultura contendo o fungo de interesse, o qual é ingerido pelo verme (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

A utilização do modelo invertebrado *C. elegans* é extremamente vantajosa, visto que pode auxiliar em estudos iniciais, com baixo custo e de rápida execução. Contudo, os modelos invertebrados não substituem o uso de mamíferos, mas devem ser utilizados em conjunto, como em estudos e testes primários (ARVANITIS; GLAVIS-BLOOM; MYLONAKIS, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial risco de *Candida* spp. isoladas do sistema de tratamento de dejetos da pecuária leiteira com biodigestor anaeróbico para a saúde humana e animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar presuntivamente leveduras do gênero *Candida* do afluente, efluente e biofertilizante;
- Determinar a densidade populacional de *Candida* spp. no sistema de biodigestão anaeróbia;
- Avaliar a dinâmica populacional de *Candida* spp. durante o processo de digestão anaeróbia;
- Determinar a eficiência do sistema quanto a taxa de remoção de *Candida* spp. pelo processo anaeróbio;
- Avaliar a virulência *in vitro* dos isolados: dimorfismo, formação de biofilme e produção de exoenzimas;
- Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina-B, fluconazol e itraconazol;
- Avaliar a patogenicidade dos isolados selecionados por meio de ensaios de sobrevivência utilizando o modelo invertebrado alternativo *Caenorhabditis elegans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DE COLETA DE AMOSTRAS

O biodigestor está localizado na fazenda experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), no município de Coronel Pacheco, MG. Durante o experimento o número de bovinos leiteiros confinados em estrutura *free stall* (FIGURA 3) variou entre 75 e 105 animais, em média.

A parte laboratorial foi conduzida no Laboratório de Microbiologia do Rúmen, localizado na sede da EMBRAPA, em Juiz de Fora, MG e no Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos na Universidade Federal de Minas Gerais.



Figura 3: Estrutura *free stall* utilizada para confinamento de rebanhos leiteiros, consistindo em áreas com camas individualizadas, corredores de acesso e pistas de trato.

Fonte: autor.

4.2 CONDIÇÕES DO BIODIGESTOR ANAERÓBIO

O tratamento primário dos dejetos bovinos é efetuado pelo biodigestor anaeróbio, modelo canadense, com alimentação contínua e regime hidráulico de fluxo em pistão (os elementos entram e saem na mesma ordem e concentração), tendo capacidade para 540 m³ de resíduo. Ele é acoplado a uma lagoa de depósito do

efluente (tratamento secundário) com 216 m³ de capacidade e regime hidráulico de mistura completa (os elementos entram e se dispersão, saindo proporcionalmente a sua concentração). O biodigestor e a lagoa são mantidos em condições naturais de temperatura e ambiente.

O sistema de abastecimento diário do biodigestor está ilustrado na FIGURA 4. Inicialmente, é utilizada água limpa para a lavagem dos pisos do sistema *free stall*, capturando todo o resíduo gerado e o escoando para uma peneira separadora de sólidos, da qual o líquido (afluente) é bombeado para o biodigestor. O TRH é, em média, de 30 dias, sendo o lodo acumulado no fundo (40 m³) recircularizado diariamente. O efluente é encaminhado para uma lagoa de depósito do efluente (TRH de 7 dias) e permanece até a utilização como biofertilizante e/ou reciclo de água para a lavagem dos pisos. O biogás produzido fica retido na campânula sobre o biodigestor, com capacidade para 270 m³, em seguida é liberado para o queimador de gás tipo *flare* ou para o gerador de energia elétrica.

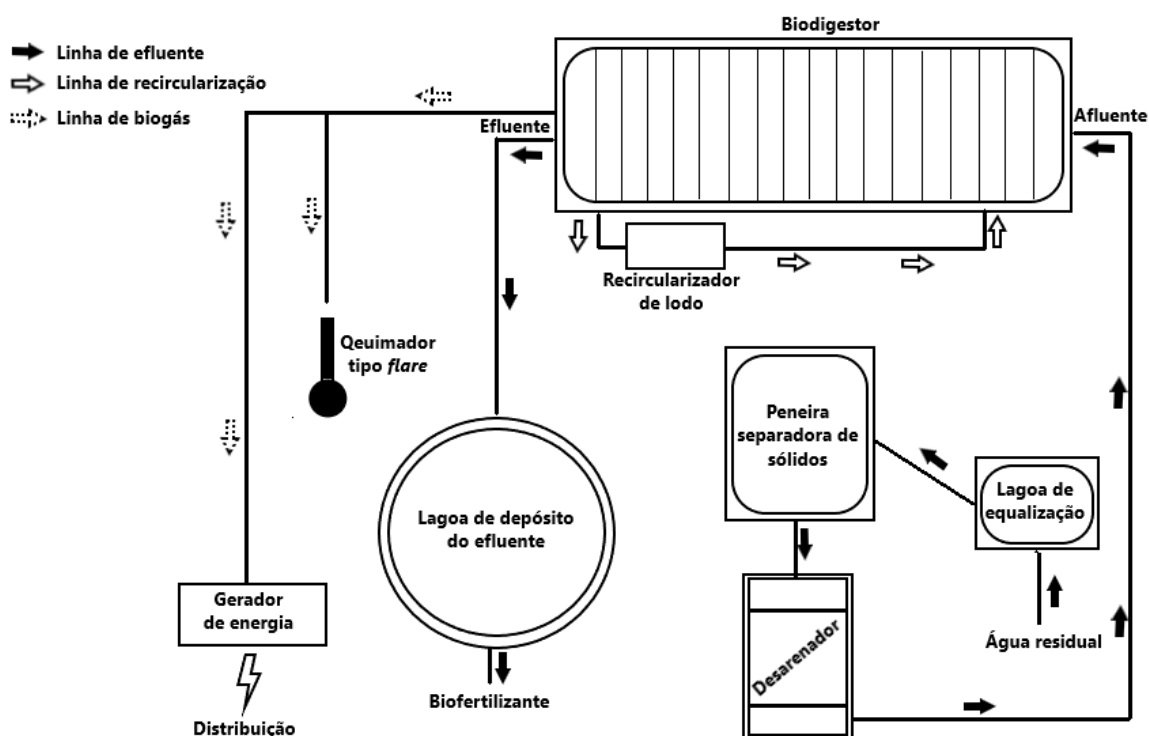


Figura 4: Esquema do abastecimento e fluxo de operação do biodigestor modelo canadense localizado na fazenda experimental da EMBRAPA, Coronel Pacheco, MG.

Fonte: autor.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA FASE 1

A primeira fase foi constituída do procedimento de isolamento das leveduras, seguida das análises bioquímicas e caracterização da eficiência do sistema quanto a remoção de *Candida* spp.

Os ensaios ocorreram em dois períodos do ano de 2018, no verão, entre os meses de fevereiro e março e no inverno, entre julho e agosto. Foram coletadas amostras do afluente, efluente e biofertilizante nos TRH de zero, sete, 14, 21 e 30 dias. As amostras foram coletadas em frascos estéreis e transportadas, assepticamente, em uma caixa térmica até o Laboratório de Microbiologia do Rúmen, na sede da EMBRAPA Gado de Leite.

No total foram 30 amostras coletas, sendo cinco para cada ponto amostral em ambas as estações do ano. Os procedimentos realizados foram análise quantitativa e físico-química, cálculo da taxa de remoção, isolamento e identificação presuntiva dos isolados. O delineamento mostrando cada passo realizado está descrito na figura 5.

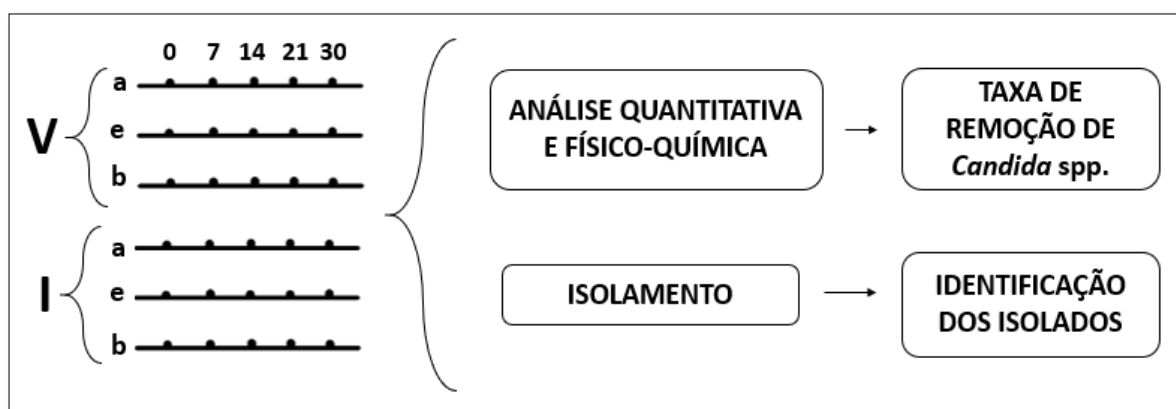


Figura 5: Esquema com as coletas e os procedimentos realizados posteriormente.

Legenda: Coletas do verão foram nomeadas com a letra “V” e do inverno com a letra “I”. Para referir-se as datas foram usados os números 0, 7, 14, 21 e 30, representando os dias decorridos da biodigestão anaeróbia. A codificação para distinguir os locais amostrais foram as letras “a” (afluente), “e” (efluente) e “b” (biofertilizante). Para os isolados a codificação atribuída foi a sequência numeral na ordem de isolamento.

Fonte: autor.

4.3.1 Análises Microbiológicas

No laboratório amostras de 10 mL do afluyente, efluente e biofertilizante foram diluídas 10 vezes em solução salina 0,9% estéril, para possibilitar a quantificação, isolamento de *Candida* spp. nos pontos amostrais. Em seguida, alíquota de 0,1 mL da diluição e da amostra bruta foi disseminado com alça de Drigalsky, em duplicata, no meio de cultivo seletivo e diferencial CHROMagar *Candida* acrescido com 0,025% de Rosa de Bengala (47,7g em 1L de água destilada, ferver até total dissolução, não autoclavar - Difco) e incubado por 48h a 37°C.

A quantificação de *Candida* spp. foi realizada a partir da contagem direta de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) crescidas no meio de cultivo a conter entre 20 e 200 UFC. Para o isolamento foram selecionadas cerca de 30% de UFC por amostra e foi possível a distinção de morfotipos e a identificação presuntiva das espécies devido a substratos cromogênicos presentes no meio, que originam colônias com diferentes colorações, sendo que *C. albicans* se apresentou na cor verde, *C. krusei* na cor rosa com ou sem borda branca, *C. tropicalis* na cor azul com ou sem borda violeta e *C. glabrata* na cor malva.

4.3.2 Análises Físico-Químicas

Análises de pH, DBO e Carbono Orgânico Total (COT) foram feitas, em duplicata, a partir das amostras do afluyente, efluente e biofertilizante. Essas análises foram realizadas pelo laboratório CSL (Laboratório de Análise Ambiental) em Americana – SP, para tanto, no momento das coletas as amostras foram distribuídas assepticamente em frascos próprios disponibilizados pelo laboratório e conservados em caixa térmica até a chegada no laboratório.

4.3.3 Eficiência do Sistema Quanto a Remoção Microbiana e a Matéria Orgânica

A taxa de remoção de *Candida* spp. no biodigestor e na lagoa de depósito do efluente, foi estimada pela lei de Chick, usando-se a equação 1.1, de acordo com Von

Sperling (1996). Para o cálculo do coeficiente de decaimento microbiano (K_b) foi utilizada a equação 2.1 para o biodigestor com fluxo em pistão (VON SPERLING, 1996) e a equação 2.2 para a lagoa de depósito do efluente com sistema de mistura completa (VON SPERLING, 2018). Como a lagoa de depósito tem o TRH de 7 dias e as coletas ocorreram por 5 semanas consecutivas, a média do afluente e efluente da lagoa foram calculadas, para então se ter apenas um valor inicial e final.

A eficiência (E) do biodigestor e da lagoa de depósito do efluente quanto a remoção microbiana e a remoção de matéria orgânica foi calculada pela equação 3.1 (VON SPERLING, 2018).

$$\text{Equação 1.1: } \frac{dN}{dt} = -k_b \cdot N$$

$$\text{Equação 2.1: } N = N_0 \cdot e^{-k_b \cdot t}$$

$$\text{Equação 2.2: } N = \frac{N_0}{1 + k_b \cdot t}$$

$$\text{Equação 3.1: } E = \frac{(N_0 - N)}{N_0} \cdot 100$$

Onde,

N = quantidade de microrganismos/matéria orgânica após um tempo t (UFC/100ml)

N_0 = quantidade de microrganismo/matéria orgânica no afluente (UFC/100 ml)

K_b = coeficiente de decaimento microbiano (/dia)

t = tempo (dia)

E = eficiência

4.4 CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram mantidos em BHI (Brain Heart Infusion) sólido e para os ensaios foram crescidos, a partir de uma colônia isolada, durante 24h em meio BHI líquido a 36°C, sob agitação de 180 RPM, *overnight*.

Os estoques foram preservados a -80°C. Para o preparo dos estoques uma colônia dos microrganismos crescidos em BHI sólido foi passada para 500µL de BHI líquido e após 24 horas de crescimento, foi adicionado 500µL de glicerol 40%.

Os controles clínicos utilizados para os ensaios de virulência foram *Candida albicans* (SC5314), *Candida tropicalis* (ATCC750), *Candida glabrata* (ATCC90030) e *Candida krusei* (ATCC20298).

4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DA FASE 2

Na segunda fase do trabalho, inicialmente, foi feita uma seleção de leveduras (FIGURA 6). A seleção dos isolados ocorreu baseando-se na identificação putativa das espécies no meio seletivo CHROMagar. Para cada espécie identificada escolheu-se aleatoriamente ao menos um isolado com resultado positivo e negativo para o teste de dimorfismo, obtidos tanto no inverno quanto no verão, quanto nos três pontos de coleta do sistema de biodigestão anaeróbica. Ainda foi considerado os padrões de banda dos isolados dentro dos clados, com no mínimo 70% de confiabilidade, formados a partir da análise de *fingerprint* da região (GTG)⁵, para tentar diminuir ao máximo a possibilidade de seleção de isolado semelhante.

Em seguida os isolados selecionados foram submetidos aos testes virulência de formação de biofilme, produção de exoenzimas, susceptibilidade a antifúngicos e virulência *in vivo* em modelo invertebrado *C elegans*.

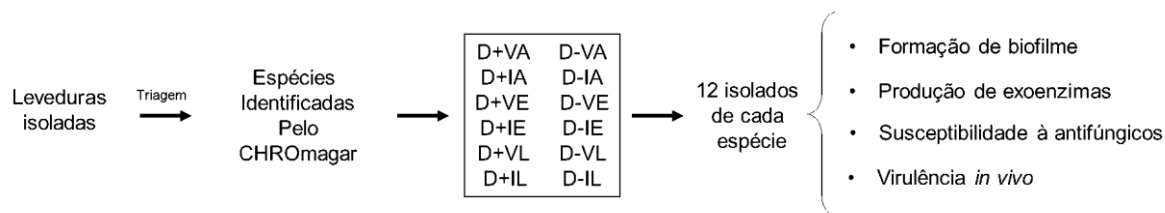


Figura 6: Esquema do delineamento experimental adotado na 2ª fase do trabalho.

Legenda: A simbologia “D+” e “D-” se refere a característica de dimorfismo, positivo ou negativo, respectivamente. As letras “V” e “I” estão referenciando as estações do ano, verão e inverno, respectivamente. O afluente, e fluente e a lagoa de depósito estão sendo representados pelas letras “A”, “E” e “L”, respectivamente.

4.5.1 Triagem dos Isolados

a) Dimorfismo

O teste de dimorfismo foi realizado de acordo com Ferreira e Ávila (2001). Para tanto os isolados foram semeados por microgota em ágar-fubá acrescido de 10ml/L de tween 80 e pH final entre 6,6 e 6,8. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 72 horas, observando-se a morfologia das colônias.

Para o preparado do meio inicialmente foi necessário aquecer 40g de fubá em quantidade suficiente de água por 1 hora, em seguida filtrou-se o extrato em gaze dobrada até a obtenção total de 1L, posteriormente acrescentou-se 20g de ágar, 10ml de tween 80 e ajustou-se o pH, por fim o meio foi autoclavado.

Um teste adicional foi realizado, da mesma forma, por microgota e observando-se a morfologia das colônias, utilizando-se o meio NGM (Nematode Growth Media – 21g ágar, 3g NaCl, 2,5g peptona, autoclavar, acrescentar 1ml CaCl 1M, 1mL MgSO₄ 1M, 25mL KPO₄ pH6, 1mL colesterol 5mg/mL em etanol), pois é um meio de crescimento mínimo utilizado na manutenção do modelo invertebrado trabalhado neste estudo, *Caenorhabditis elegans*.

b) *Fingerprint* da região (GTG)5

Para a extração total do DNA foi usado o protocolo de Pinheiro *et al.*, (2018) com modificações. Colônias puras das leveduras foram previamente crescidas em meio solido YPD (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%) à 37 °C por 48 horas. Uma alçada de colônia pura de cada levedura foi ressuspensa em 100 µL de tampão de lise (25 mL de solução de Tris 1M + HCl; 5mL de solução de EDTA 0,5M; 10 mL de solução de NaCl 5M; 50 mL de solução de SDS a 10% e 410 mL de água destilada) em microtubo estéril. Procedeu-se homogeneização em *vórtex* por 2 minutos e incubação em banho-maria a 65 °C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), homogeneizado por inversão, e centrifugado a 14.000 RPM por 10 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro microtubo estéril, com adição de isopropanol v/v (~80 µL). O microtubo foi disposto em repouso à temperatura ambiente por 15 min, para que ocorresse a precipitação do DNA.

Após precipitação do DNA, procedeu-se centrifugação a 14.000 RPM por 10 min e o sobrenadante foi descartado por inversão. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados ao microtubo 200 µL de etanol 70% e novamente foi realizada a centrifugação a 14.000 RPM por 10 min e o etanol foi descartado por inversão. Essa etapa de lavagem do sedimento com etanol 70% foi repetida duas vezes. Os microtubos foram mantidos abertos à temperatura ambiente *overnight*, para total evaporação do etanol.

Posteriormente, o *pellet* de DNA foi ressuspensa em 50 µL de tampão TE pH 8,0 (Tris base 121,11g, EDTA 0,5M 9,305g).

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop 1000®) para verificar se a relação das leituras dos comprimentos de onda 260/280 nm estavam entre 1,8 e 2,0. A concentração do DNA foi ajustada para aproximadamente 200 ng.µL⁻¹, utilizando tampão TE pH 8,0 como diluente

A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% a 100 V por 1h em tampão TAE 1X (4,9g Tris, 1,15ml de acetato, 2ml de EDTA 0,5M pH

8.0), corados com SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific). Após a eletroforese, os géis foram visualizados em luz UV e fotodocumentados.

Após extração do DNA total das leveduras, foi realizada reação de PCR das regiões de microssatélites com o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') (ŠVEC *et al.*, 2005).

A reação de PCR consistiu de 2,5 µL de tampão 10X, 1,5 µL de MgCl₂ (25 mM), 1 µL de dNTP 10 mM (2,5 mM cada), 2,0 µL do iniciador (GTG)₅ a 10 pmol.µL⁻¹, 5,0 µL do DNA (150 ng.µL⁻¹), 0,2 µL de Taq DNA polimerase a 5 U.µL⁻¹ e água ultrapura esterilizada q.s.p. um volume final de 25 µL.

A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 20 segundos com desnaturação à 93°C, 1 minuto de anelamento do iniciador à 50°C e 20 segundos de extensão à 72°C, com uma extensão final por 6 minutos à 72°C.

Os produtos da PCR juntamente com o tampão de corrida 6X (1:1) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a 100 V por 1h em tampão TAE 1X, corados com SYBR® Safe (Thermo Fisher Scientific). Os perfis de banda foram visualizados com auxílio de UV, fotografados utilizando um fotodocumentador (MARCA) e agrupados utilizando o software BioNumerics (Applied Maths).

4.5.2 Produção de biofilme

A capacidade de formar biofilme foi avaliada, utilizando-se a metodologia descrita por Shin *et al.* (2002).

Inicialmente os isolados foram inoculados no meio de cultivo ASD (Ágar Sabouraud Dextrose) e incubados a 37°C por 48 horas. Em seguida, foi feito o ajuste do inóculo de acordo com a escala 0,5 *McFarland* (1x10⁶ a 5x10⁶ células/ml).

A distribuição nas placas de 96 poços foi em duplicata com 20µl do inóculo ajustado e 180µl do meio RPMI-1640. O controle negativo para produção de biofilme será 200µl apenas de meio RPMI-1640. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas.

Para leitura, os poços foram lavados duas vezes com soro fisiológico estéril e adicionado 200µl de metanol por 15 minutos para fixação. Em seguida, as placas foram novamente lavadas duas vezes com soro fisiológico estéril e adicionado 200µl de cristal violeta para coloração e 250µl de etanol para lavagem dos poços.

A absorbância foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. Baseado na densidade ótica do crescimento das leveduras (D.O.i) e na densidade ótica do controle negativo (D.O.c) as leveduras foram classificados em: não produtor de biofilme (D.O.i < D.O.c); produtor fraco (D.O.c < D.O.i < 2x D.O.c); produtor moderado (2 x D.O.c < D.O.i < 4x D.O.c) e produtor forte (D.O.i > 4x D.O.c).

4.5.3 Produção de Exoenzimas

a) Fosfolipases

Para o teste de produção da exoenzimas fosfolipase foi usado o método descrito por Price, Wilkinson e Gentry (1982) com modificações. O meio consiste em:

Para 180 mL de meio ágar Sabouraud dextrose acrescentar:

11,40g de cloreto de sódio;

0,11g de cloreto de cálcio;

4% de glicose;

20 mL de gema de ovo (acrescentar no meio com temperatura tolerável).

O inóculo foi ajustado de acordo com a escala *McFarland* 0,5 (1 a 5 x 10⁶ células/mL). Nas placas 3µL dos inóculos foram distribuídos, em duplicata e incubadas a 37°C por 4 dias.

Para se obter o tamanho da zona de precipitação das exoenzimas fosfolipases foi usada a equação 4.1.

Equação 4.1: $Pz = \frac{dc}{dc+dt}$

Onde:

Pz = Zona de precipitação

dc = diâmetro da colônia

dt = diâmetro da área translúcida

Os coeficientes encontrados foram classificados em cinco grupos:

Pz = 1 resultado negativo

Pz entre 0,9 e 0,99 produtor fraco;

Pz entre 0,80 e 0,89 produtor moderado;

Pz entre 0,70 e 0,79 produtor forte;

Pz < 0,70 produtor muito forte.

b) Proteases

Para o teste de produção da exoenzimas protease foi usado o método descrito por Aoki *et al.* (1990) com modificações. O meio consiste em:

140 mL de meio ágar Sabouraud dextrose

60 mL de solução composta por:

0,04g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;

0,5 g de K_2HPO_4 ;

1g de NaCl;

0,2g de extrato de levedura;

4g de glicose;

0,5g de BSA

pH da solução ajustado para 4,0, esterilizado por filtração e adicionado em temperatura tolerável.

O inóculo foi ajustado de acordo com a escala *McFarland* 0,5 (1 a 5 x 10⁶ células/mL). Nas placas 3µL dos inóculos foram distribuídos, em duplicata e incubadas a 37°C por 7 dias.

Para se obter o tamanho da zona de precipitação das exoenzimas proteases foi usada a equação 4.2.

$$\text{Equação 4.2: } P_z = \frac{dc}{dc+dt}$$

Onde:

P_z = Zona de precipitação

dc = diâmetro da colônia

dt = diâmetro da área translúcida

Os coeficientes encontrados foram classificados em cinco grupos:

P_z = 1 resultado negativo

P_z entre 0,9 e 0,99 produtor fraco;

P_z entre 0,80 e 0,89 produtor moderado;

P_z entre 0,70 e 0,79 produtor forte;

P_z < 0,70 produtor muito forte.

4.5.4 Perfil de Susceptibilidade aos Antifúngicos

A susceptibilidade a antifúngicos para os isolados foi realizada de acordo com o método de microdiluição, descrito no documento M27 - A3 (CLSI, 2008) regulamentado e publicado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Os antifúngicos usados foram anfotericina-B, fluconazol e itraconazol. Inicialmente foram preparadas soluções padrão em que o fluconazol foi diluído na concentração 1280µg/ml em água destilada e itraconazol e anfotericina B diluídos na concentração de 1600µg/ml em DMSO (dimetilsulfóxido). As concentrações finais

testadas foram de 0,125 a 128 μ g/ml para fluconazol e de 0,0313 a 16 μ g/ml para os demais antifúngicos (100 μ L).

Para o preparo dos inóculos, inicialmente, os isolados foram crescidos em meio ASD à 37°C por 24h, em seguida cerca de 5 colônias foram suspensas em 5mL de solução salina 0,85% e a transmitância ajustada de acordo com a escala 0,5 *McFarland* (1x10⁶ a 5x10⁶ células/ml), usando comprimento de onda de 530nm. Essas suspensões padrões foram diluídas 1:20 e 1:50 vezes em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute* – 1640 / 10,4g do meio, 34,53g tampão MOPS em 900mL de água destilada, pH 7,0, água destilada q.s.p. 1000mL, esterilizar por filtração), obtendo-se as suspensões de trabalho (1x10³ a 5x10³ células/ml), que foram diluídas 1:1 quando adicionadas nos poços com a droga(100 μ L), chegando na concentração final desejada de 0,5x10³ a 2,5x10³ células/ml.

Para o controle de crescimento, foi inoculado 100 μ L de meio RPMI-1640 estéril, sem droga, com 100 μ L de inóculo. Para o controle de esterilidade foi inoculado 200 μ L de meio RPMI-1640 estéril.

As placas de microdiluição foram incubadas em estufa a 37°C por 48h. Para a leitura, a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada naqueles poços com crescimento de 80% comparados com o poço controle do crescimento (microrganismo inoculado em meio RPMI-1640 isento de droga).

Os valores de ponto de corte (*breakpoints*), ou seja, a concentração de antifúngico que define a resistência da cepa, adotados para os diferentes antifúngicos estão descritos na tabela 1, sendo que para fluconazol e itraconazol foram utilizados os documentos M27-S3 (CLSI, 2008) e (CLSI, 2012) e para anfotericina B os estudos de Pfaller e Diekema (2012). As espécies de *C. krusei* não possuem ponto de corte para fluconazol pois são consideradas resistentes intrinsecamente (M27-S4, CLSI, 2012).

Tabela 1: Valores de ponto de corte (*breakpoints*) estabelecidos para caracterizar as espécies de *Candida* como resistentes ou susceptíveis a antifúngicos.

Antifúngicos	Espécie	Suscetível	Resistente	Referência
Fluconazol (µg/mL)				
	<i>C. albicans</i>	≤ 2	≥ 8	CLSI, 2012
	<i>C. glabrata</i>	-	≥ 64	CLSI, 2012
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	≥ 8	CLSI, 2012
Itraconazol (µg/mL)				
	<i>Candida</i> sp	≤ 0,12	≥ 1	(CLSI, 2008)
Anfotericina B (µg/mL)				
	<i>Candida</i> sp	-	≥ 1	Pfaller; Diekema, (2012)

4.5.5 Virulência *in vivo*

Os ensaios de infecção foram realizados conforme descrito por Huang *et al.* (2014) com modificações. Foram utilizadas placas de 24 poços preparadas com ágar NGM (Nematode Growth Media – 21g ágar, 3g NaCl, 2,5g peptona, autoclavar, acrescentar 1ml CaCl 1M, 1mL MgSO₄ 1M, 25mL KPO₄ pH6, 1mL colesterol 5mg/mL em etanol), sendo o controle negativo vermes sob alimentação normal com *E. coli* OP50.

A partir das leveduras crescidas em ASD a 24h, foram colocados 10 µL de cada amostra no centro de cada poço. Após secagem, foram adicionados 5 µL de estreptomicina 50µg/ml, 5 µL de cloranfenicol 34mg/ml e 5 µL de FUdR 50 µg/ml (5-fluoro-2'- deoxiuridina - SIGMA). Esse último impede *C. elegans* de se reproduzir.

Para os ensaios de infecção, os nematódeos foram sincronizados de acordo com a metodologia dos autores Porta-de-la-Riva *et al.* (2012), ou seja, todos na mesma fase de desenvolvimento. Adultos jovens (estágio L4), foram distribuídos em 15 mL de tampão M9 (3g KH₂PO₄; 6g Na₂PO₄; n5g NaCl; após autoclavado adicionar 1 mL MgSO₄ 1M) em tubo de polipropileno estéril. Os vermes foram lavados três vezes com 10mL de tampão M9 com centrifugação de 2000 RPM durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e os vermes contabilizados em lâmina escavada com auxílio de microscópio óptico, para se obter uma suspensão de 10uL com aproximadamente 12 vermes. Os 10uL (n=12) foram adicionados sobre a camada de leveduras. A placa foi incubada a temperatura de 25°C e os vermes contabilizados em

vivos ou mortos (sem resposta aos estímulos mecânicos) com auxílio de estereomicroscópio.

A curva de sobrevivência foi construída pela contabilização de indivíduos mortos a cada 48 horas até a morte de todos os nematódeos. Dessa forma, foi possível calcular o tempo necessário para a morte de 50% da população (LT50).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As quantificações microbianas foram feitas em duplicata, calculadas as médias e convertidas em \log_{10} (log UFC/ml). As análises físico-químicas também foram feitas em duplicatas e calculadas suas médias.

O teste t de *Student* e o teste Tukey foram utilizados para comparar, entre as estações do ano e entre os pontos amostrais, a densidade de *Candida* spp. e os dados físico - químicos. O nível estabelecido para significância dos testes foi $p < 0,05$.

As análises de correlação entre os foram feitas utilizando-se o software GraphPrism e o Teste de Spearman para comparar as características de virulência entre as cepas de leveduras, com o nível de significância dos testes estabelecido em $p < 0,05$.

As curvas de sobrevivência foram construídas com o auxílio do programa GraphPrism e analisadas pelo método de Kaplan – Meyer. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Log Rank. O resultado foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Candida* spp. NO PROCESSO DE BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Observando o crescimento de *Candida* spp., a partir do plaqueamento em meio seletivo CHROmagar, no carregamento inicial do biodigestor é possível concluir que ele foi maior no inverno ($p < 0,05$), atingindo 4,6 log UFC/ml, que no verão, o qual foi de 3,19 log UFC/ml (GRÁFICO 1). Esses valores estão abaixo do encontrado por Alfa *et al.* (2014) em que a densidade geral da população fúngica do dejetos bovino de abastecimento do biodigestor foi de 5,51 log UFC/ml.

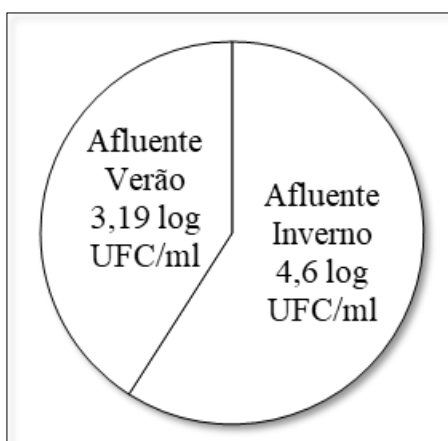


Gráfico 1: Densidade populacional de *Candida* spp. no abastecimento inicial do biodigestor em ambas as estações do ano.

A diferença na presença de *Candida* spp. nos afluentes do biodigestor, pode ser explicada pelo número de animais em confinamento (média de 105 vacas no inverno e 75 vacas no verão) e o tipo de alimentação desses animais, já que variando esses parâmetros geram-se resíduos desuniformes (MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017) e, além de tudo, essa levedura vive em comensalismo no trato gastrointestinal do animal e está diretamente relacionada à alimentação (COOPER, 2011; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003).

Comprovando isso, observa-se uma diferença, em número absoluto ($p > 0,05$), entre inverno e verão nos valores de DBO e COT nos afluentes (TABELA 2). No verão,

onde *Candida* spp. mostrou-se em menor densidade, a quantidade de DBO e COT foi de 1587,5 mg/L e 327 mg/L, respectivamente, já no inverno de 1775 mg/L e 951,45 mg/L, ou seja, o número de animais no confinamento era menor e o sistema de produção gerou menos resíduo, juntamente, a alimentação diferenciada, ocasionou a geração de resíduos com menos DBO, COT e taxa de carbono facilmente assimilável por microrganismos, justificando o menor crescimento de *Candida* spp. (BISUTTI; HILKE; RAESSLER, 2004).

Tabela 2: Análises físico-químicas do afluente, efluente e biofertilizante no período de verão e inverno.

Estação do ano	Local de coleta	pH	DBO (mg/L)	COT (mg/L)
INVERNO	Afluente	7,1	1775,0	951,5
	Efluente	7,4	861,0	680,8
	Biofertilizante	7,4	499,0	410,6
VERÃO	Afluente	7,3	1587,5	327,0
	Efluente	7,2	367,4	129,3
	Biofertilizante	7,4	239,9	49,8

Legenda: DBO: Demanda Bioquímica de Oxigênio; COT: Carbono Orgânico Total.

O pH do afluente (TABELA 1), ou seja, a concentração de ácidos na água de lavagem do curral, tanto no inverno quanto no verão, ficou perto da neutralidade (7,1 e 7,3, respectivamente), valores esses, próximos aos encontrados no trabalho de Amon *et al.* (2007) e Mendonça, Ometto e Otenio (2017) que foi de 7,4 e 6,7, respectivamente, ambos trabalhos utilizando dejetos da pecuária. Este fato indica que a maior parte dos ácidos orgânicos estão na sua forma ionizada, não tóxica, estabelecendo uma condição favorável à digestão anaeróbia (pH entre 6,7 e 8) (MENDONÇA; OMETTO; OTENIO, 2017). Elevada concentração de ácidos durante a fermentação inibi o crescimento de bactérias, principalmente as metanogênicas, que mesmo sendo responsáveis pela degradação deles, são sensíveis a pH menores que 6,5 (KOTHARI *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2009). Leveduras do gênero *Candida* suportam pH ácido até 2 e alcalino até 10, ou seja, o pH do afluente é propício ao crescimento desse gênero (BENGELSDORF *et al.*, 2013).

A densidade de *Candida* spp. no efluente do biodigestor, durante os 30 dias de fermentação, é mostrada no GRÁFICO 2. No inverno, após 7 dias de biodigestão, a

quantificação de *Candida* spp. foi de 2,98 log UFC/ml, mostrando uma redução inicial de 1,62 ciclos log. Nas coletas de 14 e 21 dias manteve-se a taxa populacional em torno de 2,98 log UFC/ml. Já na última coleta (30 dias) o crescimento foi de 2,76 log UFC/ml, totalizando uma redução de 1,84 ciclos log. No verão, a taxa de morte na primeira coleta (7 dias de fermentação) foi de 0,24 ciclos log. A partir dos 14 dias a densidade populacional decaiu constantemente e chegou a 2,51 log UFC/ml aos 30 dias do processo, totalizando uma redução de 0,68 ciclos log. A redução populacional de *Candida*, no período do inverno, foi parecida com a observada por Alfa *et al.* (2014) para a população fúngica em geral, que foi de 1,68 log UFC/ml.

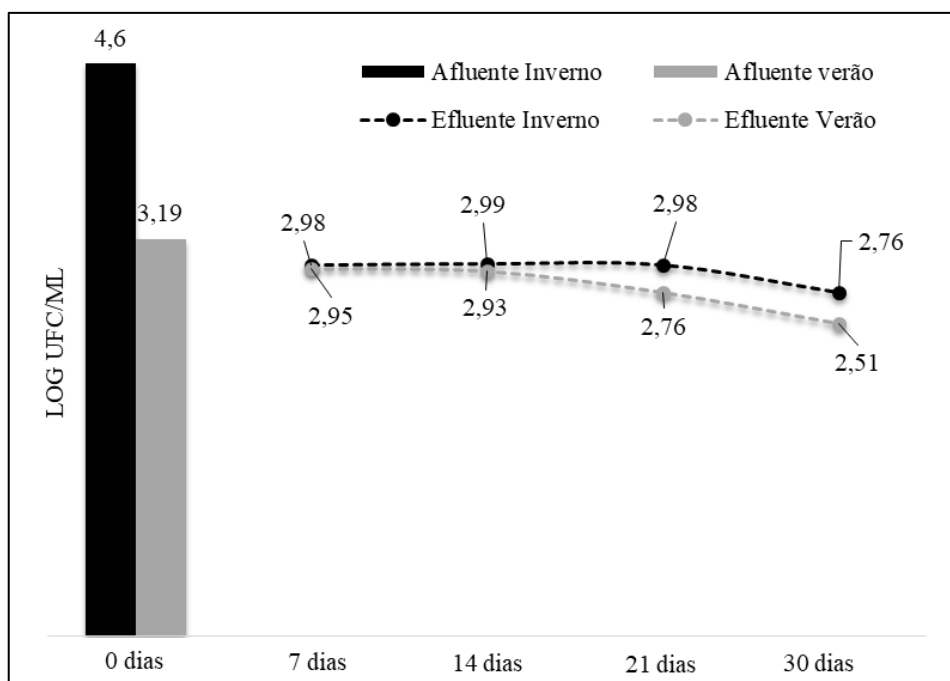


Gráfico 2: Densidade de *Candida* spp. no afluente do biodigestor e no decorrer do processo de biodigestão anaeróbia, em ambas as estações do ano.

Mesmo com a maior presença de *Candida* spp. no afluente do inverno, os efluentes não se mostraram distintos ($p > 0,05$), ou seja, no inverno obteve-se maior taxa de morte desse possível patógeno, principalmente na primeira semana de fermentação. Este fato pode ser atribuído à temperatura, a qual no inverno foi em média 20,4°C e no verão 28,8°C, de acordo com dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2018). A temperatura afeta diretamente a sobrevivência de

microrganismos e a qualidade do efluente, já que em temperaturas psicrófilas diversos microrganismos envolvidos na fermentação são inibidos e cessam o processo (KUMAR *et al.*, 2013; AMON *et al.*, 2010; BRANDA *et al.*, 2016).

Dessa forma, a baixa temperatura atua muito bem na remoção de possíveis patógenos, porém reduz a qualidade do efluente, quando considerado a estabilização da matéria orgânica, como é observado na TABELA 1, em que houve maior redução, em número absoluto ($p > 0,05$), de DBO e COT no verão (76,9% e 60,5% respectivamente) do que no inverno (51,5% e 28,4%, respectivamente), ou seja, a maior redução de *Candida* spp. na primeira semana de fermentação no período do inverno, pode ter resultado em um desequilíbrio microbiano e afetado a metabolização da matéria orgânica.

O pH do efluente do biodigestor (TABELA 1), tanto no inverno quanto no verão ficou próximo a neutralidade (7,4 e 7,2, respectivamente), indicando que os ácidos formados pela fermentação da matéria orgânica complexa não se acumularam e nem foram removidos em excesso (KOTHARI *et al.*, 2014). Os valores encontrados estão de acordo com o observado no trabalho de Alfa *et al.* (2014), que foi de 7,0. Os autores Liu *et al.* (2008) descreveram um modelo matemático para relacionar a melhor faixa de pH com o melhor rendimento no processo de biodigestão e eles encontraram que o pH ideal é em média 7,2. Relacionando o pH do efluente com a presença de *Candida*, temos que ele é ideal para o dimorfismo, encontrado principalmente na espécie *C. albicans*, que aumenta sua chance de sobrevivência e infecção no homem ou animal (KIM; SUDBERY, 2011).

Neste estudo, o biofertilizante é dito o efluente que saiu do biodigestor e entrou na lagoa, para seu depósito e posterior uso. Esta lagoa funciona como um depósito, pois é a partir dela a reciclagem de água para a lavagem dos pisos *free stall* e também é de onde é retirado o biofertilizante para fertirrigação. A lagoa é aberta e sofre diversas influências, como chuva, incidência de radiação solar, contaminação por excrementos de aves e crescimento de algas. Contudo, observando os dados da lagoa na TABELA 1, é possível notar um pH neutro nos dois períodos do ano e também uma redução adicional ($p > 0,05$) de DBO e COT no verão (34,7% e 61,5%, respectivamente) e no inverno (42% e 39,7%, respectivamente). Essa redução

adicional observada pode ser atribuída ao metabolismo microbiano ainda presente e também à sedimentação da matéria orgânica, que tende a formar um lodo e uma zona anaeróbia no fundo da lagoa (MATOS, 2014; VON SPERLING, MARCOS, 2018).

A eficiência total do sistema na estabilização da matéria orgânica foi de 84,9% (DBO) e 84,8% (COT) no verão e 71,9% (DBO) e 56,8% (COT) no inverno.

A densidade de *Candida* spp. no biofertilizante pode ser analisada no GRÁFICO 3. A remoção de *Candida* spp. no biofertilizante, no período do verão, ficou em torno de 0,48 ciclos log (efluente + biofertilizante = remoção total média de 1,68 ciclos log). No inverno, essa remoção média foi de 0,44 ciclos log (efluente + biofertilizante = remoção total média de 2,28 ciclos log).

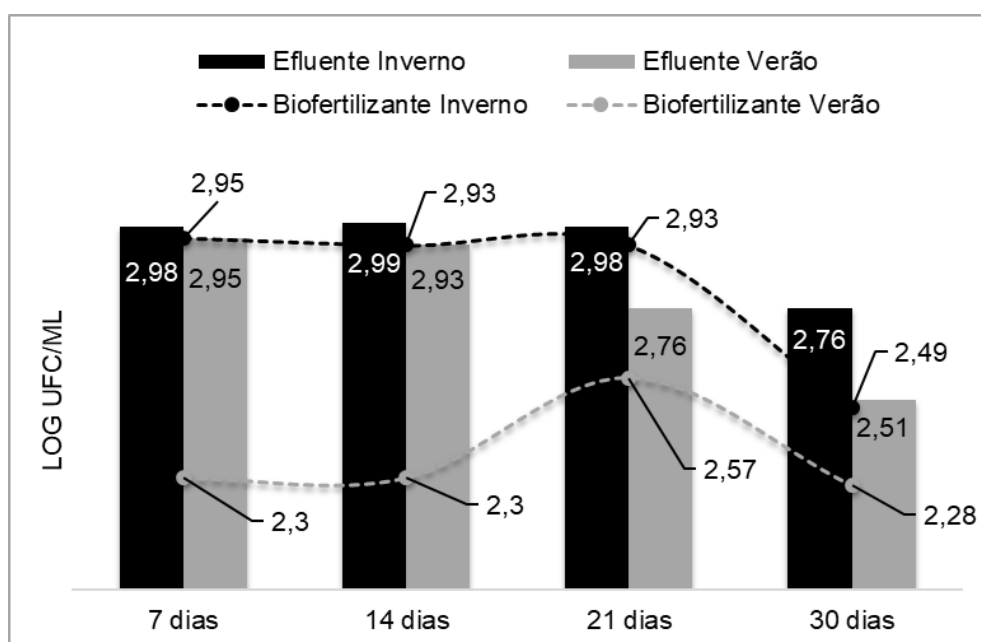


Gráfico 3: Densidade de *Candida* spp. no biofertilizante e efluente, no verão e inverno, durante o período de fermentação.

Observando o GRÁFICO 3, é possível notar que no verão houve menor crescimento de *Candida* spp. em todas as coletas, mesmo não sendo significativa a diferença entre as estações do ano ($p > 0,05$). Assim como não houve diferença estatística na quantificação entre o biofertilizante e o efluente, nas duas estações ($p > 0,05$). O distinto comportamento populacional de *Candida* spp. no biofertilizante, pode ser explicado pela radiação solar incidente durante o período do verão, que é

mais intensa e atua desestruturando e inativando microrganismos (VIVAN *et al.*, 2010).

Uma visão geral da densidade populacional de *Candida* spp. pode ser vista no GRÁFICO 4. Em ambas as estações do ano, houve diferença ($p < 0,05$) entre o afluente e efluente, contudo os efluentes não se diferiram dos biofertilizantes ($p > 0,05$). Foi observado diferença entre as estações apenas nos afluentes ($p < 0,05$). A redução no efluente, nas duas estações, foi diferente ($p < 0,05$), contudo no biofertilizante não teve diferença ($p > 0,05$). A redução no inverno foi maior que no verão ($p < 0,05$).

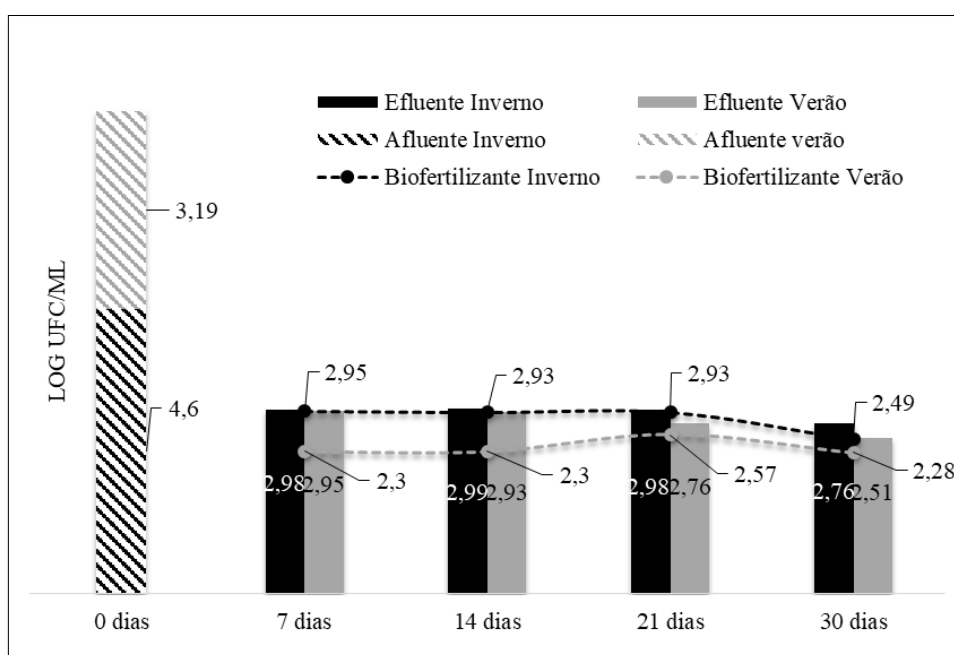


Gráfico 4: Visão geral da densidade populacional de *Candida* spp no afluente, efluente e biofertilizante, durante o processo de biodigestão anaeróbia em ambos períodos do ano.

O decaimento de UFC de *Candida* spp. no biodigestor, foi estimada em 6.270 cand/100ml/dia no inverno e 1.664 cand/100ml/dia no verão, garantindo uma eficiência de 95,44% e 79,22%, respectivamente. Considerando a lagoa, a taxa estimada foi de 657 cand/100ml/dia no inverno e 768 cand/100ml/dia no verão, configurando eficiência de 39,42% e 69,33%, respectivamente. A eficiência total do sistema no verão e inverno quanto a estabilização de leveduras *Candida* foi 98,44% e 99,42%, respectivamente.

5.2 ISOLADOS DE *Candida* spp. DA BIODIGESTÃO ANAERÓBIA

Durante o experimento foram isoladas 376 cepas de *Candida* spp., sendo 177 no verão e 199 no inverno. A maior quantidade de isolados no inverno já era prevista, visto que, o afluente dessa estação obteve maior densidade de *Candida* spp. e o padrão de isolamento estabelecido foi cerca de 30% de células viáveis. Além disso, esse resultado também foi observado em estudos anteriores de isolamento sazonal de espécies de *Candida* (AHMED *et al.*, 2019).

A identificação presuntiva desses isolados, a nível de espécie foi possível devido a compostos cromogênicos presentes no meio, os quais quando fermentados originam colônias com diferentes colorações, sendo *C. albicans* de coloração verde, *C. krusei* rosa com ou sem borda branca, *C. tropicalis* azul com ou sem borda violeta e *C. glabrata* malva. Colônias que não se encaixavam na colorimetria citada foram classificadas como “outra” (TABELAS 3 e 4) (FIGURA 7).

Tabela 3: Isolados de *Candida* a partir do afluente, efluente e biofertilizante, no período do verão.

VERÃO			
Isolados do afluente		Isolados do efluente	Isolados biofert.
25 <i>C. albicans</i>	43 <i>C. krusei</i>	50 <i>C. albicans</i>	59 <i>C. albicans</i>
27 <i>C. albicans</i>	67 <i>C. krusei</i>	53 <i>C. albicans</i>	99 <i>C. albicans</i>
28 <i>C. albicans</i>	117 <i>C. Krusei</i>	55 <i>C. albicans</i>	101 <i>C. albicans</i>
33 <i>C. albicans</i>	125 <i>C. Krusei</i>	80 <i>C. albicans</i>	103 <i>C. albicans</i>
34 <i>C. albicans</i>	128 <i>C. Krusei</i>	82 <i>C. albicans</i>	105 <i>C. albicans</i>
39 <i>C. albicans</i>	132 <i>C. Krusei</i>	83 <i>C. albicans</i>	106 <i>C. albicans</i>
44 <i>C. albicans</i>	141 <i>C. Krusei</i>	92 <i>C. albicans</i>	168 <i>C. albicans</i>
47 <i>C. albicans</i>	174 <i>C. krusei</i>	148 <i>C. albicans</i>	169 <i>C. albicans</i>
62 <i>C. albicans</i>	182 <i>C. Krusei</i>	152 <i>C. albicans</i>	191 <i>C. albicans</i>
64 <i>C. albicans</i>	187 <i>C. krusei</i>	155 <i>C. albicans</i>	108 <i>C. glabrata</i>
66 <i>C. albicans</i>	1 <i>C. tropicalis</i>	157 <i>C. albicans</i>	110 <i>C. glabrata</i>
78 <i>C. albicans</i>	3 <i>C. tropicalis</i>	14 <i>C. glabrata</i>	114 <i>C. glabrata</i>
116 <i>C. albicans</i>	5 <i>C. tropicalis</i>	52 <i>C. glabrata</i>	166 <i>C. glabrata</i>
118 <i>C. albicans</i>	6 <i>C. tropicalis</i>	54 <i>C. glabrata</i>	193 <i>C. glabrata</i>
124 <i>C. albicans</i>	7 <i>C. tropicalis</i>	48 <i>C. krusei</i>	100 <i>C. krusei</i>
126 <i>C. albicans</i>	9 <i>C. tropicalis</i>	49 <i>C. krusei</i>	102 <i>C. krusei</i>
133 <i>C. albicans</i>	12 <i>C. tropicalis</i>	56 <i>C. krusei</i>	104 <i>C. krusei</i>
137 <i>C. albicans</i>	31 <i>C. tropicalis</i>	57 <i>C. krusei</i>	113 <i>C. krusei</i>
146 <i>C. albicans</i>	38 <i>C. tropicalis</i>	85 <i>C. krusei</i>	115 <i>C. krusei</i>
173 <i>C. albicans</i>	40 <i>C. tropicalis</i>	91 <i>C. krusei</i>	171 <i>C. Krusei</i>
177 <i>C. albicans</i>	46 <i>C. tropicalis</i>	94 <i>C. krusei</i>	189 <i>C. krusei</i>
179 <i>C. albicans</i>	61 <i>C. tropicalis</i>	149 <i>C. Krusei</i>	190 <i>C. krusei</i>
180 <i>C. albicans</i>	63 <i>C. tropicalis</i>	156 <i>C. Krusei</i>	192 <i>C. krusei</i>
181 <i>C. albicans</i>	65 <i>C. tropicalis</i>	160 <i>C. Krusei</i>	194 <i>C. krusei</i>
185 <i>C. albicans</i>	68 <i>C. tropicalis</i>	15 <i>C. tropicalis</i>	21 <i>C. tropicalis</i>
186 <i>C. albicans</i>	69 <i>C. tropicalis</i>	16 <i>C. tropicalis</i>	22 <i>C. tropicalis</i>
2 <i>C. glabrata</i>	70 <i>C. tropicalis</i>	17 <i>C. tropicalis</i>	23 <i>C. tropicalis</i>
4 <i>C. glabrata</i>	71 <i>C. tropicalis</i>	19 <i>C. tropicalis</i>	24 <i>C. tropicalis</i>
8 <i>C. glabrata</i>	72 <i>C. tropicalis</i>	20 <i>C. tropicalis</i>	107 <i>C. tropicalis</i>
10 <i>C. glabrata</i>	74 <i>C. tropicalis</i>	58 <i>C. tropicalis</i>	109 <i>C. tropicalis</i>
26 <i>C. glabrata</i>	75 <i>C. tropicalis</i>	81 <i>C. tropicalis</i>	112 <i>C. tropicalis</i>
77 <i>C. glabrata</i>	79 <i>C. tropicalis</i>	88 <i>C. tropicalis</i>	167 <i>C. tropicalis</i>
121 <i>C. glabrata</i>	119 <i>C. tropicalis</i>	89 <i>C. tropicalis</i>	170 <i>C. tropicalis</i>
122 <i>C. glabrata</i>	120 <i>C. tropicalis</i>	90 <i>C. tropicalis</i>	188 <i>C. tropicalis</i>
131 <i>C. glabrata</i>	123 <i>C. tropicalis</i>	93 <i>C. tropicalis</i>	111 Outro
143 <i>C. glabrata</i>	127 <i>C. tropicalis</i>	97 <i>C. tropicalis</i>	164 Outro
145 <i>C. glabrata</i>	129 <i>C. tropicalis</i>	153 <i>C. tropicalis</i>	165 Outro
175 <i>C. glabrata</i>	130 <i>C. tropicalis</i>	154 <i>C. tropicalis</i>	
183 <i>C. glabrata</i>	134 <i>C. tropicalis</i>	158 <i>C. tropicalis</i>	
184 <i>C. glabrata</i>	135 <i>C. tropicalis</i>	162 <i>C. tropicalis</i>	
29 <i>C. krusei</i>	136 <i>C. tropicalis</i>	163 <i>C. tropicalis</i>	
30 <i>C. krusei</i>	138 <i>C. tropicalis</i>	95 Outro	
32 <i>C. krusei</i>	142 <i>C. tropicalis</i>	98 Outro	
35 <i>C. krusei</i>	144 <i>C. tropicalis</i>	151 Outro	
36 <i>C. krusei</i>	147 <i>C. tropicalis</i>	159 Outro	
37 <i>C. krusei</i>	172 <i>C. tropicalis</i>		
41 <i>C. krusei</i>	178 <i>C. tropicalis</i>		
	76 Outro		
n = 95		n = 45	n = 37

Tabela 4: Isolados de *Candida* a partir do afluente, efluente e biofertilizante, no período do inverno.

INVERNO				
Isolados do afluente			Isolados do efluente	Isolados biofert.
197 <i>C. albicans</i>	290 <i>C. glabrata</i>	216 <i>C. krusei</i>	224 <i>C. albicans</i>	234 <i>C. albicans</i>
200 <i>C. albicans</i>	294 <i>C. glabrata</i>	244 <i>C. krusei</i>	229 <i>C. albicans</i>	240 <i>C. albicans</i>
210 <i>C. albicans</i>	299 <i>C. glabrata</i>	248 <i>C. krusei</i>	275 <i>C. albicans</i>	282 <i>C. albicans</i>
211 <i>C. albicans</i>	303 <i>C. glabrata</i>	249 <i>C. krusei</i>	311 <i>C. albicans</i>	354 <i>C. albicans</i>
217 <i>C. albicans</i>	306 <i>C. glabrata</i>	252 <i>C. krusei</i>	346 <i>C. albicans</i>	355 <i>C. albicans</i>
219 <i>C. albicans</i>	307 <i>C. glabrata</i>	253 <i>C. krusei</i>	347 <i>C. albicans</i>	359 <i>C. albicans</i>
245 <i>C. albicans</i>	330 <i>C. glabrata</i>	255 <i>C. krusei</i>	348 <i>C. albicans</i>	361 <i>C. albicans</i>
247 <i>C. albicans</i>	331 <i>C. glabrata</i>	256 <i>C. krusei</i>	352 <i>C. albicans</i>	393 <i>C. albicans</i>
254 <i>C. albicans</i>	332 <i>C. glabrata</i>	259 <i>C. krusei</i>	382 <i>C. albicans</i>	394 <i>C. albicans</i>
260 <i>C. albicans</i>	335 <i>C. glabrata</i>	264 <i>C. krusei</i>	383 <i>C. albicans</i>	398 <i>C. albicans</i>
288 <i>C. albicans</i>	336 <i>C. glabrata</i>	265 <i>C. krusei</i>	386 <i>C. albicans</i>	399 <i>C. albicans</i>
289 <i>C. albicans</i>	337 <i>C. glabrata</i>	266 <i>C. krusei</i>	225 <i>C. glabrata</i>	400 <i>C. albicans</i>
291 <i>C. albicans</i>	338 <i>C. glabrata</i>	284 <i>C. krusei</i>	226 <i>C. glabrata</i>	237 <i>C. glabrata</i>
293 <i>C. albicans</i>	340 <i>C. glabrata</i>	285 <i>C. krusei</i>	272 <i>C. glabrata</i>	238 <i>C. glabrata</i>
295 <i>C. albicans</i>	342 <i>C. glabrata</i>	287 <i>C. krusei</i>	273 <i>C. glabrata</i>	239 <i>C. glabrata</i>
297 <i>C. albicans</i>	343 <i>C. glabrata</i>	296 <i>C. krusei</i>	274 <i>C. glabrata</i>	278 <i>C. glabrata</i>
300 <i>C. albicans</i>	366 <i>C. glabrata</i>	298 <i>C. krusei</i>	228 <i>C. glabrata</i>	279 <i>C. glabrata</i>
305 <i>C. albicans</i>	367 <i>C. glabrata</i>	301 <i>C. krusei</i>	270 <i>C. glabrata</i>	318 <i>C. glabrata</i>
329 <i>C. albicans</i>	368 <i>C. glabrata</i>	302 <i>C. krusei</i>	308 <i>C. glabrata</i>	320 <i>C. glabrata</i>
333 <i>C. albicans</i>	372 <i>C. glabrata</i>	334 <i>C. krusei</i>	351 <i>C. glabrata</i>	326 <i>C. glabrata</i>
341 <i>C. albicans</i>	373 <i>C. glabrata</i>	370 <i>C. krusei</i>	353 <i>C. glabrata</i>	327 <i>C. glabrata</i>
344 <i>C. albicans</i>	374 <i>C. glabrata</i>	196 <i>C. tropicalis</i>	384 <i>C. glabrata</i>	328 <i>C. glabrata</i>
345 <i>C. albicans</i>	375 <i>C. glabrata</i>	207 <i>C. tropicalis</i>	385 <i>C. glabrata</i>	391 <i>C. glabrata</i>
363 <i>C. albicans</i>	377 <i>C. glabrata</i>	212 <i>C. tropicalis</i>	387 <i>C. glabrata</i>	395 <i>C. glabrata</i>
364 <i>C. albicans</i>	379 <i>C. glabrata</i>	221 <i>C. tropicalis</i>	388 <i>C. glabrata</i>	243 <i>C. glabrata</i>
365 <i>C. albicans</i>	380 <i>C. glabrata</i>	250 <i>C. tropicalis</i>	389 <i>C. glabrata</i>	325 <i>C. glabrata</i>
369 <i>C. albicans</i>	195 <i>C. krusei</i>	261 <i>C. tropicalis</i>	390 <i>C. glabrata</i>	356 <i>C. glabrata</i>
378 <i>C. albicans</i>	198 <i>C. krusei</i>	263 <i>C. tropicalis</i>	222 <i>C. krusei</i>	358 <i>C. glabrata</i>
381 <i>C. albicans</i>	201 <i>C. krusei</i>	286 <i>C. tropicalis</i>	223 <i>C. krusei</i>	362 <i>C. glabrata</i>
220 <i>C. glabrata</i>	203 <i>C. krusei</i>	304 <i>C. tropicalis</i>	227 <i>C. krusei</i>	235 <i>C. krusei</i>
199 <i>C. glabrata</i>	205 <i>C. krusei</i>	376 <i>C. tropicalis</i>	231 <i>C. krusei</i>	236 <i>C. krusei</i>
202 <i>C. glabrata</i>	206 <i>C. krusei</i>	251 Outro	232 <i>C. krusei</i>	241 <i>C. krusei</i>
204 <i>C. glabrata</i>	208 <i>C. krusei</i>	339 Outro	267 <i>C. krusei</i>	242 <i>C. krusei</i>
215 <i>C. glabrata</i>	209 <i>C. krusei</i>		268 <i>C. krusei</i>	281 <i>C. krusei</i>
218 <i>C. glabrata</i>	213 <i>C. krusei</i>		269 <i>C. krusei</i>	283 <i>C. krusei</i>
246 <i>C. glabrata</i>	214 <i>C. krusei</i>		271 <i>C. krusei</i>	321 <i>C. krusei</i>
257 <i>C. glabrata</i>			309 <i>C. krusei</i>	324 <i>C. krusei</i>
258 <i>C. glabrata</i>			316 <i>C. krusei</i>	357 <i>C. krusei</i>
262 <i>C. glabrata</i>			317 <i>C. krusei</i>	360 <i>C. krusei</i>
			310 <i>C. tropicalis</i>	397 <i>C. krusei</i>
			312 <i>C. tropicalis</i>	277 <i>C. tropicalis</i>
			313 <i>C. tropicalis</i>	280 <i>C. tropicalis</i>
			314 <i>C. tropicalis</i>	322 <i>C. tropicalis</i>
			349 Outro	392 <i>C. tropicalis</i>
			350 Outro	276 Outro
				396 Outro
n = 108			n = 45	n = 46

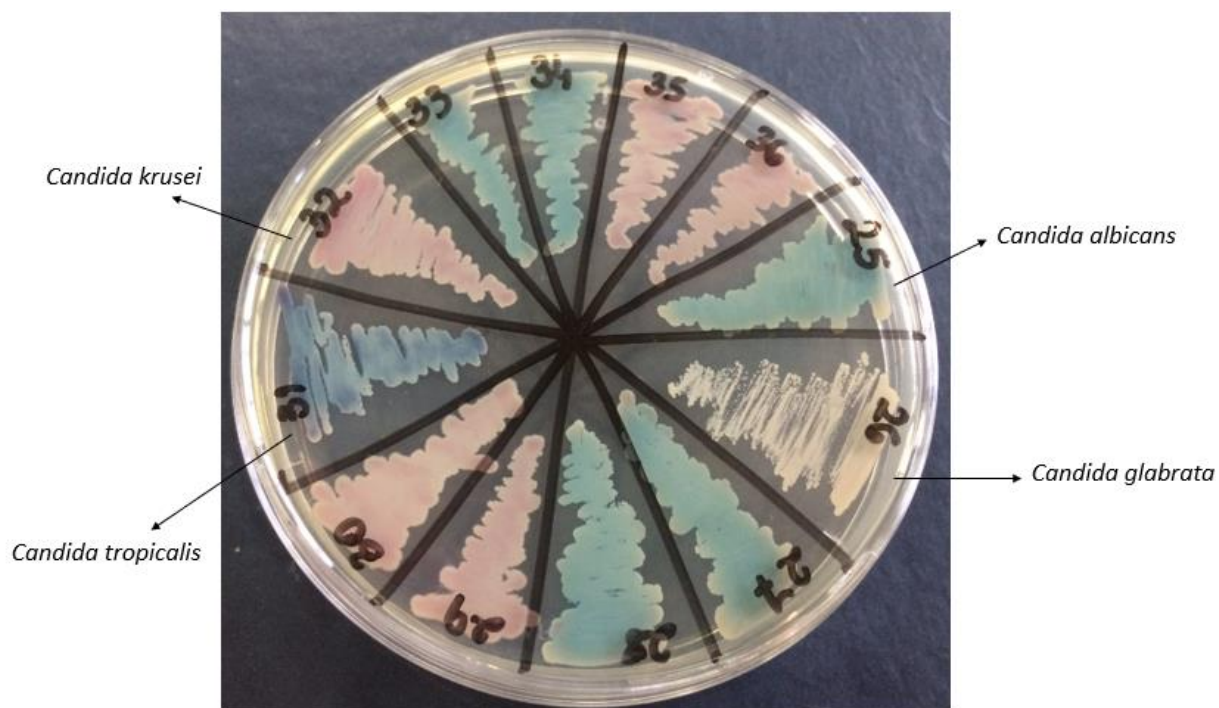


Figura 7: Apresentação das diferentes espécies de *Candida* no meio seletivo e diferencial CHROMagar.

No inverno as espécies de *Candida* identificadas foram *C. glabrata* (35%), *C. krusei* (27%), *C. albicans* (26%) e *C. tropicalis* (9%). No verão, as espécies encontradas foram *C. tropicalis* (36%), *C. albicans* (25%), *C. krusei* (21%) e *C. glabrata* (12%). Com esses dados, disponíveis também na TABELA 4, é possível notar que *C. glabrata* foi a mais encontrada no inverno e no verão a menos detectada. Do mesmo modo *C. tropicalis*, que foi a mais prevalente entre os isolados do verão, no inverno foi a menos encontrada. Contudo *C. albicans* e *C. krusei* foram observadas na mesma densidade em ambas as estações.

Tabela 5: Porcentagem das espécies de *Candida* encontradas no inverno e verão, nos três pontos amostrais.

INVERNO								
Espécies	Total		Afluente		Efluente		Biofertilizante	
<i>C. tropicalis</i>	18	9%	10	9%	4	9%	4	9%
<i>C. albicans</i>	52	26%	29	27%	11	24%	12	26%
<i>C. Krusei</i>	54	27%	31	29%	12	27%	11	24%
<i>C. glabrata</i>	69	35%	36	33%	16	36%	17	37%
<i>Outras</i>	6	3%	2	2%	2	4%	2	4%
TOTAL	199	100%	108	100%	45	100%	46	100%

VERÃO								
Espécies	Totais		Afluente		Efluente		Biofertilizante	
<i>C. tropicalis</i>	64	36%	37	39%	17	38%	10	27%
<i>C. albicans</i>	45	25%	26	27%	10	22%	9	24%
<i>C. Krusei</i>	38	21%	17	18%	11	24%	10	27%
<i>C. glabrata</i>	22	12%	14	15%	3	7%	5	14%
<i>Outras</i>	8	5%	1	1%	4	9%	3	8%
TOTAL	177	100%	95	54%	45	25%	37	21%

Diversos trabalhos indicam que espécies de *C. tropicalis* isoladas do solo são termotolerantes e suportam temperaturas superiores a 40°C. Esse fato pode explicar a sua predominância no sistema de biodigestão anaeróbia no período do verão.

Os autores Pongsanat e Miyuki (2018) isolaram do solo de uma plantação de cana-de-açúcar, no Taiwan, cerca de 16 *C. tropicalis* que sobreviveram e apresentaram atividade metabólica a temperaturas de até 42°C. No trabalho de Kuntiya, Takenaka e Seesuriyachan (2013) foi descrito uma cepa de *C. tropicalis* termotolerante (42°C) e degradadora de fenol isolada de solo contaminado com produtos químicos, na Tailândia. Os autor Buddiwong *et al.* (2014) também da Tailândia isolaram cerca de 14 cepas de *C. tropicalis* do solo de plantação de cana-de-açúcar, essas cepas foram testadas quanto a sua termotolerância e sobreviveram a 45°C.

Considerando a distribuição mundial de *C. tropicalis*, é visto que ela é predominante em regiões tropicais e é a espécie não-*albicans* mais frequentemente isolada de solo (PONGSANAT; MIYUKI, 2018; YANG *et al.*, 2012). Os autores Yang *et al.* (2012) avaliando a susceptibilidade de isolados de *C. tropicalis* de solo agrícola

no Taiwan ao antifúngico fluconazol, constatou CIM maior que 64mg/L, sugerindo que o solo é fonte de *C. tropicalis* resistente.

Com relação a predominância de *C. glabrata* no período de inverno, trabalhos como dos autores Azie *et al.* (2012), Lortholary *et al.* (2014), Milazzo *et al.* (2014) e Pfaller *et al.* (2013) mostram maior prevalência dessa espécie em regiões de temperatura fria.

O fato dessas espécies de *Candida* terem sido encontradas tanto no afluente quanto no biofertilizante é preocupante, visto que o biofertilizante produzido na fazenda experimental da EMBRAPA Gado de Leite, além de ser usado para a irrigação, também é reaproveitado para a lavagem dos currais, ou seja, é criado um ciclo em que as leveduras sempre estarão em contato com o animal e/ou homem (FIGURA 14). Esse fato também ocorre em muitas produções agrícolas e sem o correto controle do impacto que pode causar (OTENIO, 2015).

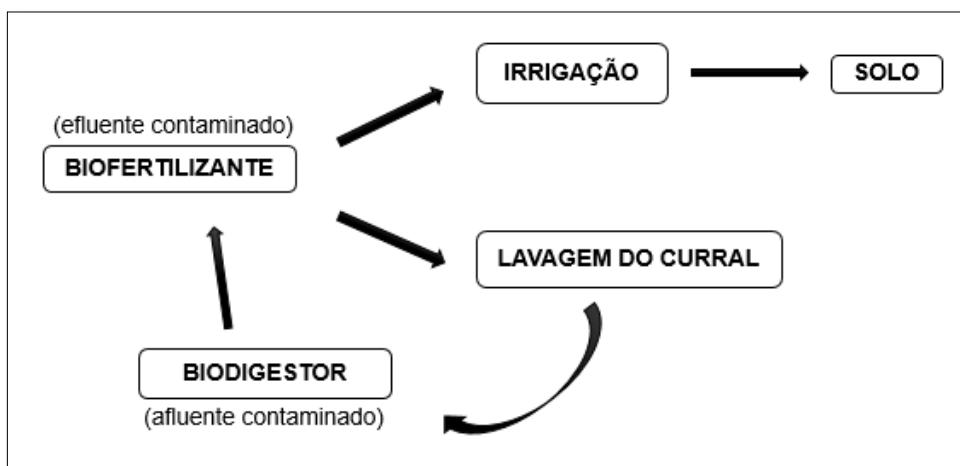


Figura 8: Fluxo de contaminação das leveduras do gênero *Candida* entre biodigestor/animal/homem.

A presença dessas espécies no ambiente de confinamento e pastejo é de suma importância para a pecuária mundial, visto que a mastite de origem fúngica é causada principalmente por espécies do gênero *Candida*, (SARTORI; SANTOS; MARIN, 2014; TÜRKYILMAZ; KAYNARCA, 2010). Embora a mastite fúngica não tenha tanta evidência quanto a bacteriana, foi relatado um aumento de 16% nos casos dessa doença nos últimos anos, sendo a infecção pelo gênero *Candida* a 3ª maior causa de mastites no Brasil (ACOSTA *et al.*, 2016; BRITO *et al.*, 2009). A causa da mastite

fúngica, em geral, é devido ao prolongado tratamento com antifúngicos, abaixando a imunidade dos animais e também pela higiene do confinamento, do local de ordenha e dos trabalhadores rurais (ŞEKER, 2010).

Em minas Gerais, os autores (COSTA, *et al.*, 2008; COSTA, *et al.*, 2012) relatam que as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, dentre outras, são encontradas em leites provenientes de vacas com mastite. Um estudo na Turquia isolou cerca de 207 espécies de *Candida* a partir de vacas com mastite e as espécies encontradas foram *C. krusei*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, dentre outras (ŞEKER, 2010). Ainda na Turquia, os autores Türkyilmaz e Kaynarca (2010) isolaram predominantemente *C. krusei* de leite proveniente de vacas doentes. Os autores Santos e Marin (2005) estudaram diversos rebanhos brasileiros e dentre as espécies de *Candida* isoladas de leite ordenhado de vacas com mastite estão *C. krusei* e *C. albicans*. Também em um estudo randomizado pelos rebanhos brasileiros, os autores (SARTORI; SANTOS; MARIN, 2014) isolaram as espécies *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. glabrata* a partir de leite proveniente de vacas infectadas.

A mastite em geral afeta diretamente a economia do país, pois há a redução da produtividade do rebanho e também o aumento dos gastos com o tratamento dos animais (ACOSTA *et al.*, 2016; SARTORI; SANTOS; MARIN, 2014; ŞEKER, 2010; SPANAMBERG *et al.*, 2009). Além disso o consumo do leite cru contaminado é perigoso para os imunossuprimidos (SARTORI; SANTOS; MARIN, 2014) e o excesso de antifúngico administrado para as vacas aumenta o risco de sua sucessão no leite, tornando-se um problema também ao homem (ACOSTA *et al.*, 2016).

A origem dessas espécies no processo de biodigestão e o quão elas podem afetar o animal e/ou homem, devem ser melhores estudados, contudo, a princípio podemos inferir que esse gênero possui leveduras amplamente distribuídas e com mecanismos de sobrevivência eficazes (tolerância a variações de temperatura e pH, produção de enzimas extracelulares, formação de biofilme e pseudohifas), o que possibilitaria sua sucessão no biofertilizante, animal, solo e homem. Dessa forma pesquisas que envolvam o gênero *Candida* no ambiente pecuário precisam ser ampliadas, principalmente para o melhor conhecimento e controle de contaminações dos animais e do homem por essas leveduras.

5.3 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

A reativação das 376 cepas de *Candida* spp. foi realizada em meio BHI líquido por até 72h a 36°C, dessas, 216 se mostraram viáveis e puras (TABELA 6).

Dentre as cepas viáveis a sobrevivência por espécie, obtidas após crescimento em meio específico e diferencial, foi estimada em 41% para *C. krusei*, 57% para *C. albicans*, 73% para *C. tropicalis*, 79% para *C. glabrata* e 100% para “outras”. A perda de viabilidade das cepas pode ser decorrente do processo de congelamento a -80°C.

Tabela 6: Isolados viáveis obtidos após congelamento e transporte.

Isolados viáveis obtidos do processo da biodigestão anaeróbica											
<i>C. albicans</i>	275	<i>C. albicans</i>	238	<i>C. glabrata</i>	49	<i>C. krusei</i>	7	<i>C. tropicalis</i>	138	<i>C. tropicalis</i>	
27	<i>C. albicans</i>	282	<i>C. albicans</i>	239	<i>C. glabrata</i>	57	<i>C. krusei</i>	9	<i>C. tropicalis</i>	142	<i>C. tropicalis</i>
28	<i>C. albicans</i>	288	<i>C. albicans</i>	243	<i>C. glabrata</i>	67	<i>C. krusei</i>	12	<i>C. tropicalis</i>	144	<i>C. tropicalis</i>
33	<i>C. albicans</i>	289	<i>C. albicans</i>	246	<i>C. glabrata</i>	85	<i>C. krusei</i>	15	<i>C. tropicalis</i>	154	<i>C. tropicalis</i>
34	<i>C. albicans</i>	291	<i>C. albicans</i>	258	<i>C. glabrata</i>	91	<i>C. krusei</i>	16	<i>C. tropicalis</i>	163	<i>C. tropicalis</i>
39	<i>C. albicans</i>	293	<i>C. albicans</i>	262	<i>C. glabrata</i>	100	<i>C. krusei</i>	17	<i>C. tropicalis</i>	167	<i>C. tropicalis</i>
44	<i>C. albicans</i>	344	<i>C. albicans</i>	270	<i>C. glabrata</i>	102	<i>C. krusei</i>	19	<i>C. tropicalis</i>	170	<i>C. tropicalis</i>
47	<i>C. albicans</i>	346	<i>C. albicans</i>	273	<i>C. glabrata</i>	113	<i>C. krusei</i>	20	<i>C. tropicalis</i>	172	<i>C. tropicalis</i>
53	<i>C. albicans</i>	347	<i>C. albicans</i>	274	<i>C. glabrata</i>	115	<i>C. krusei</i>	21	<i>C. tropicalis</i>	178	<i>C. tropicalis</i>
55	<i>C. albicans</i>	365	<i>C. albicans</i>	278	<i>C. glabrata</i>	125	<i>C. krusei</i>	22	<i>C. tropicalis</i>	188	<i>C. tropicalis</i>
59	<i>C. albicans</i>	369	<i>C. albicans</i>	299	<i>C. glabrata</i>	128	<i>C. krusei</i>	23	<i>C. tropicalis</i>	196	<i>C. tropicalis</i>
62	<i>C. albicans</i>	378	<i>C. albicans</i>	307	<i>C. glabrata</i>	141	<i>C. krusei</i>	24	<i>C. tropicalis</i>	207	<i>C. tropicalis</i>
103	<i>C. albicans</i>	381	<i>C. albicans</i>	325	<i>C. glabrata</i>	156	<i>C. krusei</i>	25	<i>C. tropicalis</i>	212	<i>C. tropicalis</i>
105	<i>C. albicans</i>	382	<i>C. albicans</i>	330	<i>C. glabrata</i>	160	<i>C. krusei</i>	31	<i>C. tropicalis</i>	221	<i>C. tropicalis</i>
106	<i>C. albicans</i>	383	<i>C. albicans</i>	335	<i>C. glabrata</i>	171	<i>C. krusei</i>	38	<i>C. tropicalis</i>	250	<i>C. tropicalis</i>
116	<i>C. albicans</i>	386	<i>C. albicans</i>	338	<i>C. glabrata</i>	203	<i>C. krusei</i>	40	<i>C. tropicalis</i>	263	<i>C. tropicalis</i>
126	<i>C. albicans</i>	393	<i>C. albicans</i>	340	<i>C. glabrata</i>	206	<i>C. krusei</i>	46	<i>C. tropicalis</i>		Outras
133	<i>C. albicans</i>	399	<i>C. albicans</i>	342	<i>C. glabrata</i>	208	<i>C. krusei</i>	58	<i>C. tropicalis</i>	151	Outra
148	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>		351	<i>C. glabrata</i>	216	<i>C. krusei</i>	61	<i>C. tropicalis</i>	159	Outra
155	<i>C. albicans</i>	8	<i>C. glabrata</i>	356	<i>C. glabrata</i>	244	<i>C. krusei</i>	63	<i>C. tropicalis</i>	164	Outra
157	<i>C. albicans</i>	26	<i>C. glabrata</i>	358	<i>C. glabrata</i>	249	<i>C. krusei</i>	65	<i>C. tropicalis</i>	165	Outra
168	<i>C. albicans</i>	52	<i>C. glabrata</i>	366	<i>C. glabrata</i>	253	<i>C. krusei</i>	68	<i>C. tropicalis</i>	251	Outra
169	<i>C. albicans</i>	54	<i>C. glabrata</i>	367	<i>C. glabrata</i>	301	<i>C. krusei</i>	69	<i>C. tropicalis</i>	276	Outra
173	<i>C. albicans</i>	77	<i>C. glabrata</i>	372	<i>C. glabrata</i>	316	<i>C. krusei</i>	70	<i>C. tropicalis</i>	339	Outra
179	<i>C. albicans</i>	108	<i>C. glabrata</i>	373	<i>C. glabrata</i>	317	<i>C. krusei</i>	71	<i>C. tropicalis</i>	349	Outra
185	<i>C. albicans</i>	110	<i>C. glabrata</i>	374	<i>C. glabrata</i>	320	<i>C. krusei</i>	74	<i>C. tropicalis</i>	350	Outra
191	<i>C. albicans</i>	114	<i>C. glabrata</i>	375	<i>C. glabrata</i>	321	<i>C. krusei</i>	75	<i>C. tropicalis</i>	396	Outra
200	<i>C. albicans</i>	121	<i>C. glabrata</i>	377	<i>C. glabrata</i>	326	<i>C. krusei</i>	81	<i>C. tropicalis</i>	76	Outra
210	<i>C. albicans</i>	122	<i>C. glabrata</i>	379	<i>C. glabrata</i>	328	<i>C. krusei</i>	97	<i>C. tropicalis</i>	95	Outra
217	<i>C. albicans</i>	131	<i>C. glabrata</i>	385	<i>C. glabrata</i>	370	<i>C. krusei</i>	107	<i>C. tropicalis</i>	98	Outra
219	<i>C. albicans</i>	143	<i>C. glabrata</i>	387	<i>C. glabrata</i>	391	<i>C. krusei</i>	109	<i>C. tropicalis</i>	111	Outra
224	<i>C. albicans</i>	145	<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>	395	<i>C. krusei</i>	119	<i>C. tropicalis</i>		
229	<i>C. albicans</i>	166	<i>C. glabrata</i>	30	<i>C. krusei</i>	397	<i>C. krusei</i>	120	<i>C. tropicalis</i>		
234	<i>C. albicans</i>	183	<i>C. glabrata</i>	35	<i>C. krusei</i>		<i>C. tropicalis</i>	123	<i>C. tropicalis</i>		
240	<i>C. albicans</i>	202	<i>C. glabrata</i>	36	<i>C. krusei</i>	1	<i>C. tropicalis</i>	129	<i>C. tropicalis</i>		
245	<i>C. albicans</i>	215	<i>C. glabrata</i>	41	<i>C. krusei</i>	3	<i>C. tropicalis</i>	130	<i>C. tropicalis</i>		
247	<i>C. albicans</i>	226	<i>C. glabrata</i>	43	<i>C. krusei</i>	5	<i>C. tropicalis</i>	134	<i>C. tropicalis</i>		
260	<i>C. albicans</i>	237	<i>C. glabrata</i>	48	<i>C. krusei</i>	6	<i>C. tropicalis</i>	135	<i>C. tropicalis</i>		

5.4 TRIAGEM DOS ISOLADOS

Na primeira etapa da triagem dos isolados foi feito o teste de dimorfismo. Entre os 216 isolados, os identificados como *C. krusei* não foram capazes de filamentar, para *C. albicans* 11% apresentaram capacidade para produzir hifa, já para *C. tropicalis* 66% foram dimórficas e para “outras” cerca de 57% dos isolados produziram hifas. Um fato curioso observado foi que cerca de 6% das espécies de *C. glabrata* (três isolados) apresentaram dimorfismo, característica essa pouco relatada nesta espécie (FIGURA 10) (TABELA 7).

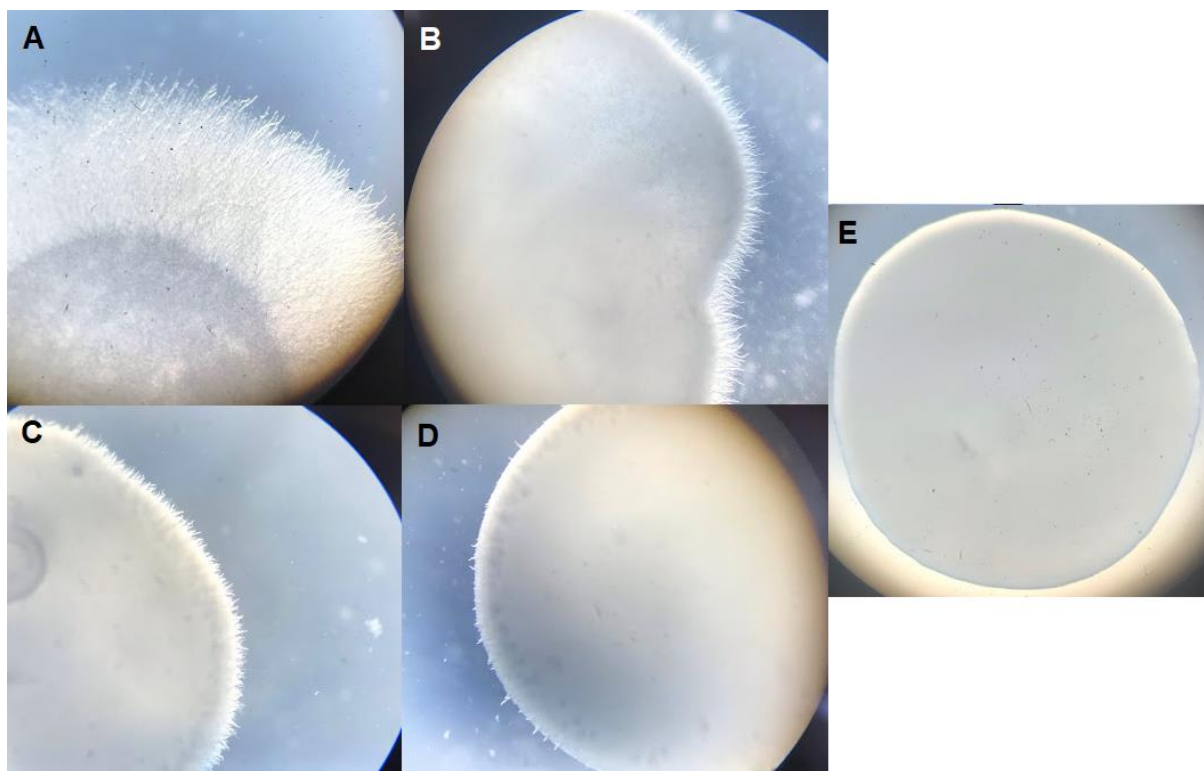


Figura 9: Microscopia mostrando filamentos produzidos durante o teste de dimorfismo. Em A é mostrado o dimorfismo em um isolado de *Candida albicans* e em B, C e D as hifas/pseudohifas produzidas pelas cepas isoladas de *Candida glabrata*, 262, 299 e 307, respectivamente. Já em E é representado o controle negativo de *Candida glabrata* para produção de hifas/pseudohifas.

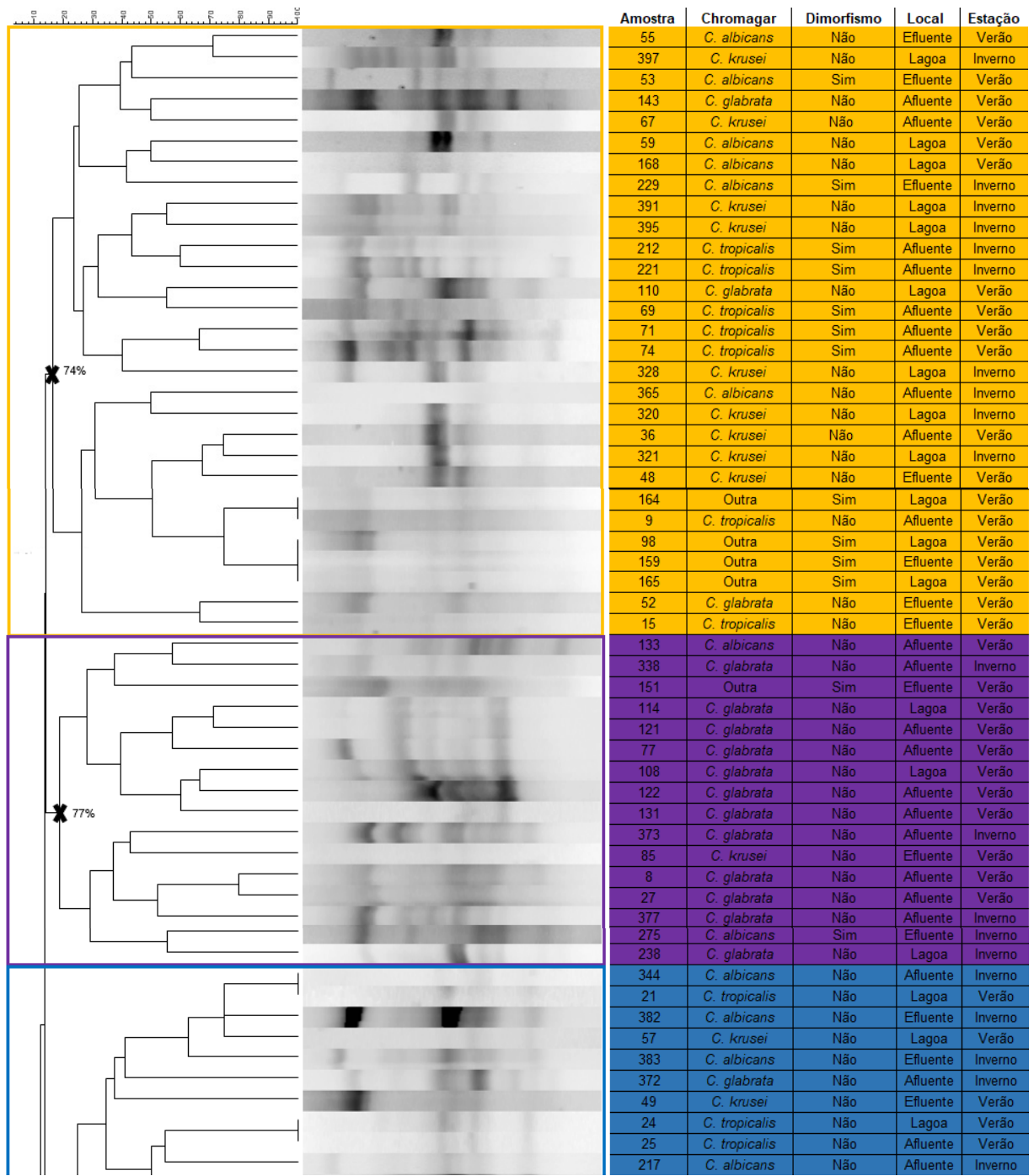
Tabela 7: Teste de dimorfismos dos isolados, numerados no canto esquerdo e cepas padrões.

Classificação Crhomagar			Classificação Crhomagar		
		Dimorfismo			Dimorfismo
	<i>C. albicans</i> SC 5314	Sim	48	<i>C. krusei</i>	Não
53	<i>C. albicans</i>	Sim	171	<i>C. krusei</i>	Não
106	<i>C. albicans</i>	Não	253	<i>C. krusei</i>	Não
116	<i>C. albicans</i>	Sim	316	<i>C. krusei</i>	Não
157	<i>C. albicans</i>	Não	326	<i>C. krusei</i>	Não
185	<i>C. albicans</i>	Não		<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	Não
210	<i>C. albicans</i>	Não	52	<i>C. glabrata</i>	Não
229	<i>C. albicans</i>	Sim	77	<i>C. glabrata</i>	Não
282	<i>C. albicans</i>	Não	166	<i>C. glabrata</i>	Não
291	<i>C. albicans</i>	Sim	258	<i>C. glabrata</i>	Não
347	<i>C. albicans</i>	Não	262	<i>C. glabrata</i>	Sim
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Sim	299	<i>C. glabrata</i>	Sim
19	<i>C. tropicalis</i>	Não	307	<i>C. glabrata</i>	Sim
24	<i>C. tropicalis</i>	Não	358	<i>C. glabrata</i>	Não
63	<i>C. tropicalis</i>	Sim	387	<i>C. glabrata</i>	Não
81	<i>C. tropicalis</i>	Sim	76	Outra	Sim
107	<i>C. tropicalis</i>	Sim	98	Outra	Sim
119	<i>C. tropicalis</i>	Não	151	Outra	Sim
196	<i>C. tropicalis</i>	Sim	251	Outra	Não
	<i>C. krusei</i> ATCC 20298	Sim	276	Outra	Não
41	<i>C. krusei</i>	Não	349	Outra	Não

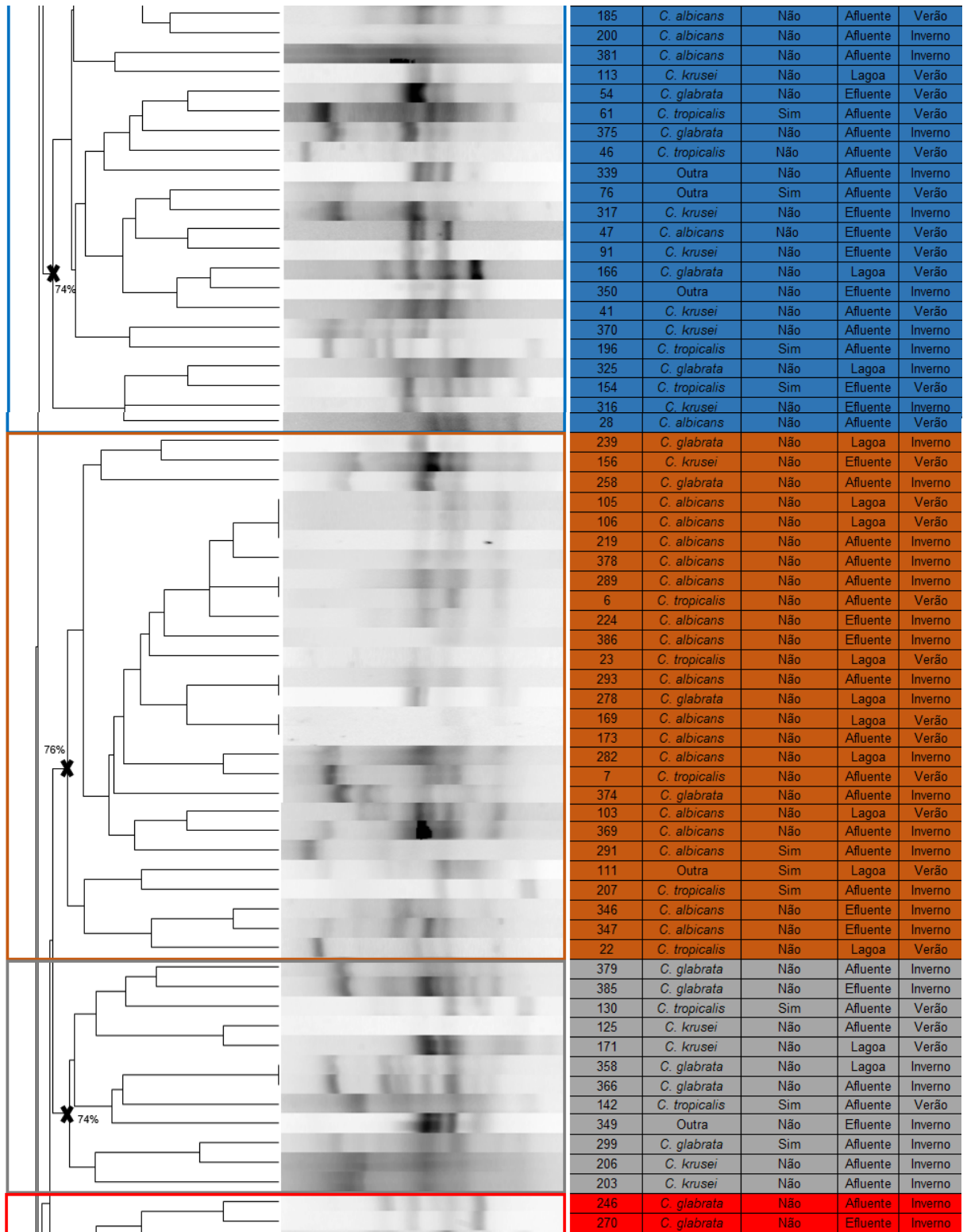
A produção de hifas/pseudohifas por *C. glabrata* ainda não é reconhecida como uma característica da espécie, contudo estudos como de Lachke *et al.* (2002) demonstraram que a maioria das cepas de *C. glabrata* isoladas de ambiente hospitalar foram capazes de produzir pseudohifas e ainda relata casos antigos do mesmo acontecimento, como dos autores Brandao *et al.* (1995), Csank e Haynes (2000) e Odds *et al.* (1997). Os autores Sasani *et al.* (2016) avaliaram ainda a capacidade de *C. glabrata* produzir filamento sob diferentes níveis de CO₂ e observaram que a 10% a maioria das cepas foram capazes de filamentar.

Na segunda etapa da triagem dos isolados foi realizado o agrupamento das leveduras por *fingerprint* da região (GTG)5. As 216 amostras formaram 10 clados separados por nó de confiabilidade superior a 70% (TABELA 8).

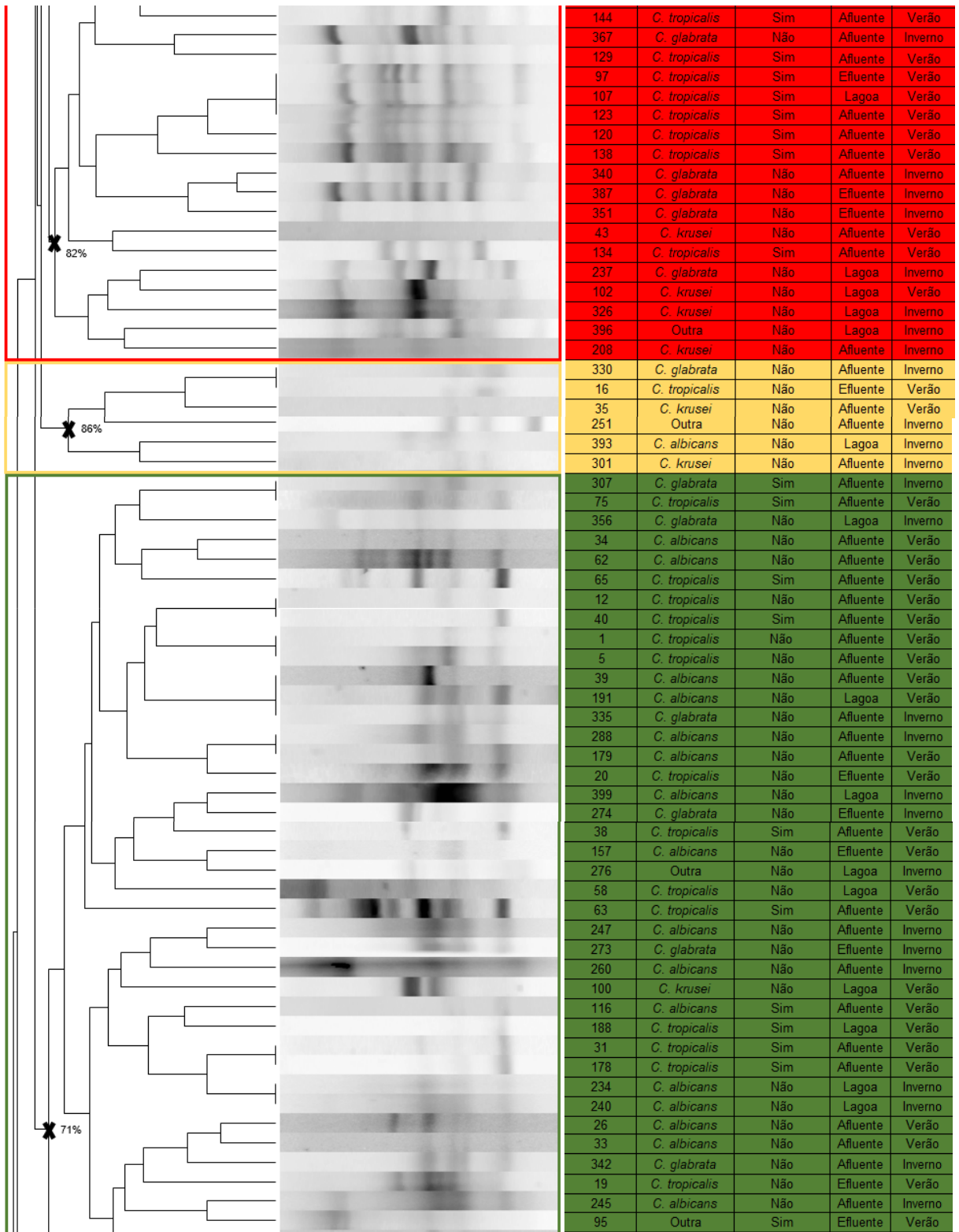
Tabela 8: Impressão digital da região (GTG)5 dos 216 isolados.



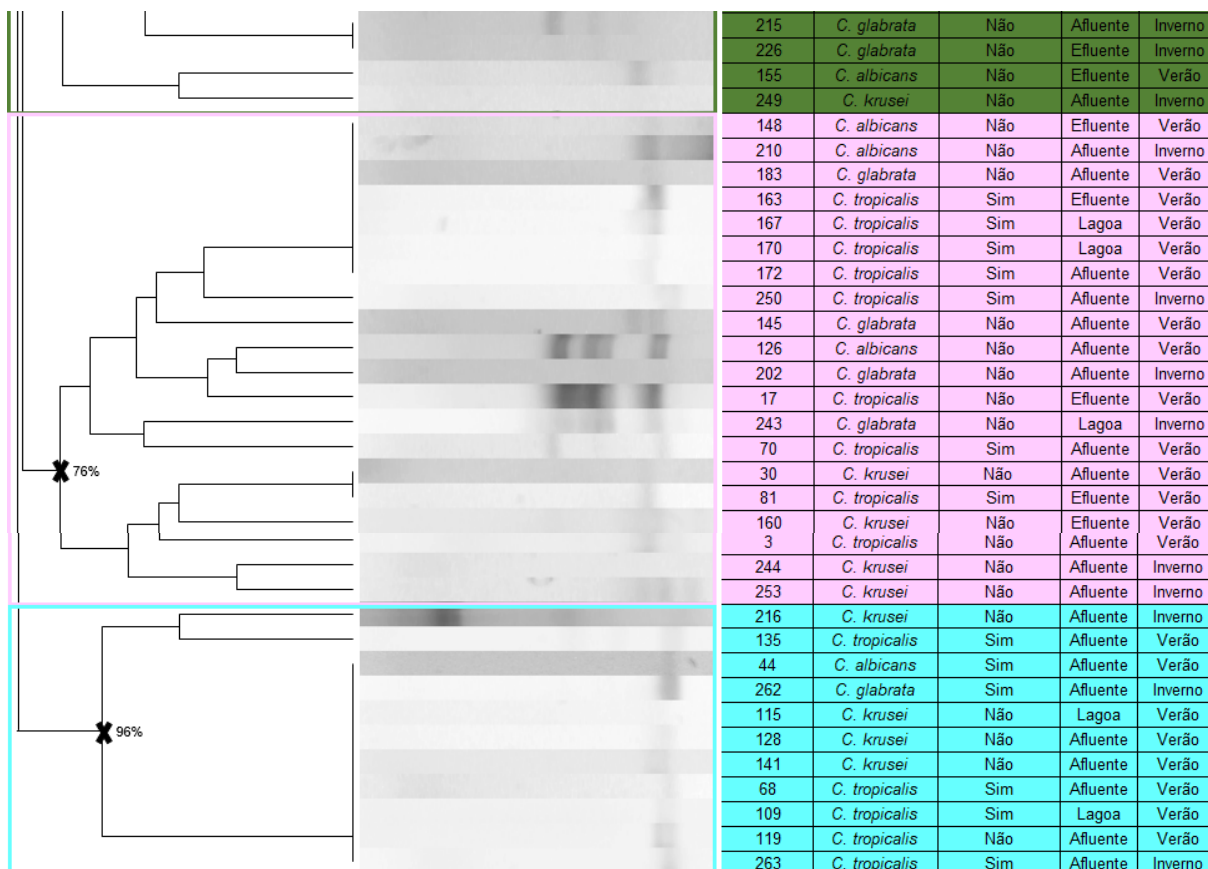
(Continua...)



(Continua...)



(Continua...)



A partir dos dados de agrupamento molecular foram selecionados 38 isolados para as análises de virulência, como base na capacidade de filamentação, estação do ano isolado e local de isolamento (TABELA 9). Para essa seleção algumas espécies não preencheram todos os critérios citados anteriormente, como por exemplo *C. krusei*, em que nenhum isolado apresentou dimorfismo e *C. tropicalis*, que durante o inverno apenas um isolado do afluente do biodigestor foi encontrado. Dessa forma, os isolados com essas características não foram substituídos.

Tabela 9: Isolados selecionados para análise de virulência.

Amostra	Chromagar	Dimorfismo	Local	Estação
19	<i>C. tropicalis</i>	Não	Efluente	Verão
24	<i>C. tropicalis</i>	Não	Lagoa	Verão
41	<i>C. krusei</i>	Não	Afluente	Verão
48	<i>C. krusei</i>	Não	Efluente	Verão
52	<i>C. glabrata</i>	Não	Efluente	Verão
53	<i>C. albicans</i>	Sim	Efluente	Verão
63	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Afluente	Verão
76	Outra	Sim	Afluente	Verão
77	<i>C. glabrata</i>	Não	Afluente	Verão
81	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Efluente	Verão
98	Outra	Sim	Lagoa	Verão
106	<i>C. albicans</i>	Não	Lagoa	Verão
107	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Lagoa	Verão
116	<i>C. albicans</i>	Sim	Afluente	Verão
119	<i>C. tropicalis</i>	Não	Afluente	Verão
151	Outra	Sim	Efluente	Verão
157	<i>C. albicans</i>	Não	Efluente	Verão
166	<i>C. glabrata</i>	Não	Lagoa	Verão
171	<i>C. krusei</i>	Não	Lagoa	Verão
185	<i>C. albicans</i>	Não	Afluente	Verão
196	<i>C. tropicalis</i>	Sim	Afluente	Inverno
210	<i>C. albicans</i>	Não	Afluente	Inverno
229	<i>C. albicans</i>	Sim	Efluente	Inverno
251	Outra	Não	Afluente	Inverno
253	<i>C. krusei</i>	Não	Afluente	Inverno
258	<i>C. glabrata</i>	Não	Afluente	Inverno
262	<i>C. glabrata</i>	Sim	Afluente	Inverno
276	Outra	Não	Lagoa	Inverno
282	<i>C. albicans</i>	Não	Lagoa	Inverno
291	<i>C. albicans</i>	Sim	Afluente	Inverno
299	<i>C. glabrata</i>	Sim	Afluente	Inverno
307	<i>C. glabrata</i>	Sim	Afluente	Inverno
316	<i>C. krusei</i>	Não	Efluente	Inverno
326	<i>C. krusei</i>	Não	Lagoa	Inverno
347	<i>C. albicans</i>	Não	Efluente	Inverno
349	Outra	Não	Efluente	Inverno
358	<i>C. glabrata</i>	Não	Lagoa	Inverno
387	<i>C. glabrata</i>	Não	Efluente	Inverno

5.5 AVALIAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA

Após o teste de Spearman, utilizando-se o software GraphPrism, foi observado que nem todas as características se correlacionavam, dessa forma, na continuidade dos resultados é relatado e discutido a caracterização das cepas isoladas, e quando observada correlação significativa entre as características ($p < 0,05$), essas foram descritas e discutidas.

5.5.1 Produção de biofilme

A capacidade de formação de biofilme foi detectada em todos os isolados (TABELA 10), sendo produtor fraco cerca de 71% e produtor moderado 29% das cepas. Dos produtores moderados a maioria é da espécie *C. albicans* (45,5%). No trabalho de Ahmed *et al.* (2019) os maiores produtores de biofilme foram as espécies não *albicans* isoladas de pacientes hospitalares, da mesma forma o trabalho de Arora *et al.* (2017). Os autores Arora *et al.* (2017) isolaram 142 espécies de *Candida* de pacientes com candidemia, dentre elas, 90 eram *C. albicans* e a taxa de formação de biofilme foi maior para as *Candida* não-*albicans*.

Os autores Guembe *et al.* (2017), em estudo feito com isolados de pacientes hospitalizados, correlacionam que quanto maior a produção de biofilme mais severa é a infecção no hospedeiro e ainda afirmam que o local em que os isolados se instalam tem relação direta com a produção de biofilme.

Além disso foi observada uma correlação estatística ($p < 0,05$) entre a produção de biofilme e as *Candida glabrata* dimórficas, em que as cepas 262 e 299 produtoras moderadas de biofilme são também produtoras de hifas/pseudohifas.

Os microrganismos isolados neste trabalho, de um ambiente agropecuário, mostraram características diferentes, com relação a formação de biofilme, daquelas cepas ATCC (origem hospitalar). Fato esse que demonstra a existência de diferenças metabólicas e adaptativas entre isolados hospitalares e ambientais, o que deixa um caminho aberto e prospectivo para estudos mais aprofundados de virulência em isolados possivelmente patogênicos no ambiente.

Tabela 10: Produção de biofilme, *in vitro*, dos isolados de *Candida*.

Classificação Crhomagar		Biofilme	Classificação Crhomagar		Biofilme
	<i>C. albicans</i> SC 5314	(+)	48	<i>C. krusei</i>	Fraco
53	<i>C. albicans</i>	Moderado	171	<i>C. krusei</i>	Fraco
106	<i>C. albicans</i>	Moderado	253	<i>C. krusei</i>	Moderado
116	<i>C. albicans</i>	Moderado	316	<i>C. krusei</i>	Fraco
157	<i>C. albicans</i>	Fraco	326	<i>C. krusei</i>	Fraco
185	<i>C. albicans</i>	Fraco		<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	(+)
210	<i>C. albicans</i>	Fraco	52	<i>C. glabrata</i>	Fraco
229	<i>C. albicans</i>	Fraco	77	<i>C. glabrata</i>	Fraco
282	<i>C. albicans</i>	Moderado	166	<i>C. glabrata</i>	Fraco
291	<i>C. albicans</i>	Fraco	258	<i>C. glabrata</i>	Fraco
347	<i>C. albicans</i>	Moderado	262	<i>C. glabrata</i>	Moderado
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	(+)	299	<i>C. glabrata</i>	Moderado
19	<i>C. tropicalis</i>	Fraco	307	<i>C. glabrata</i>	Fraco
24	<i>C. tropicalis</i>	Fraco	358	<i>C. glabrata</i>	Fraco
63	<i>C. tropicalis</i>	Moderado	387	<i>C. glabrata</i>	Fraco
81	<i>C. tropicalis</i>	Fraco	76	Outra	Fraco
107	<i>C. tropicalis</i>	Moderado	98	Outra	Fraco
119	<i>C. tropicalis</i>	Fraco	151	Outra	Fraco
196	<i>C. tropicalis</i>	Fraco	251	Outra	Moderado
	<i>C. krusei</i> ATCC 20298	(+)	276	Outra	Fraco
41	<i>C. krusei</i>	Fraco	349	Outra	Fraco

5.5.2 Produção de exoenzimas (fosfolipase e protease)

Com relação a produção da fosfolipase (FIGURA 11) (TABELA 11), cerca de 52,6% dos isolados foram produtores, variando entre moderado (15%), forte (40%) e muito forte (45%). Os isolados de *C. albicans* foram os menos produtores, com apenas uma cepa produtora “forte” (isolado número 53). Contudo, todos os isolados de *C. krusei* foram produtores, em sua maioria “muito forte”, sendo a cepa ATCC de origem hospitalar não produtora. Dos isolados de *C. glabrata* apenas 33,33% não apresentaram atividade, sendo a ATCC 90030 também não produtora.

Tabela 11: Produção de exoenzimas, *in vitro*, dos isolados de *Candida*.

Classificação Crhomagar Fosfolipase Proteinase				Classificação Crhomagar Fosfolipase Proteinase			
	<i>C. albicans</i> SC 5314	(+)	(+)	48	<i>C. krusei</i>	Muito Forte	Não produz
53	<i>C. albicans</i>	Forte	Não produz	171	<i>C. krusei</i>	Moderado	Não produz
106	<i>C. albicans</i>	Não produz	Não produz	253	<i>C. krusei</i>	Forte	Não produz
116	<i>C. albicans</i>	Não produz	Forte	316	<i>C. krusei</i>	Muito Forte	Não produz
157	<i>C. albicans</i>	Não produz	Moderado	326	<i>C. krusei</i>	Muito Forte	Não produz
185	<i>C. albicans</i>	Não produz	Não produz		<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	(-)	(-)
210	<i>C. albicans</i>	Não produz	Moderado	52	<i>C. glabrata</i>	Forte	Não produz
229	<i>C. albicans</i>	Não produz	Não produz	77	<i>C. glabrata</i>	Forte	Não produz
282	<i>C. albicans</i>	Não produz	Não produz	166	<i>C. glabrata</i>	Moderado	Não produz
291	<i>C. albicans</i>	Não produz	Não produz	258	<i>C. glabrata</i>	Muito Forte	Não produz
347	<i>C. albicans</i>	Não produz	Não produz	262	<i>C. glabrata</i>	Muito Forte	Não produz
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	(+)	(-)	299	<i>C. glabrata</i>	Não produz	Não produz
19	<i>C. tropicalis</i>	Não produz	Não produz	307	<i>C. glabrata</i>	Não produz	Não produz
24	<i>C. tropicalis</i>	Não produz	Não produz	358	<i>C. glabrata</i>	Não produz	Não produz
63	<i>C. tropicalis</i>	Forte	Não produz	387	<i>C. glabrata</i>	Forte	Não produz
81	<i>C. tropicalis</i>	Forte	Não produz	76	Outra	Não produz	Não produz
107	<i>C. tropicalis</i>	Moderado	Não produz	98	Outra	Não produz	Não produz
119	<i>C. tropicalis</i>	Forte	Não produz	151	Outra	Não produz	Não produz
196	<i>C. tropicalis</i>	Forte	Não produz	251	Outra	Muito Forte	Não produz
	<i>C. krusei</i> ATCC 20298	(-)	(-)	276	Outra	Forte	Não produz
41	<i>C. krusei</i>	Muito Forte	Não produz	349	Outra	Não produz	Não produz

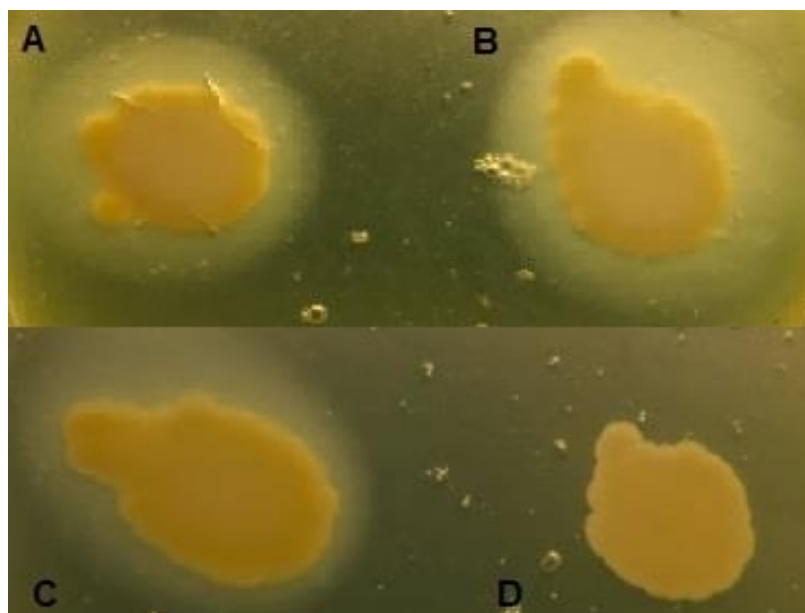


Figura 10: Zona de precipitação observada no teste de produção da exoenzima fosfolipase, em que “A” é a cepa 253, “B” a cepa 258, “C” a cepa 276 e “D” a ATCC 20298 controle negativo.

Os trabalhos encontrados na literatura, em estudos com isolados clínicos de *Candida*, relatam o oposto do observado aqui, mostrando mais uma vez a importância de se estudar e conhecer melhor leveduras potencialmente patogênicas oriundas do ambiente agropecuário. O trabalho de Shirkhani *et al.* (2016) mostra que a maioria dos isolados de *Candida* de vulvovaginite não foram produtores de fosfolipase (74,4%). Da mesma forma, os autores Akinjogunla, Ajayi e Nkanga (2018) identificaram a produção da exoenzima fosfolipase em apenas 21,7% dos isolados de *Candida* de pacientes internados com quadro de diarreia. Os autores Andreola *et al.* (2016) estudaram 35 isolados clínicos de *Candida*, em sua maioria da espécie *albicans*, e apenas 29% apresentaram atividade para a exoenzima fosfolipase. No trabalho dos pesquisadores Sharma, Chumber e Kaur (2017), foi estudado 35 isolados de *Candida albicans*, no qual apenas 19% foram produtoras de fosfolipase.

A produção de protease foi observada em apenas três cepas de *C. albicans*, sendo uma produtora forte e o restante moderado (FIGURA 17) (TABELA 11).

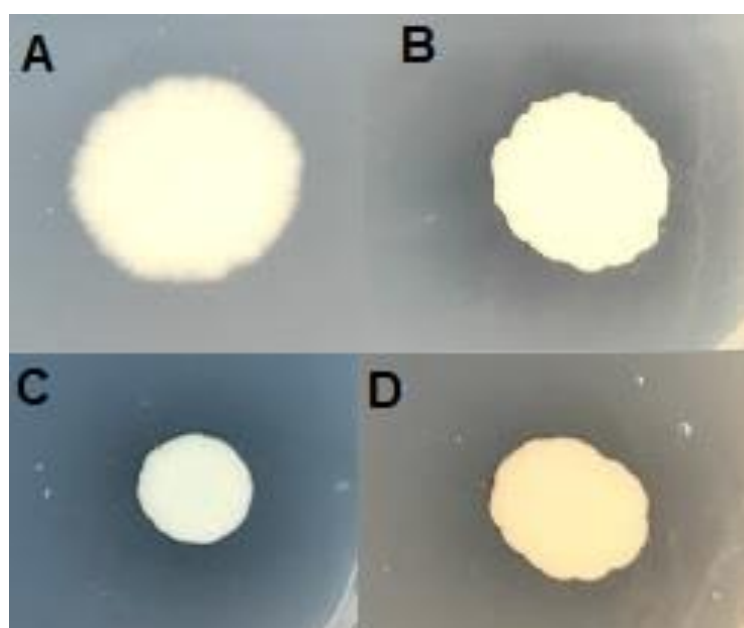


Figura 11: Zona de precipitação observada no teste de produção da exoenzima protease, em que “A” é a cepa não produtora, “B” a cepa 210, “C” a cepa 116 e “D” a cepa 157.

O trabalho de Emam, Elazm e Morad (2012) mostrou que cerca de 57,8% dos isolados de *Candida* de vulvovaginite foram produtores de protease, sendo a espécie com mais atividade a *C. albicans*. Já os autores Serda, Kantarciolu e Yücel (2002)

encontraram cerca de 78,9% de atividade da enzima protease em isolados de pacientes diagnosticados com candidemia, com *C. albicans* também sendo a espécie mais produtora. No trabalho dos autores Andreola e colaboradores (2016) foi testado 27 isolados de *C. albicans* de origem hospitalar quanto a produção da exoenzima protease e cerca de 97% apresentaram atividade. No mesmo trabalho, as cepas não-*albicans* testadas tiveram cerca de 88% de atividade. Igualmente aos trabalhos citados acima, os autores Dabiri, Shams-Ghahfarokhi e Razzaghi-Abyaneh (2018) relataram a produção de protease em 96,7% dos isolados clínicos de *Candida*, mostrando mais uma vez a diferença fisiológica entre cepas de mesma espécie isoladas de ambientes diferentes (hospitalar e agropecuário) e a importância de uma maior atenção a espécies leveduriformes potencialmente patogênicas oriundas do meio ambiente.

5.5.3 Susceptibilidade *in vitro* dos isolados aos antifúngicos

Para todas os isolados, as faixas de intervalos de CIM encontradas para cada antifúngico avaliado (anfotericina-B, fluconazol e itraconazol) podem ser observadas na Tabela 12. Na tabela são descritos os valores de CIM₈₀ dos antifúngicos, que correspondem aos valores de CIM em que 80% dos isolados foram inibidos.

Como podemos ver na tabela, nenhum isolado de *Candida albicans* foi resistente ao fluconazol. Esse resultado está em acordo com o observado no estudo de Hizlisoy *et al.* (2020), em que as cepas isoladas a partir de leite contaminado, apenas 2,7% foi resistente ao fluconazol. O trabalho de Mendes *et al.* (2017) avaliou a susceptibilidade de *Candida albicans* isoladas da microbiota de vacas leiteiras frente ao antifúngico fluconazol e cerca de 42,8% foram resistentes. Os pesquisadores Sonmez e Erbas (2017) isolaram *Candida albicans* e não-*albicans* a partir de leite ordenhado de vacas com mastite, e dessas todas foram resistentes ao fluconazol.

O trabalho dos autores Ghaddar *et al.* (2020) analisou 100 *C. albicans* obtidas de vulvovaginite, sendo 90% susceptíveis ao fluconazol. Os pesquisadores Shi *et al.* (2019) encontraram uma taxa de resistência de 65,2% em isolados de *C. albicans* obtidos também de um banco de dados hospitalar e no trabalho de Wang *et al.* (2016),

foi estudado 1714 *C. albicans* originárias de vulvovaginite, e dessas 70,8% foram susceptíveis ao fluconazol.

Essa variação na resistência a antifúngicos está diretamente relacionada ao tipo e local de infecção, a origem do agente infectante e também com tratamentos e contatos prévios da levedura com o antifúngico (PAPPAS *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2017). De acordo com Elmanama e colaboradores (2020) a resistência secundária de *C. albicans* a azóis, como o fluconazol, está relacionada ao tratamento longo e repetido, principalmente naqueles pacientes imunocomprometidos, mas ainda é pouco frequente, sendo a resistência primária quase nula.

Tabela 12: Leitura da CIM₈₀ dos isolados de *Candida* frente aos agentes antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B.

Isolado	MIC			Isolado	MIC		
	Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B		Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B
SC 5315	64 (+)	8 (+)	2 (+)	48	64 Resistente	2 Resistente	2 Resistente
53	4 dose-dep	2 Resistente	4 Resistente	171	64 Resistente	2 Resistente	2 Resistente
106	4 dose-dep	0,5 dose-dep	4 Resistente	253	32 Resistente	2 Resistente	2 Resistente
116	8 Resistente	0,5 dose-dep	2 Resistente	316	32 Resistente	1 Resistente	4 Resistente
157	4 dose-dep	0,5 dose-dep	2 Resistente	326	32 Resistente	2 Resistente	1 Resistente
185	4 dose-dep	0,5 dose-dep	4 Resistente	ATCC 90030	16 (-)	2 (+)	2 (+)
210	4 dose-dep	1 Resistente	4 Resistente	52	8 Suscetível	2 Resistente	2 Resistente
229	2 Suscetível	2 Resistente	4 Resistente	77	8 Suscetível	4 Resistente	4 Resistente
282	4 dose-dep	0,5 dose-dep	2 Resistente	166	8 Suscetível	2 Resistente	4 Resistente
291	2 dose-dep	1 Resistente	4 Resistente	258	32 Suscetível	2 Resistente	2 Resistente
347	8 Resistente	0,5 dose-dep	1 Resistente	262	>64 Resistente	>16 Resistente	1 Resistente
ATCC 750	>64 (+)	>16 (+)	2 (+)	299	2 Suscetível	1 Resistente	4 Resistente
19	2 Suscetível	2 Resistente	1 Resistente	307	2 Suscetível	2 Resistente	4 Resistente
24	4 dose-dep	4 Resistente	2 Resistente	358	64 Resistente	0,5 Resistente	1 Resistente
63	>64 Resistente	>16 Resistente	2 Resistente	387	32 Suscetível	2 Resistente	2 Resistente
81	>64 Resistente	1 Resistente	2 Resistente	76	4 dose-dep	1 Resistente	4 Resistente
107	>64 Resistente	4 Resistente	2 Resistente	98	4 dose-dep	2 Resistente	4 Resistente
119	64 Resistente	16 Resistente	2 Resistente	151	2 Suscetível	1 Resistente	2 Resistente
196	64 Resistente	2 Resistente	4 Resistente	251	2 Suscetível	1 Resistente	4 Resistente
ATCC 20298	8 (+)	2 (+)	2 (+)	276	32 Resistente	2 Resistente	4 Resistente
41	64 Resistente	1 Resistente	2 Resistente	349	16 Resistente	1 Resistente	2 Resistente

A maioria das cepas de *C. tropicalis* (85,7%) foi resistente ou dose-dependente ao fluconazol e essa característica se mostrou diretamente correlacionada ($p < 0,05$) a produção de hifas. O trabalho de Paul e colaboradores em 2018 relatou uma taxa de resistência entre as cepas de *C. tropicalis*, isoladas de um banco de dados hospitalar, em trono de 41,2%. O trabalho dos autores Laprade *et al.* (2016) mostra que cepas

de *Candida* produtoras de hifas e/ou pseudohifas aparentam ter maior resistência a antifúngicos. Além disso, os autores Fan *et al.* (2019) relataram em seu trabalho que pequenas mutações e/ou superexpressão no gene ERG11 são os principais mecanismos responsáveis pela resistência aos azóis em isolados de *C. tropicalis*. O gene ERG11 é fundamental na produção do ergosterol das membranas fúngicas, dessa forma, alterações nesse gene ocasiona maior produção de ergosterol e maior sensibilidade aos azóis (FAN *et al.*, 2019).

Com relação as cepas de *C. glabrata*, apenas 22,2% foram resistentes ao fluconazol, resultado semelhante ao encontrado no trabalho de Arastehfar *et al.*, (2020), que obteve uma taxa de 3,7% de resistência ao fluconazol de isolados de candidemias.

Embora o fluconazol tenha tido baixa taxa de resistência entre os isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, todas as cepas, de todas as espécies, foram resistentes a anfotericina B. Resultado esse preocupante e divergente do encontrado na literatura (GHADDAR *et al.*, 2020; WALSH *et al.*, 2012).

Anfotericina B é um fármaco chave no tratamento da candidemia devido a sua baixa taxa de resistência entre cepas hospitalares (ELMANAMA *et al.*, 2020).

Até então poucas espécies são conhecidas por terem resistência intrínseca a anfotericina B, como *C. lusitanae* e *C. guilliermondii* (). Estudos iniciais mostraram que a resistência secundária a anfotericina B parece ser devido a uma alteração do ergosterol na membrana das leveduras, impossibilitando a ação do antifúngico ().

O fato dessas cepas ambientais terem mostrado resistência a esse antifúngico é preocupante e merece maior atenção e estudos mais aprofundados, para conhecimento da origem dessa resistência e sinais de possível transferência.

Assim como para anfotericina B, todas as cepas, de todas as espécies, foram resistentes ou dose-dependentes para itraconazol, fato esse já relatado em estudos anteriores, como por Arastehfar *et al.* (2020) em que todos os isolados de *Candida* do seu estudo, obtidos de amostras clínicas, foram resistentes. Já no trabalho de Memezes *et al.* (2016), 50% dos isolados de *Candida*, oriundos do canal vaginal, apresentaram susceptibilidade ao antifúngico e, bem semelhante, os autores Santana,

Silva e Araújo (2017) relataram uma taxa de resistência 54,5% de em isolados de *C. albicans* obtidos de secreção vaginal de pacientes.

O antifúngico itraconazol, assim como o fluconazol, pertence à classe dos azóis, que têm como mecanismo de ação inibição da enzima 14 α -esteroidesmetilase, fundamental na cascata de produção do ergosterol. Esses antifúngicos são fármacos de primeira escolha para o tratamento de candidemia, principalmente por sua baixa taxa de intoxicação e espectro de ação, contudo, pelo seu uso prolongado e repetido, muitas leveduras estão desenvolvendo resistência secundária a esse fármaco (ARASTEHFAR *et al.* 2020).

Além da resistência secundária desenvolvida por muitas cepas, existe ainda a resistência intrínseca ou primária, relada principalmente na espécie *C. krusei* (JAMIU *et al.*, 2020). Como é observado na tabela 12 todas as cepas de *C. krusei* foram resistentes aos três antifúngicos testados. Quanto ao fluconazol, já é descrito para essa espécie a resistência intrínseca e resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos (FENG *et al.*, 2016; GONG, J. *et al.*, 2018).

5.5.4 Análise de patogenicidade no modelo invertebrado *C. elegans*

O nematódeo *Caenorhabditis elegans* já é bem estabelecido como modelo invertebrado de infecção. Seu ciclo de vida, em condições normais, é entre 22 e 30 dias a 25°C (ELKABTI; ISSI; RAO, 2018; MYLONAKIS; ABALLAY, 2005).

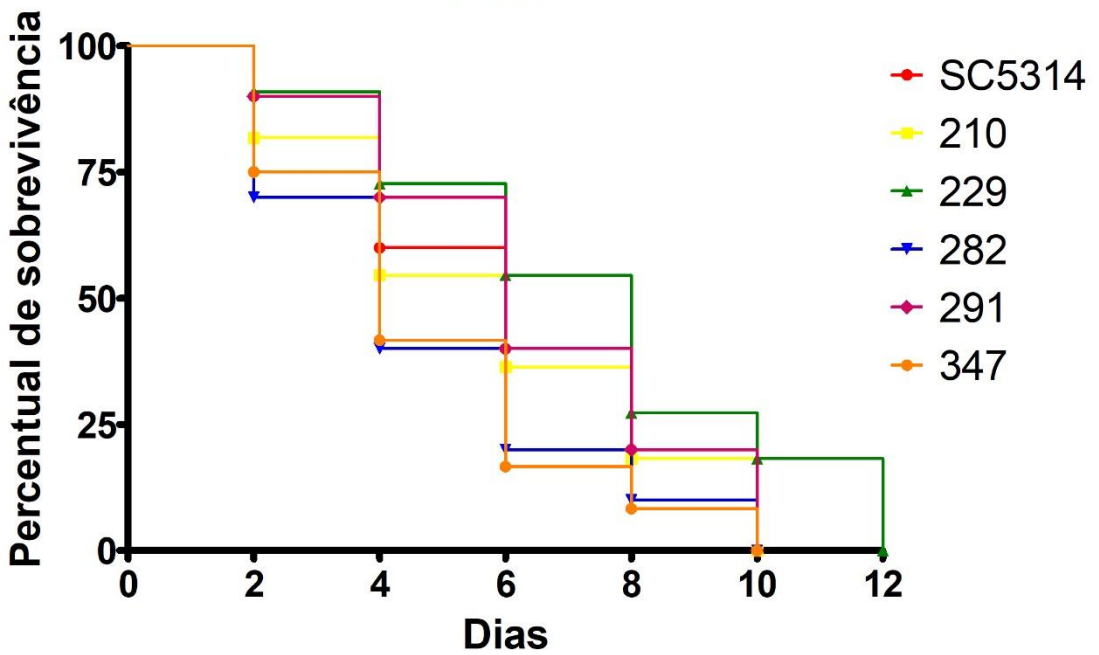
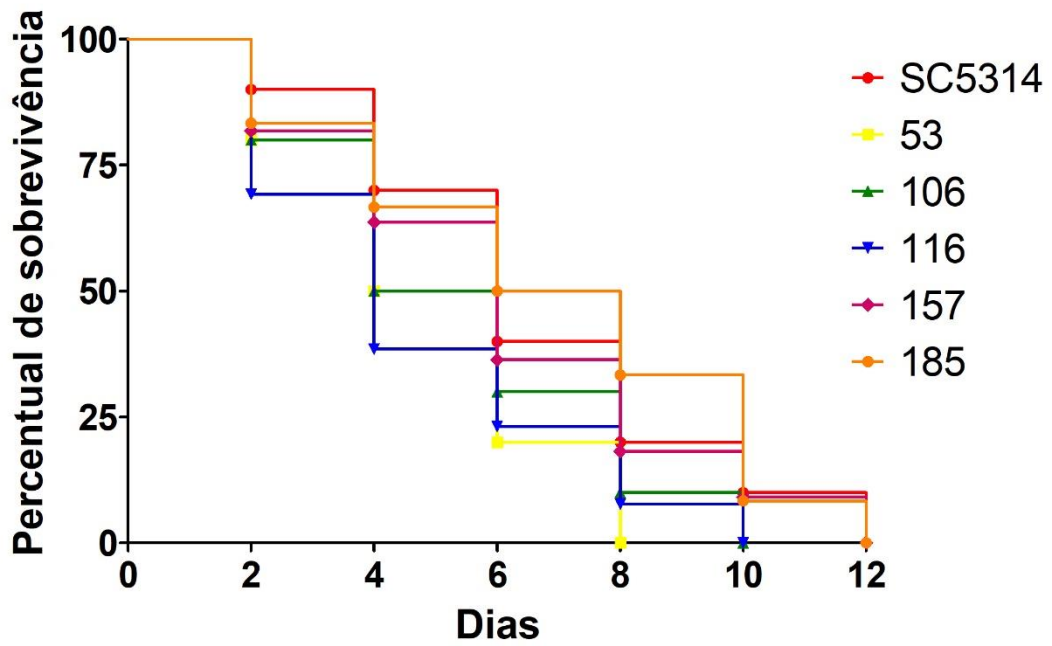
Na natureza, os nematoides ingerem numerosas ameaças de patógenos, fornecendo assim pressão de seleção para evoluir e manter um sofisticado sistema imunológico inato em seu epitélio intestinal, já que não apresenta sistema circulatório (PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011). Dessa forma, a infecção é estabelecida, na maioria das vezes, no intestino do verme no momento em que os nematóides são alimentados em um grama de patógeno (OKOLI *et al.*, 2009). As células epiteliais intestinais de *C. elegans* apresentam uma notável semelhança com as células intestinais humanas, sendo o epitélio intestinal a principal linha de defesa do nematoide contra os patógenos ingeridos (PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011).

Diferentes estudos avaliaram a capacidade de fungos patogênicos infectar e matar o nematódeo *C. elegans*, demonstrando que esse modelo invertebrado pode ser utilizado para a avaliação da interação parasito/hospedeiro e patogenicidade de fungos (CORDEIRO *et al.*, 2016; TROEMEL, 2017).

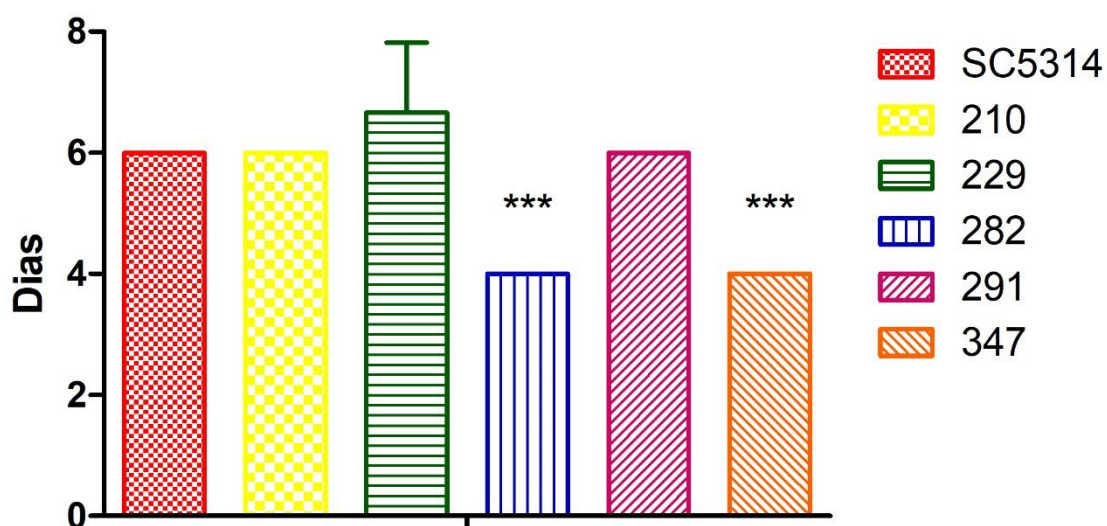
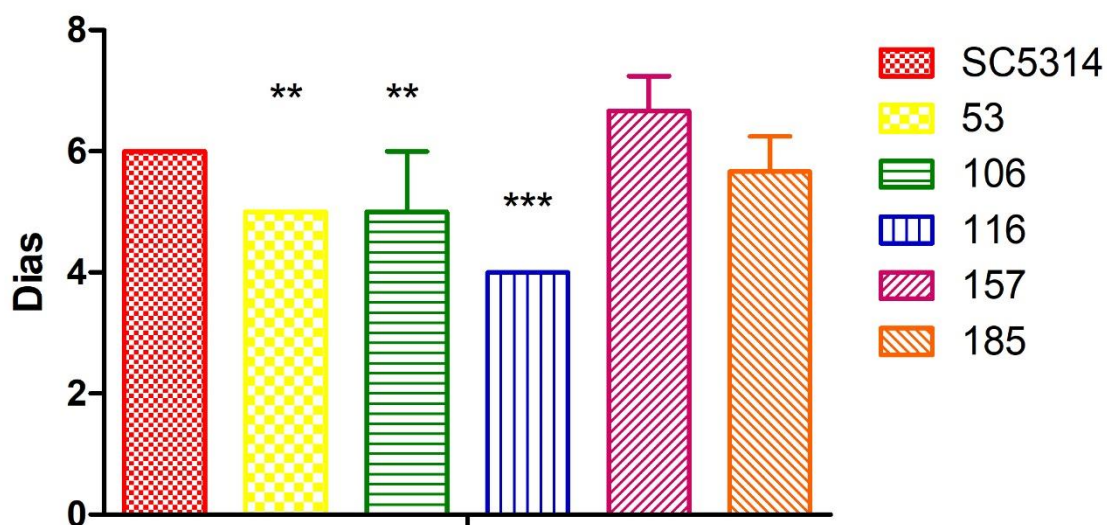
No presente trabalho, foram realizadas análises de sobrevivência de *C. elegans* infectados com *Candida* spp. A infecção ocorre colocando os vermes para se alimentarem dos microrganismos em placas e, em seguida, são feitas observação de 48 em 48 horas para se chegar a LT50, que é o tempo em que 50% da população do verme morre (ELKABTI; ISSI; RAO, 2018; MYLONAKIS; ABALLAY, 2005).

Os gráficos 5 e 6 mostram o resultado da infecção por *Candida albicans* em vermes fase L4. Os gráficos 7 e 8 exibem a LT50 vermes infectados. É possível observar que o controle clínico utilizado para comparação, *Candida albicans* SC5314, atingiu a LT50 com 6 dias de infecção, diferente ($p < 0,05$) das cepas 53, 106, 116, 282 e 347 que diminuíram sua população em 50% no quarto dia de infecção. No trabalho de Ortega-Riveros *et al.* (2017) as cepas clínicas de *Candida albicans*, recuperadas de uma coleção de fungos patogênicos, apresentaram a LT50 no segundo dia de infecção, contudo, o tempo e protocolo de infecção dos nematódeos foram diferentes, podendo esses fatos alterar a carga fúngica ingerida (ELKABTI; ISSI; RAO, 2018; OKOLI *et al.*, 2009; ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011). Diversos autores relatam a observação de hifas emergindo do intestino do *C. elegans*, principalmente a partir da infecção por *C. albicans* (ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017; PUKKILA-WORLEY *et al.*, 2009; SCORZONI *et al.*, 2013)

A partir desses resultados foi observada uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre a produção de biofilme por *C. albicans* e o tempo de patogenicidade, em que produtores moderados de biofilme foram capazes de matar 50% da população de *C. elegans* mais rapidamente que aqueles produtores fracos de biofilme. Tal correlação também foi observada no trabalho de Ortega-Riveros *et al.* (2017).



Gráficos 5 e 6: Sobrevivência de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida albicans* e cepa a padrão SC 5314 durante 12 dias.



Gráficos 7 e 8: LT50 do *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida albicans* e cepa ATCC SC 5314.

Legenda: ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,000$.

O gráfico 9 demonstra as curvas de sobrevivência do *C. elegans* infectado com as cepas isoladas de *C. tropicalis*. O gráfico 10 exhibe a LT50 dos vermes infectados. É possível observar que todas as cepas isoladas chegaram na LT50 no quarto dia de infecção, enquanto a cepa ATCC no sexto dia ($p \leq 0,0001$). O autor Oliveira (2017), infectou *C. elegans* com isolados de *C. tropicalis* clínicos e veterinários, contudo a LT50 foi observada entre 2 e 3 dias, não tendo diferença entre os tipos de isolados.

Contudo, assim como no ensaio com os isolados de *C. albicans*, o tempo de infecção e o protocolo utilizado podem influenciar na quantidade de células patogênicas ingeridas e na intensidade da infecção (ELKABTI; ISSI; RAO, 2018; OKOLI *et al.*, 2009; ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011).

O fato de todas as cepas de *C. tropicalis* isoladas terem apresentado a mesma LT50 e menor que a cepa ATCC clínica é de suma importância, visto que diversos trabalhos mostram que *Candida tropicalis* ambiental é uma das principais fontes de resistência a antifúngicos entre microrganismos ambientais, além de serem adaptativas a diversas condições ambientais, como altas temperaturas ().

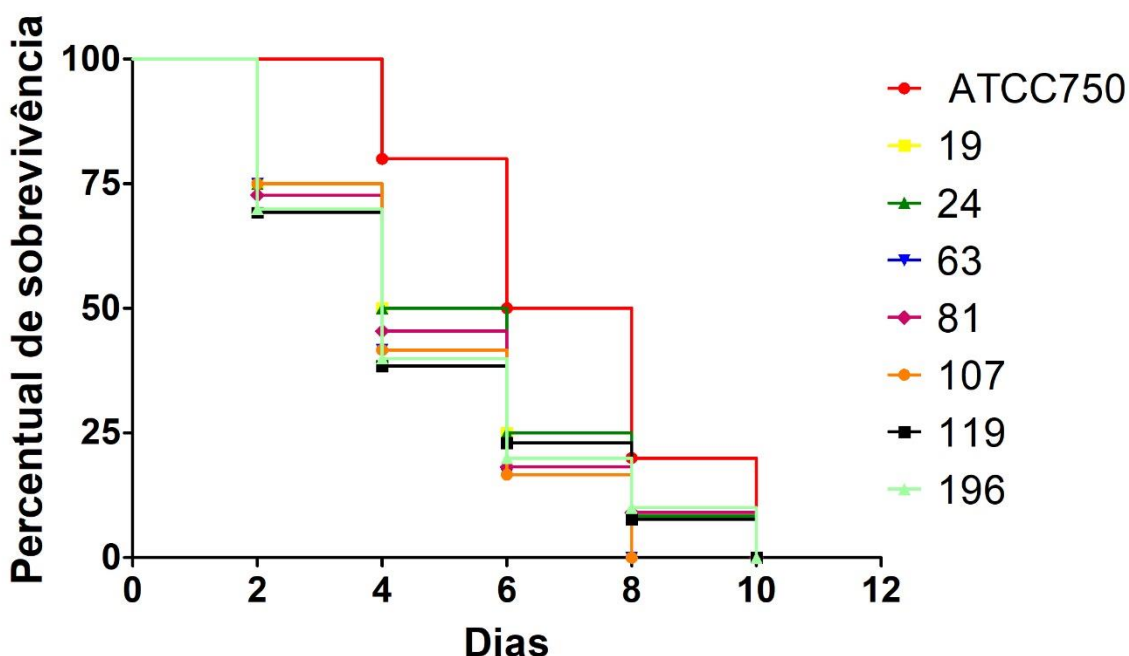


Gráfico 9: Sobrevivência de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida tropicalis* e cepa a padrão ATCC 750 durante 12 dias.

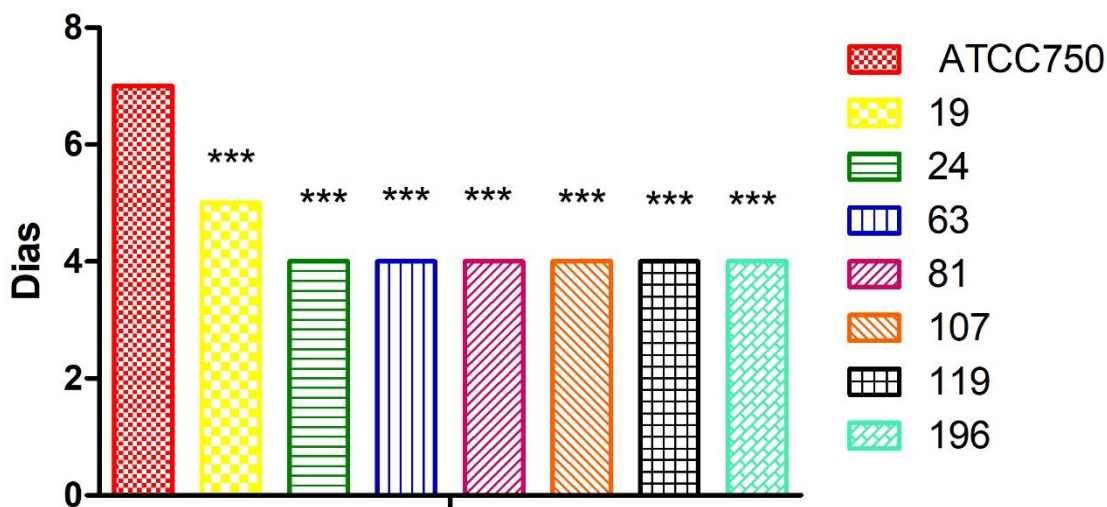


Gráfico 10: LT50 de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida tropicalis* e cepa a padrão ATCC 750.

Legenda: *** $p \leq 0,0001$

No gráfico 11 é possível ver os resultados para a infecção por *Candida krusei* nos vermes na fase L4. O gráfico 12 exibe a LT50 dos vermes infectados. Os dados mostram que a maioria dos isolados, incluindo a cepa referência ATCC 20298 atingiram a LT50 no sexto dia de infecção, com exceção da cepa 253, que foi no quarto dia. Diante desse resultado é possível observar uma correlação significativa ($p < 0,05$) entre a patogenicidade *in vivo* da cepa 253 com sua capacidade de formação de biofilme. No trabalho de Ortega-Riveros *et al.* (2017) o isolado clínico de *C. krusei* estudado atingiu a LT50 no terceiro dia de infecção, mas da mesma forma que citada anteriormente, o tempo de infecção e o protocolo utilizado influenciam na resposta à infecção (ELKABTI; ISSI; RAO, 2018; OKOLI *et al.*, 2009; ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011).

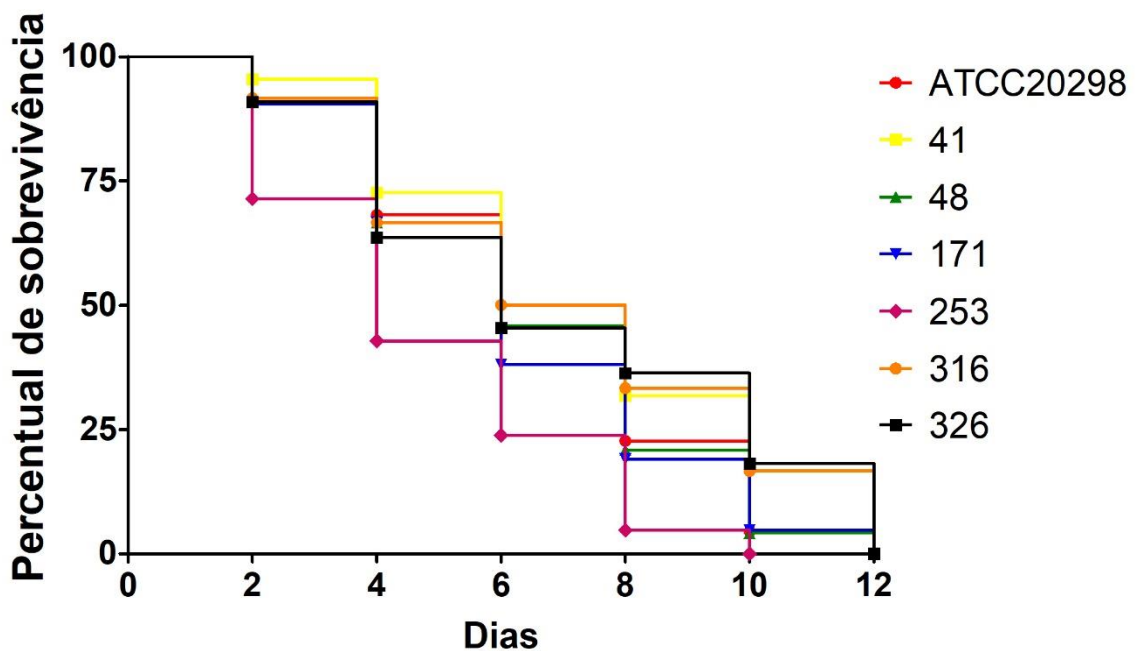


Gráfico 11: Sobrevivência de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida krusei* e cepa a padrão ATCC 20298 durante 12 dias.

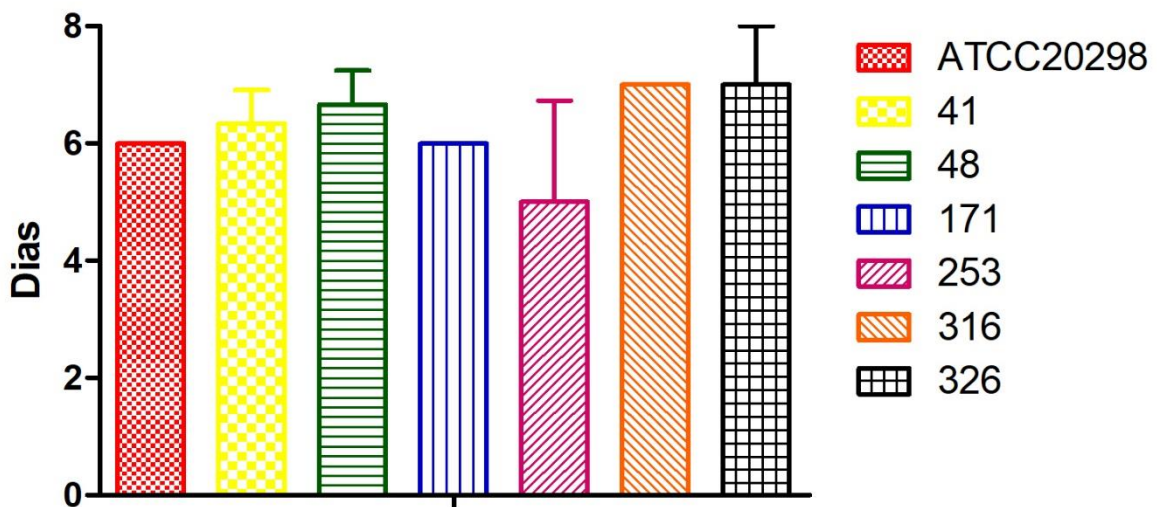
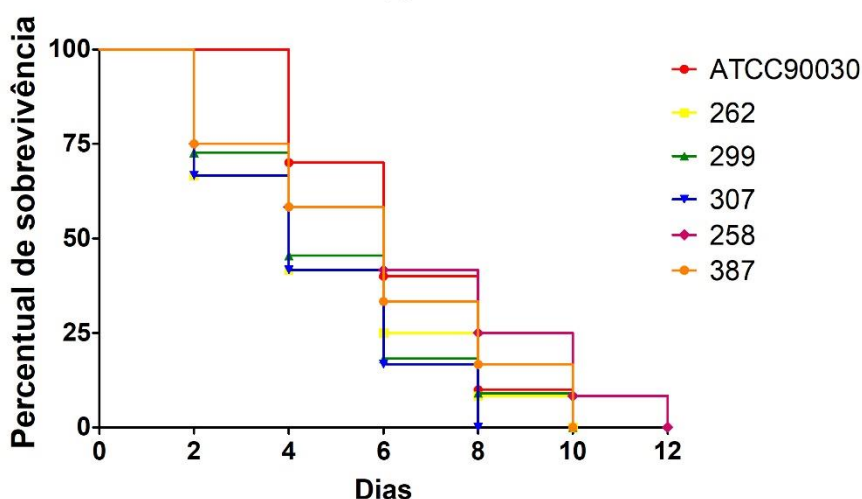
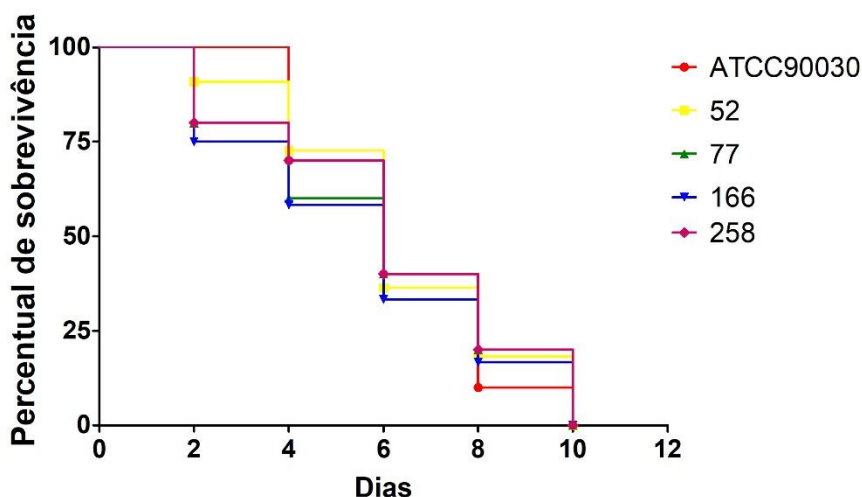


Gráfico 12: LT50 de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida krusei* e cepa a padrão ATCC 20298.

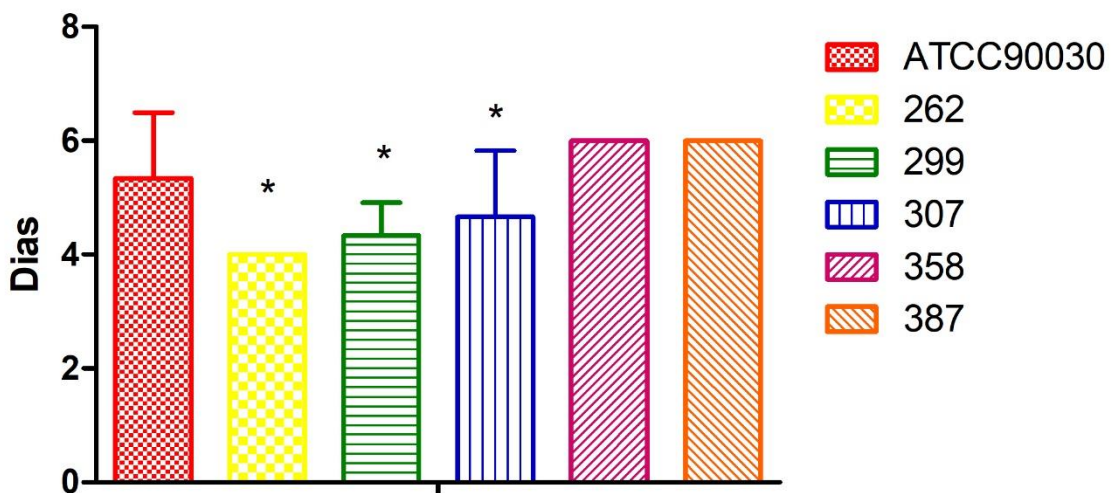
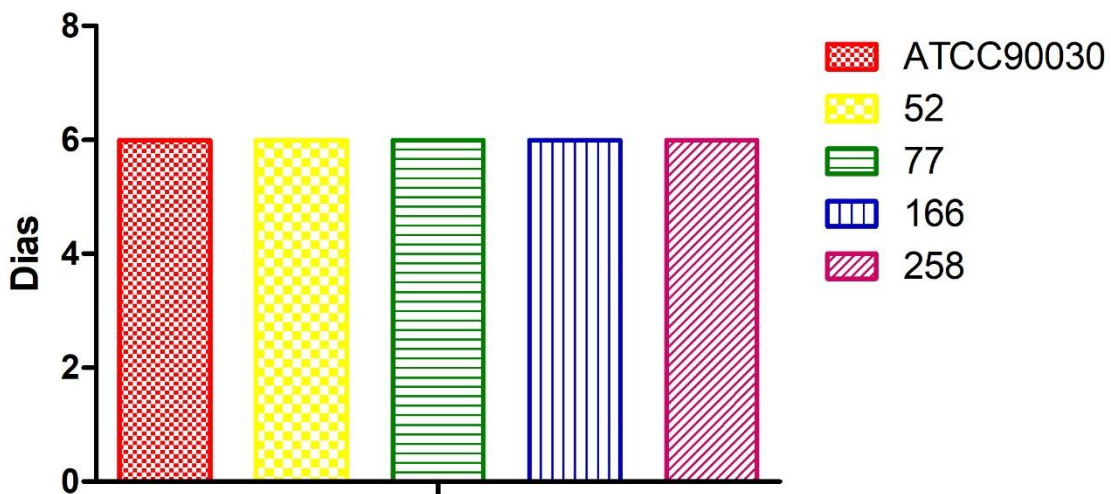
Os gráficos 13 e 14 mostram os resultados para a infecção por *Candida glabrata* em vermes na fase L4. Os gráficos 15 e 16 exibem a LT50 dos vermes infectados. É possível observar que a maioria dos isolados, incluindo a cepa referência ATCC 90030 atingiram a LT50 no sexto dia de infecção, com exceção das cepas produtoras de

hifas/pseudohifas, mostrando uma correlação significativa ($p < 0,05$) com o dimorfismo atípico observado na espécie.

Os autores HERNANDO-ORTIZ *et al.* (2020) avaliando a virulência *in vivo* de isolados clínicos de *C. glabrata*, observaram a LT50 em 5 dias de infecção. O fato das cepas de *C. glabrata* isoladas neste trabalho terem apresentado filamentação pode ter influenciado em um infecção e morte mais rápida, visto que diversos trabalho mostram que espécies de *Candida* produtoras de hifas/pseudohifas conseguem matar 50% da população de *C. elegans* mais rapidamente que aquelas não produtoras (HERNANDO-ORTIZ *et al.*, 2020; OKOLI *et al.*, 2009; ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017; PUKKILA-WORLEY *et al.*, 2009; PUKKILA-WORLEY; AUSUBEL; MYLONAKIS, 2011; SCORZONI *et al.*, 2013).



Gráficos 13 e 14: Sobrevivência de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida glabrata* e a cepa ATCC ATCC 90030 durante 12 dias.



Gráficos 15 e 16: LT50 de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais de *Candida glabrata* e cepa a padrão ATCC 90030.
 Legenda: * $p \leq 0,05$.

Com relação as capas sem espécies definidas pelo CHROMagar, a maioria também teve a LT50 no sexto dia de infecção, com exceção da cepa 251, que foi no quarto dia (GRÁFICOS 17 e 18). Tal resultado geral uma correlação significativa ($p < 0,05$) com a capacidade de formação de biofilme dessa cepa.

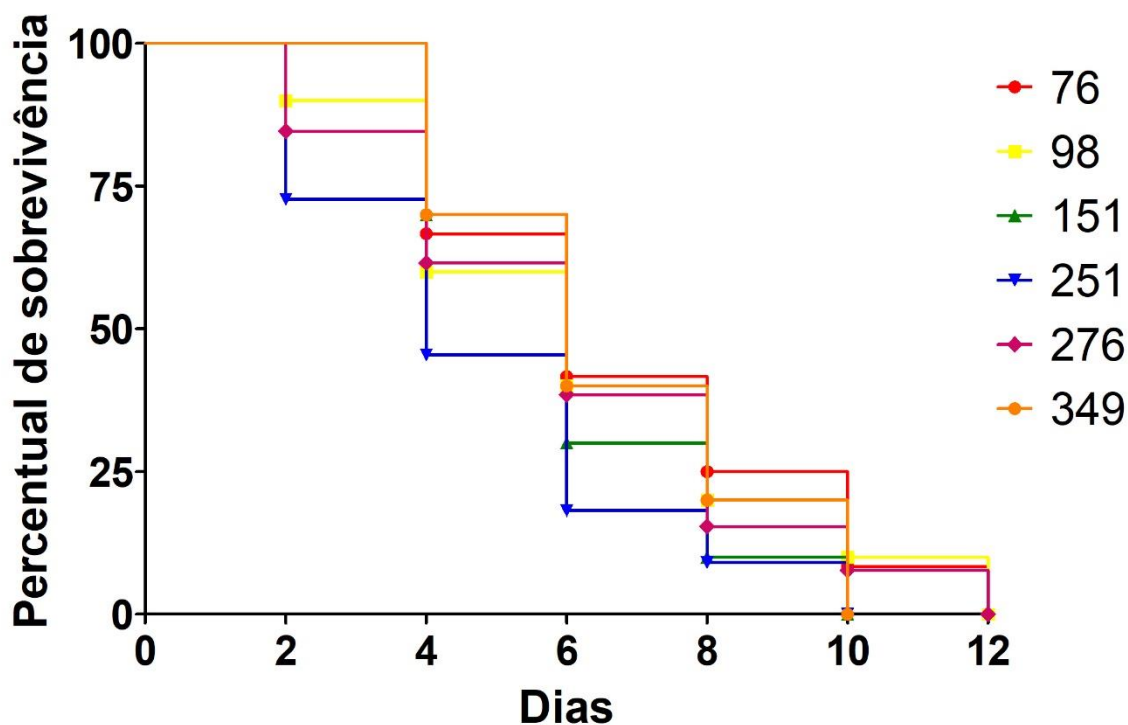


Gráfico 17: Sobrevivência de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais sem identificação pelo CHROmagar durante 12 dias.

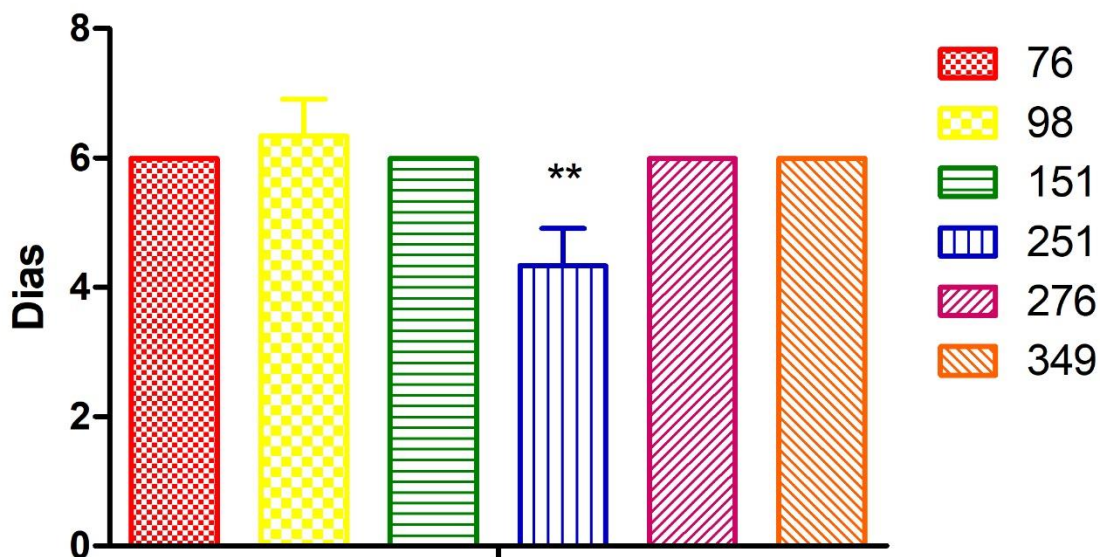


Gráfico 18: LT50 de *C. elegans* na fase L4 após infecção pelos isolados ambientais sem identificação pelo CHROmagar.
 Legenda: $p \leq 0,001$

6 CONCLUSÕES

O sistema de tratamento de dejetos da criação de bovinos leiteiros removeu 2,28 ciclos log de *Candida* spp. no inverno e 1,68 ciclos log no verão. Contudo, a eficiência do sistema na remoção da matéria orgânica no verão foi maior que no inverno, mostrando que a temperatura influenciou benéficamente na remoção do gênero *Cândida*, mas não na qualidade do efluente. A eficiência total do sistema quanto a remoção de *Candida* spp. foi de 99,42% no inverno e de 98,44% no verão.

Dos 376 isolados de *Candida* obtidos no estudo, 216 permaneceram viáveis e seguiram para os testes de análise de virulência. Dentre as cepas viáveis a sobrevivência por espécie foi estimada em 41% para *C. krusei*, 57% para *C. albicans*, 73% para *C. tropicalis*, 79% para *C. glabrata* e 100% para “outras”.

Essas espécies identificadas são de interesse clínico humano e veterinário por serem as mais comumente isoladas de leite proveniente de vacas com mastite, indicando que as pesquisas devem ser voltadas também a esse gênero, que as vezes é desconsiderado em pesquisas ambientais, principalmente por essa doença afetar diretamente a qualidade do leite, produtividade do rebanho e economia do produtor.

No teste de dimorfismo foi observado um fato pouco relatado na literatura até hoje, três isolados de *Candida* apresentaram filamentação em meio pobre de nutrientes, específico para o teste. Resultado esse interessante e que merece mais atenção posteriormente, pois *C. glabrata* é a não-*albicans* mais relatada em casos de candidemia e o fato de apresentarem essa habilidade em condições adversas aumenta sua virulência.

Todos os isolados foram produtores de biofilme, 52,6% produziram fosfolipase e 1,14% protease. Nenhuma *C. albicans* foi resistente ao fluconazol, em *C. tropicalis* 85,7% foi resistente ou dose-dependente, *C. glabrata* 22% dos isolados apresentaram resistência. Embora o fluconazol tenha tido baixa taxa de resistência entre os isolados de *C. albicans* e *C. glabrata*, todas as cepas, de todas as espécies, foram resistentes ou dose-dependentes a anfotericina B e ao itraconazol.

Os isolados de *C. albicans* 53, 106, 116, 282 e 347 mostraram LT50 menor que a cepa ATCC, sendo que é comum a observação de hifas emergindo do intestino do

C. elegans, infectado por *C. albicans*, foi observada uma correlação significativa entre a produção de biofilme por *C. albicans* e a LT50 dos isolados citados. Todos os isolados de *C. tropicalis* chegaram na LT50 no quarto dia de infecção, enquanto a cepa ATCC no sexto dia, fato essa importante visto que *C. tropicalis* de origem ambiental é relatada em muitos trabalhos como uma das principais fontes de resistência a antifúngicos entre microrganismos ambientais, além de serem adaptativas a diversas condições ambientais, como altas temperatura. Na infecção por *C. krusei*, apenas o isolado 253 atingiu a LT50 no quarto dia de infecção. Os isolados de *C. glabrata* que apresentaram filamentação foram os únicos da espécie que atingiram a LT50 no quarto dia, mostrando uma correlação significativa entre a filamentação e a virulência *in vivo*.

Apesar da digestão anaeróbia de dejetos bovinos ser endossada como solução importante para reciclagem e produção de biofertilizante, levanta preocupações significativas sobre riscos de caráter clínico durante o processo. Sugere-se que sejam realizados estudos adicionais sobre adequações físico-químicas e também biológicas voltadas a persistência de leveduras potencialmente patogênicas, principalmente devido ao perfil de virulência dos isolados comparando com as cepas clínicas ATCC, no qual é possível observar que em alguns casos as cepas ambientais se mostraram mais ou igualmente virulentas.

Enfim, esse trabalho é um ponta pé inicial para estudos relacionados a fungos patogênicos de origem ambiental, ainda escasso na literatura, pois foi capaz de mostrar que existem cepas potencialmente patogênicas a humanos e aos animais, com características virulentas iguais as cepas de origem clínica.

REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, A. Y. *et al.* Bio-Fertilizers via Co-Digestion: a Review. *Path of Science*, v. 5, n. 6, p. 3001–3011, 2019.

ABUBAKER, J.; RISBERG, K.; PELL, M. Biogas residues as fertilisers - Effects on wheat growth and soil microbial activities. *Applied Energy*, v. 99, p. 126–134, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.04.050>>.

ACOSTA, A. C. *et al.* Mastites em ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.

AGUILAR-ZAPATA, D.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. Suppl 6, p. 604–611, 2015.

AHMED, N. *et al.* Molecular Identification and Virulence Factors Determination in *Candida* Species Isolated from Egyptian Patients. *American Journal of Microbiological Research*, v. 7, n. 4, p. 108–117, 2019.

AIGNER, M. *et al.* Etest and Sensititre YeastOne susceptibility testing of echinocandins against *Candida* species from a single center in Austria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 8, p. 1–8, 2017.

AKINJOGUNLA, O. J.; AJAYI, A. O.; NKANGA, I. E. Characterization, In-vitro Detection of Extracellular Hydrolytic Enzymes and Antifungal Susceptibility of Faecal *Candida* Isolates from Diarrhoeal Patients. *Nigerian Journal of Pharmaceutical and Applied Science Research*, v. 35, n. 1, p. 8–9, 2018.

AL-MASRI, M. R. Changes in biogas production due to different ratios of some animal and agricultural wastes. *Bioresource Technology*, v. 77, n. 1, p. 97–100, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400001176>>.

ALFA, M. I. *et al.* Assessment of biofertilizer quality and health implications of anaerobic digestion effluent of cow dung and chicken droppings. *Renewable Energy*, v. 63, p. 681–686, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2013.09.049>>.

ALTMANN, M. *et al.* Timeliness of surveillance during outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, Germany, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. 1906–1909, 2011.

AMARAL, CECÍLIA MARIA COSTA DO AMARAL, L. A. DO *et al.* Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, p. 1897–1902, 2004.

AMARAL, C. M. C. *et al.* Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. *Ciência Rural*, v. 34, n. 6, p. 1897–1902, 2004.

AMON, T. *et al.* Biogas production from maize and dairy cattle manure-Influence of biomass composition on the methane yield. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 118, n. 1–4, p. 173–182, 2007.

AMON, T. *et al.* *Guia Prático do Biogás*. 5ª ed. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, 2010.

ANDRADE, S. O. DE; OLIVEIRA, A. M. B. M. DE; COELHO, L. F. DE O. Biodigestores: Estado da Arte, Suas Perspectivas e Desafios. *Revista Brasileira de Gestão Ambiental*, v. 11, n. 1, p. 44–50, 2017.

ANDREOLA, P. *et al.* Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 45, n. 4, p. 219–226, 2016.

AOKI, S. *et al.* Comparative Pathogenicity of a Wild-Type Strain and Respiratory Mutants of *Candida albicans* in Mice. *Zentralblatt Bakteriologie*, v. 273, n. 3, p. 332–343, 1990. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0934-8840\(11\)80437-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0934-8840(11)80437-8)>.

ARASTEHFAR, A. *et al.* Low level of antifungal resistance of *Candida glabrata* blood isolates in Turkey: Fluconazole minimum inhibitory concentration and FKS mutations can predict therapeutic failure. *Mycoses*, v. 63, n. 9, p. 911–920, 2020.

ARORA, S. *et al.* Speciation, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Candida* isolates. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Science*, v. 6, n. 2, p. 2517–2521, 2017.

ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1832, n. 9, p. 1378–1383, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.008>>.

AUTMIZGUINE, J. *et al.* Antifungal Susceptibility and Clinical Outcome in Neonatal Candidiasis. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 37, n. 9, p. 923–929, 2018.

AZIE, N. *et al.* The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: Update 2012. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, n. 4, p. 293–300, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.06.012>>.

BAGGE, E.; PERSSON, M.; JOHANSSON, K. E. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, v. 109, n. 5, p. 1549–1565, 2010.

BAGGE, ELISABETH; SAHLSTRÖM, L.; ALBIHN, A. The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants. *Water Research*, v. 39, n. 20, p. 4879–4886, 2005.

BAJPAI, PRATIMA. Basics of Anaerobic Digestion Process Abstract. In: BAJPAI, P. (Org.). *Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry*. [S.l.]: SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology, 2017. p. 7–13. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-4130-3>>.

BAREITHER, C. A. *et al.* Microbial diversity and dynamics during methane production from municipal solid waste. *Waste Management*, v. 33, n. 10, p. 1982–1992, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2012.12.013>>.

BASU, S. *et al.* Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. *Revista iberoamericana de micología : órgano de la Asociación Española de Especialistas en Micología*, v. 20, n. 4, p. 137–40, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15456350>>.

BATISTA, R. O. *et al.* Manejo de águas residuárias da bovinocultura de leite para uso em cultivo de plantas. , nº 100. Lavras: Editora UFLA, 2014.

BAWEJA, M. Parametric Evaluation of Bio-Digestion Process-A Review. *American Journal of Energy Engineering*, v. 6, n. 1, p. 6, 2018.

BENGELSDORF, F. R. *et al.* Stability of a biogas-producing bacterial, archaeal and fungal community degrading food residues. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 84, n. 1, p. 201–212, 2013a.

BENGELSDORF, F. R. *et al.* Stability of a biogas-producing bacterial, archaeal and fungal community degrading food residues. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 84, n. 1, p. 201–212, 2013b.

BENJAMIN, D. K. *et al.* A Phase 3 Study of Micafungin Versus Amphotericin B Deoxycholate in Infants With Invasive Candidiasis. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 37, n. 10, p. 992–998, 2018. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00006454-201810000-00008>>.

BI, S. *et al.* Effect of hydraulic retention time on anaerobic co-digestion of cattle manure and food waste. *Renewable Energy*, v. 150, p. 213–220, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.12.091>>.

BIASOLI, M. S.; TOSELLO, M. E.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. *Mycoses*, v. 45, n. 11–12, p. 465–469, 2002.

BISUTTI, I.; HILKE, I.; RAESSLER, M. Determination of total organic carbon - An overview of current methods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 10–11, p. 716–726, 2004.

BITTON G. *Wastewater microbiology*. 3. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2005.

BOE, K. *et al.* State indicators for monitoring the anaerobic digestion process. *Water Research*, v. 44, n. 20, p. 5973–5980, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004313541000521X>>.

BOMMANAVAR, S.; GUGWAD, S.; MALIK, N. Phenotypic switch: The enigmatic white-gray-opaque transition system of *Candida albicans*. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 21, n. 1, p. 82, 2017. Disponível em: <<http://www.jomfp.in/text.asp?2017/21/1/82/203781>>.

BRANDA, L. *et al.* Evaluation of Fecal Coliforms in Effluents of a Swine Exploitation Subject To a Tubular Biodigester Treatment With Stationary Freight System. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, v. 6, n. 2, p. 7–12, 2016. Disponível em: <http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2226-17612016000200002&lng=es&nrm=iso&tlng=es>.

BRANDAO, J. C. *et al.* Tracing the origin of a *Candida albicans* infection by pulsed field gel electrophoresis. *J. Mycol. Med.*, v. 5, p. 31–34, 1995.

BRASIL. *Decreto nº 4.954, de 14 de Janeiro de 2004. Inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura.* [S.l.: s.n.], 2004

BRASIL. *Resolução Nº 430, de 13 de Maio de 2011.* . [S.l.: s.n.], 2011

BRITO, E. H. S. *et al.* Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. *Ciência Rural*, v. 39, n. 9, p. 2655–2664, 2009. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=47908667&lang=es&site=ehost-live>>.

BUDDIWONG, S. *et al.* Screening of thermotolerant yeast isolated from sugarcane plantations in Northeastern part of Thailand. *RESjournal*, v. 19, n. 2, p. 217–223, 2014.

CALDERONE, R.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, v. 9, n. 7, p. 327–35, 2001.

CALZA, L. F. *et al.* Avaliação dos custos de implantação de biodigestores e da energia produzida pelo biogás. *Engenharia Agrícola*, v. 35, n. 6, p. 990–997, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162015000600990&lng=pt&tlng=pt>.

CAMPOS, F. L. *et al.* Atividade Desinfetante Do Extrato Hidroalcoólico Bruto De *Achyrocline Satureioides* (Asteraceae) Sobre *Candida* spp. Isoladas Em Situações-Problema De Mastite Bovina. *Acta Veterinaria Brasílica*, v. 10, n. 4, p. 327–333, 2016.

CAMPOS, F. L.; VALENTE, P.; AVANCINI, C. A. M. Atividade dos desinfetantes iodóforo e composto quaternário I de amônio sobre *Candida* padrão e isolados clínicos de mastite bovina. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 10, n. 4, p. 716–725, 2016.

CARVALHO, A. P. *et al.* Biodigestão: Um Processo Natural de Decomposição da Matéria Orgânica. *Revista de Trabalhos Acadêmicos*, v. 4, n. 2, p. 52–57, 2017.

CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M. *et al.* Azole resistance in *Candida* from animals calls for the One Health approach to tackle the emergence of antimicrobial resistance. *Medical Mycology*, p. 1–10, 2020.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine*, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.

CHAABANE, F. *et al.* Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. November, p. 1–8, 2019.

CHERNICHARO, C. A. L. *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; reatores anaeróbios*. 1. ed. Belo Horizonte: [s.n.], 1997.

CHOMINI, M. S.; JOSHUA, V. I. Biodigestion effects of cow dung, poultry droppings and maize cobs on microbiological and physico-chemical properties of the effluents. *American Journal of Agriculture ISSN*, v. 2, n. 1, p. 0–16, 2019.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Diagnosing invasive candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 56, n. 5, p. 1–9, 2018.

CLAUDINO, E. S.; TALAMINI, E. Análise do Ciclo de Vida (ACV) aplicada ao agronegócio - Uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, n. 1, p. 77–85, 2013.

CLSI, C. AND L. S. I. Document M27-A3. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Suscetibility Testing of Yeasts*. 3. ed. [S.l: s.n.], 2008. .

CLSI, C. AND L. S. I. Document M27-A4. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Suscetibility Testing of Yeasts*. 4. ed. [S.l: s.n.], 2012. .

COLOMBO, A. L. *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2013.02.001>>.

COOPER, C. R. Yeasts pathogenic for humans and animals. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Org.). . *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 5^a ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 9–19.

CORDEIRO, R. DE A. *et al.* Inhibition of heat-shock protein 90 enhances the susceptibility to antifungals and reduces the virulence of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 162, n. 2, p. 309–317, 2016.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, v. 200, n. 2, p. 387–407, 2015.

COSTA, GERALDO MÁRCIO DA *et al.* Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*, v. 38, n. 7, p. 1938–1942, 2008.

COSTA, GERALDO MARCIO DE *et al.* Yeast mastitis outbreak in a Brazilian dairy herd. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, Sao Paulo, v. 49, p. 239–243, 2012.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters*, v. 189, n. 1, p. 115–120, 2000.

DABIRI, S.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Comparative analysis of proteinase, phospholipase, hydrophobicity and biofilm forming ability in *Candida* species isolated from clinical specimens. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 28, n. 3, p. 437–442, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.009>>.

DALVAND, A. *et al.* Genotyping of *Candida albicans* isolated from animals using 25S ribosomal DNA and ALT repeats polymorphism in repetitive sequence. *Current Medical Mycology*, v. 4, n. 4, p. 12–19, 2018.

DIARD, M.; HARDT, W. D. Evolution of bacterial virulence. *FEMS microbiology reviews*, v. 41, n. 5, p. 679–697, 2017.

DIOGO, J.; BRATANICH, A. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. *Archives of Virology*, v. 159, n. 11, p. 2843–2851, 2014.

DIVYA, D.; GOPINATH, L. R.; MERLIN CHRISTY, P. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 690–699, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.10.055>>.

DOI, A. M. *et al.* Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PloS one*, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.

DOUGLASS, A. P. *et al.* Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLoS Pathogens*, v. 14, n. 7, p. 1–27, 2018.

DU, J. *et al.* Epidemiological investigation of non-albicans *Candida* species recovered from mycotic mastitis of cows in Yinchuan, Ningxia of China. *BMC Veterinary Research*, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2018.

DUARTE, F. *Entenda qual tipo de biodigestor é a melhor solução para seus resíduos*. Disponível em: <<http://emasjr.com.br/2018/04/22/tipos-biodigestor/>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

EDELMANN, A.; KRÜGER, M.; SCHMID, J. Genetic relationship between human and animal isolates of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 12, p. 6164–6166, 2005.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 11, p. 685–702, 2003.

EIKMEYER, F. G. *et al.* Detailed analysis of metagenome datasets obtained from biogas-producing microbial communities residing in biogas reactors does not indicate the presence of putative pathogenic microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 49, p. 1–14, 2013.

EKPENI, L. E. N. *et al.* Yeast: A potential biomass substrate for the production of cleaner energy (Biogas). *Energy Procedia*, v. 61, p. 1718–1731, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2014.12.199>>.

EL-KIRAT-CHATEL, S. *et al.* The importance of force in microbial cell adhesion. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 47, p. 111–117, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.010>>.

ELKABTI, A. B.; ISSI, L.; RAO, R. P. *Caenorhabditis elegans* as a model host to monitor the candida infection processes. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, 2018.

ELLEPOLA, A. N. *et al.* Impact of brief exposure to antifungal agents on the post-antifungal effect and hemolysin activity of oral *Candida albicans*. *Journal of Applied Oral Science*, v. 23, n. 4, p. 412–418, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572015000400412&lng=en&tlng=en>.

ELMANAMA, A. A. *et al.* Antifungal susceptibility pattern of *Candida* spp . isolated from vaginal discharge of pregnant women. *Journal of Natural Studies*, v. 28, n. 1, p. 52–58, 2020.

EMAM, S. M.; ELAZM, A. A. A.; MORAD, A. W. A. Exoenzymes Production and Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Pregnant Women with Vulvovaginitis. *Journal of American Science*, v. 8, n. 12, p. 1392–1399, 2012.

ERBAŞ, G. *et al.* Identification of *Candida* strains with nested PCR in bovine mastitis and determination of antifungal susceptibilities. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v. 41, n. 6, p. 757–763, 2017.

FAN, X. *et al.* Molecular mechanisms of azole resistance in *Candida tropicalis* isolates causing invasive candidiasis in China. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 885–891, 2019.

FÉLIX, M. A.; BRAENDLE, C. The natural history of *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, v. 20, n. 22, p. R965–R969, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.09.050>>.

FENG, W. *et al.* ERG11 mutations and upregulation in clinical itraconazole-resistant isolates of *Candida krusei*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 62, n. 11, p. 938–943, 2016.

FERNANDES, A. *et al.* Água residuária de laticínio em codigestão com dejetos de bovinos leiteiros. *Revista Energia na Agricultura*, v. 33, n. 3, p. 231–236, 2018.

FERREIRA, A. .; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FOTHERGILL, A. W. *et al.* Impact of New Antifungal Breakpoints on Antifungal Resistance in *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 3, p. 994–997, 2014.

FRANCISCI, D. DE *et al.* Microbial diversity and dynamicity of biogas reactors due to radical changes of feedstock composition. *Bioresource Technology*, v. 176, p. 56–64, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.126>>.

FRASER, M. *et al.* Resistance to echinocandin antifungal agents in the United Kingdom in clinical isolates of *Candida glabrata*: Fifteen years of interpretation and assessment. *Medical mycology*, v. 58, n. 2, p. 219–226, 2020.

GABALDÓN, T.; GÓMEZ-MOLERO, E.; BADER, O. Molecular Typing of *Candida glabrata*. *Mycopathologia*, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2019.

GARCÍA-FELIZ, C. *et al.* *Salmonella* enterica infections in Spanish swine fattening units. *Zoonoses and Public Health*, v. 54, n. 8, p. 294–300, 2007.

GARG, S. *et al.* Parameters of Neoplastic and Nonneoplastic Lymphocytes Using. *Journal of Periodontology*, v. 5, n. 1, p. 85–88, 2018.

GHADDAR, N. *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* causing vaginal discharge among pregnant women in Lebanon. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.

GONG, J. *et al.* Genetic differentiation, diversity, and drug susceptibility of *Candida krusei*. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018.

GONG, X. *et al.* American Journal of Infection Control Invasive candidiasis in intensive care units in China: Risk factors and prognoses of *Candida albicans* and non – albicans *Candida* infections. *AJIC: American Journal of Infection Control*, v. 44, n. 5, p. e59–e63, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.028>>.

GRANDO, R. L. *et al.* Technology overview of biogas production in anaerobic digestion plants: A European evaluation of research and development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 80, n. May, p. 44–53, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.079>>.

GROS, M. *et al.* Fate of pharmaceuticals and antibiotic resistance genes in a full-scale on-farm livestock waste treatment plant. *Journal of Hazardous Materials*, v. 378, n. March, p. 120716, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.109>>.

GUEMBE, M. *et al.* Assessment of biofilm production in *Candida* isolates according to species and origin of infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(1):37–40, v. 35, n. 1, p. 37–40, 2017.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 5, p. 310–321, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>>.

HE, Y. *et al.* Antibiotic resistance genes from livestock waste: occurrence, dissemination, and treatment. *NPJ Clean Water*, v. 3, n. 1, p. 4, 2020. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41545-020-0051-0>>.

HERNANDO-ORTIZ, A. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model system to assess *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* virulence and antifungal efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, n. July, p. 1–33, 2020.

HIRAYAMA, T. *et al.* Virulence assessment of six major pathogenic *Candida* species in the mouse model of invasive candidiasis caused by fungal translocation. *Scientific Reports*, v. 10, n. 3814, p. 1–10, 2020.

HIZLISOY, H. *et al.* Clonal diversity and antifungal susceptibility of *Candida* spp. recovered from cow milk. *Mljekarstvo*, v. 70, n. 1, p. 40–49, 2020.

HO, V. *et al.* An amyloid core sequence in the major *Candida albicans* adhesin Als1p mediates cell-cell adhesion. *mBio*, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2019.

HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence*, v. 3, n. 3, p. 251–261, 2012.

HUANG, X. *et al.* *Caenorhabditis elegans*: A simple nematode infection model for penicillium marneffeii. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. 1–6, 2014.

IBGE. *PPM 2018: rebanho bovino diminui e produtividade nacional de leite ultrapassa 2 mil litros por animal ao ano.* Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/25482-ppm-2018-rebanho-bovino-diminui-e-produtividade-nacional-de-leite-ultrapassa-2-mil-litros-por-animal-ao-ano>>. Acesso em: 3 mar. 2020.

INGHAM, C. J. *et al.* Rapid susceptibility testing and microcolony analysis of *Candida* spp. cultured and imaged on porous aluminum oxide. *PLoS ONE*, v. 7, n. 3, p. 1–8, 2012.

INMET, I. N. DE M. *Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática.* Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QTU1Nw==>. Acesso em: 5 set. 2018.

JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, p. 1–17, 2020.

JANOUT, V. *et al.* Taming Amphotericin B. *Bioconjugate Chem.*, v. 26, n. 10, p. 2021–2024, 2015.

JEFFERY-SMITH, A. *et al.* *Candida auris*: A review of the literature. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 1, p. 1–18, 2018.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, n. 5, p. 387–399, 2006.

KAUR, R. *et al.* Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 5, p. 455–460, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.019>>.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 171–177, 2011.

KORNITZER, D. Regulation of *candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. *Journal of Fungi*, v. 5, n. 1, 2019.

KOTHARI, R. *et al.* Different aspects of dry anaerobic digestion for bio-energy: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 39, p. 174–195, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.011>>.

KOUTSERIMPAS, C. *et al.* Non-*albicans Candida* prosthetic joint infections: A systematic review of treatment. *World Journal of Clinical Cases*, v. 7, n. 12, p. 1430–1443, 2019.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. *The new engl and journal of medicine*, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.

KUMAR, K. V. *et al.* A review on production of biogas , fundamentals , applications & its recent enhancing techniques. *Chemical Engineering*, v. 57, p. 14073–14079, 2013.

KUNTIYA, A.; TAKENAKA, S.; SEESURIYACHAN, P. High potential of thermotolerant *Candida tropicalis* no. 10 for high concentration of phenol biodegradation. *Food and Applied Bioscience Journal*, v. 1, n. 2, p. 59–68, 2013. Disponível em: <http://www.agro.cmu.ac.th/fabjournal/data/2013 V1/06_fabj1_2_2013.pdf>.

LACHKE, S. A. *et al.* Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology*, v. 148, n. 9, p. 2661–2674, 2002.

LAPRADE, D. J. *et al.* Filamentation protects *Candida albicans* from amphotericin b-induced programmed cell death via a mechanism involving the yeast metacaspase, MCA1. *Microbial Cell*, v. 3, n. 7, p. 285–292, 2016.

LEE, D. H. *et al.* Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: A lab-scale study. *Waste Management*, v. 29, n. 2, p. 876–882, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2008.06.033>>.

LIU, C. *et al.* Prediction of methane yield at optimum pH for anaerobic digestion of organic fraction of municipal solid waste. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 4, p. 882–888, 2008.

LORLIAM, W. *et al.* Characterization of xylose-utilizing yeasts isolated from herbivore faeces in Thailand. *ScienceAsia*, v. 39, n. 1, p. 26–35, 2013.

LORTHOLARY, O. *et al.* Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Medicine*, v. 40, n. 9, p. 1303–1312, 2014.

LUSTE, S.; HEINONEN-TANSKI, H.; LUOSTARINEN, S. Co-digestion of dairy cattle slurry and industrial meat-processing by-products - Effect of ultrasound and hygienization pre-treatments. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 195–201, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.003>>.

MACHADO, G. B. *Biodigestor Anaeróbio*. Disponível em: <<https://www.portaldobiogas.com/biodigestor-anaerobio/>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

MAHANTY, T. *et al.* Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 24, n. 4, p. 3315–3335, 2017.

MANYI-LOH, C. E. *et al.* Microbial anaerobic digestion (bio-digesters) as an approach to the decontamination of animal wastes in pollution control and the generation of renewable energy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, n. 9, p. 4390–4417, 2013.

MAO, C. *et al.* Review on research achievements of biogas from anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 45, p. 540–555, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.02.032>>.

MARQUES, A. D. S. *et al.* Efeito Da Aplicação Do Biofertilizante De Dejetos De Caprino No Solo E Cultura Do Sorgo. 2015.

MARSH, E. K.; MAY, R. C. *Caenorhabditis elegans*, A model organism for investigating immunity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 7, p. 2075–2081, 2012.

MARTÍ-HERRERO, J. *et al.* Cow, sheep and llama manure at psychrophilic anaerobic co-digestion with low cost tubular digesters in cold climate and high altitude. *Bioresource Technology*, v. 181, p. 238–246, 2015.

MARTÍNEZ-MATÍAS, N.; RODRÍGUEZ-MEDINA, J. R. Fundamental Concepts of Azole Compounds and Triazole Antifungals: A Beginner's Review. *PRHSJ*, v. 37, n. 3, p. 135–142, 2018.

MARTÍNEZ, J. M. *et al.* *La energía: características y contextos*. 1. ed. [S.I.]: Ministerio de Educación de la Nación, 2013.

MASSÉ, D.; GILBERT, Y.; TOPP, E. Pathogen removal in farm-scale psychrophilic anaerobic digesters processing swine manure. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 641–646, 2011.

MATOS, A. T. *Tratamento e aproveitamento agrícola de resíduos sólidos*. 1ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2014.

MATOS, C. F. *et al.* Evaluation of the Potential of Use of Bovine Manure Biofertilizer Resulting from the Management System of Organic and Conventional Milk Production. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 5, p. 1957–1969, 2017. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=817&nomeArquivo=v9n5a12.pdf>.

MCCARTHY, G. *et al.* Assessing the biosafety risks of pig manure for use as a feedstock for composting. *Science of the Total Environment*, v. 463–464, p. 712–719, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.069>>.

MCCARTY, T. P. *et al.* Echinocandin resistance among *Candida* isolates at an academic medical centre 2005-15: Analysis of trends and outcomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 6, p. 1677–1680, 2018.

MCMANUS, B. A; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 21C, p. 166–178, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24269341>>.

MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A. *Candida auris* - “Ten Years After”. *Jornaul of Fungi*, v. 6, n. 2, p. 10–11, 2020.

MENDES, J. F. *et al.* Antifungal susceptibility profile of diferent yeasts isolates from wild animals, cow's milk with subclinical mastitis and hospital environment. *Brazilian Journal of Biology*, v. 78, n. 1, p. 68–75, 2017.

MENDONÇA, H. V.; OMETTO, J. P. H. B.; OTENIO, M. H. Production of Energy and Biofertilizer from Cattle Wastewater in Farms with Intensive Cattle Breeding. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2017. , v. 228, n. 2.

MENDOZA-GRIMÓN, V. *et al.* Zero discharge : Pilot project for biodegradation of cattle effluent by pyroclastic “lapilli” treatment for fodder irrigation. *Journal of Environmental Management*, v. 231, n. September 2018, p. 345–351, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.09.050>>.

MENEZES, E. A. *et al.* Suscetibilidade a antifúngicos e fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas em Russas, Ceará Antifungal susceptibility and virulence factors of strains *Candida* spp. isolated in Russas, Ceará. *RBAC*, v. 48, n. 1, p. 33–41, 2016.

MERLIN CHRISTY, P.; GOPINATH, L. R.; DIVYA, D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 34, p. 167–173, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010>>.

MESINI, A. *et al.* *Candida* infections in paediatrics: Results from a prospective single-centre study in a tertiary care children’s hospital. *Mycoses*, v. 60, n. 2, p. 118–123, 2017.

MEZZARI, M. P. *et al.* Elimination of Antibiotic Multi-Resistant *Salmonella* Typhimurium from Swine Wastewater by Microalgae-Induced Antibacterial Mechanisms. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, v. 08, n. 01, p. 8–11, 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/elimination-of-antibiotic-multiresistant-salmonella-typhimurium-fromswine-wastewater-by-microalgaeinduced-antibacterial-mechanisms-2155-6199-1000379.php?aid=85446>>.

MILAZZO, L. *et al.* *Candidaemia* Observed at a University Hospital in Milan (Northern Italy) and Review of Published Studies from 2010 to 2014. *Mycopathologia*, v. 178, n. 3–4, p. 227–241, 2014.

MULLO, A. S. *et al.* Implementation of a cattle manure biodigester for the production of gas for single family use. *E3S Web of Conferences*, v. 57, p. 1–7, 2018.

MUSIOL, R.; KOWALCZYK, W. Azole Antimycotics – A Highway to New Drugs or a Dead End? *1378 Current Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 1378–1388, 2012.

MYLONAKIS, E.; ABALLAY, A. Worms and flies as genetically tractable animal models to study host-pathogen interactions. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 7, p. 3833–3841, 2005.

NAGLIK, J. R. *et al.* *Candida albicans*–epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 40, p. 104–112, 2017.

NASIR, I. M. *et al.* Bioreactor performance in the anaerobic digestion of cattle manure: A review. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, v. 36, n. 13, p. 1476–1483, 2014.

NAVARRO-ARIAS, M. J. *et al.* Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Infection and Drug Resistance*, v. 12, p. 783–794, 2019.

NETT, J. E. *Candida auris*: An emerging pathogen “incognito”? *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 4, p. 6–11, 2019.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the Biofilm Matrix to *Candida* Pathogenesis. *Journal of Fungi*, v. 6, n. 21, p. 33–38, 2020.

NIGAR, I. *et al.* Species Identification of *Candida* Isolated from Clinical Specimens in a Tertiary Care Hospital. *Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University Journal*, v. 9, n. 1, p. 20–25, 2016.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current Fungal Infection Reports*, v. 6, n. 1, p. 23–34, 2012.

ODDS, F. C. *et al.* *Candida* and *Torulopsis*: A blinded evaluation of use of pseudohypha formation as basis for identification of medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 1, p. 313–316, 1997.

OKOLI, I. *et al.* Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. *PLoS ONE*, v. 4, n. 9, 2009.

OLCAY, O.; KOCASOY, G. Acceleration of the Decomposition Rate of Anaerobic Biological Treatment. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 39, n. 4, p. 1083–1093, 2004.

OLIVEIRA, F. Í. F. DE *et al.* Crescimento e produção do maracujazeiro amarelo fertirrigado com esterco bovino líquido fermentado. *Agropecuária Técnica*, v. 38, n. 4, p. 191, 2018. Disponível em: <<http://periodicos.ufpb.br/index.php/at/article/view/34434>>.

OLIVEIRA, J. S. DE. *Análise da virulência, sensibilidade antifúngica e mecanismos de resistência a azólicos em cepas de Candida tropicalis de origem humana e veterinária*. 2017. 157 f. Universidade Federal do Ceará, 2017.

ORTEGA-RIVEROS, M. *et al.* Usefulness of the Non-conventional *Caenorhabditis elegans* Model to Assess *Candida* Virulence. *Mycopathologia*, v. 182, n. 9–10, p. 785–795, 2017.

OSCAR BETANCUR, H. *et al.* Persistence of pathogens in liquid pig manure processed in manure tanks and biodigesters. *Revista MVZ Cordoba*, v. 21, n. 1, p. 5237–5249, 2016.

OTENIO, M. H. Reaproveitamento de água residuária em sistemas de produção de leite. In: MARTINS, C. E. (Org.). *Sustentabilidade ambiental, social e econômica da cadeia produtiva do leite Desafios e perspectivas*. 1ª ed. Brasília: Embrapa Gado de Leite, 2015. p. 139–159. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1021902/1/Livro2015SustentabilidadeCompleto.pdf#page=216>>.

PANWAR, S.; FAUJDAR, S. S. Prevalence , Distribution , Risk factors and Antifungal Susceptibility Profiles of *Candida* species in a Tertiary Care Hospital. *International Journal of Current Microbiology and a Applied Sciences*, v. 5, n. 4, p. 329–337, 2016.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015a.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2015b.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. *Nature Publishing Group*, v. 4, n. May, p. 1–20, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>>.

PAUL, S. *et al.* Rapid detection of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* by MALDI-TOF MS. *Medical Mycology*, v. 56, n. 2, p. 234–241, 2018.

PEIXOTO, J. V. *et al.* Candidíase -Uma Revisão De Literatura Candidiasis – a Literature Review. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research -BJSCR*, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2014. Disponível em: <<http://www.mastereditora.com.br/bjscr>>.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2846–2856, 2012.

PFALLER, M A *et al.* Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study , 1997 to 2007: a 10,5 -Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 4, p. 1366–1377, 2010.

PFALLER, MICHAEL A. *et al.* Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: Application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 8, p. 2571–2581, 2013.

PINHEIRO, R. E. E. *et al.* Occurrence and diversity of yeast species isolated from fish feed and tambatinga gut. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 46, n. 4, p. 837–842, 2018.

PONGSANAT, P.; MIYUKI, K. K. Identification and characterization of *Candida tropicalis* isolated from soil of sugarcane field in Thailand for ethanol production. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, v. 23, n. 3, p. 1–9, 2018.

PORTA-DE-LA-RIVA, M. *et al.* Basic Caenorhabditis elegans Methods: Synchronization and Observation. *Journal of Visualized Experiments*, n. 64, p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://www.jove.com/video/4019/>>.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

PUKKILA-WORLEY, R. *et al.* *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryotic Cell*, v. 8, n. 11, p. 1750–1758, 2009.

PUKKILA-WORLEY, R.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 6, 2011.

QUADROS, D. G. DE *et al.* Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos e ovinos em reator contínuo de PVC flexível. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 3, p. 326–332, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662010000300014&lng=pt&tlng=pt>.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.001>>.

RAMASAMY, E. V. *et al.* Feasibility studies on the treatment of dairy wastewaters with upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Bioresource Technology*, v. 93, n. 2, p. 209–212, 2004.

RAMOS, L. S.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex. *Medical Mycology*, v. 55, n. 2, p. 228–232, 2017.

RAVELLA, S. R. *et al.* *Cryptococcus shivajii* sp. nov.: A novel basidiomycetous yeast isolated from biogas reactor. *Current Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 12–16, 2010.

RESENDE, J. A. *et al.* Dynamics of antibiotic resistance genes and presence of putative pathogens during ambient temperature anaerobic digestion. *Journal of Applied Microbiology*, v. 117, n. 6, p. 1689–1699, 2014.

RESENDE, JULIANA ALVES *et al.* Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology*, v. 153, p. 284–291, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.007>>.

RESENDE, JULIANA ALVES *et al.* Seasonal Variation on Microbial Community and Methane Production during Anaerobic Digestion of Cattle Manure in Brazil. *Microbial Ecology*, v. 71, n. 3, p. 735–746, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-015-0647-y>>.

ROETZER, A.; GABALDÓN, T.; SCHÜLLER, C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: Important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, v. 314, n. 1, p. 1–9, 2011.

RUIZ, L. S.; PEREIRA, V. B. R. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. *Bol Inst Adolfo Lutz*, v. 26, n. 2, p. 2–4, 2016.

SANTANA, M. DE C. B. F.; SILVA, M. G. DOS S.; ARAÚJO, M. A. DOS S. Perfil de susceptibilidade de *Candida* spp . isoladas da secreção vaginal de pacientes gestantes e não gestantes atendidas em laboratório da rede privada de Marília Gabriela dos Santos Silva 1 (PROVIC-Unit), e-mail : mariliagabriela_@hotmail.com. 2017, Alagoas: [s.n.], 2017. p. 5–6.

SANTOS, R. D. C. DOS; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. *Mycopathologia*, v. 159, n. 2, p. 251–253, 2005.

SARTORI, L. C. A.; SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Identification of candida species isolated from cows suffering mastitis in four Brazilian states. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, v. 66, n. 5, p. 1615–1617, 2014.

SASANI, E. *et al.* Pseudohyphae formation in *Candida glabrata* due to CO₂ exposure. *Curr Med Mycol*, v. 2, n. 4, p. 49–52, 2016.

SCHNEIDER, V. E. *et al.* *Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas.* . Brasília: [s.n.], 2012.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast In Vitro Susceptibility Profile. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, 2013.

ŞEKER, E. Identification of *Candida* species isolated from bovine mastitic milk and their in vitro hemolytic activity in western Turkey. *Mycopathologia*, v. 169, n. 4, p. 303–308, 2010.

SERDA KANTARCIOLU, A.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, v. 45, n. 5–6, p. 160–165, 2002.

SHARMA, Y.; CHUMBER, S. K.; KAUR, M. Studying the prevalence, species distribution, and detection of in vitro production of phospholipase from *Candida* isolated from cases of invasive candidiasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, v. 9, n. 1, p. 8–11, 2017.

SHI, C. *et al.* Expression of fluconazole resistance-associated genes in biofilm from 23 clinical isolates of *Candida albicans*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 157–163, 2019.

SHIN, J. H. *et al.* Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *Society*, v. 40, n. 4, p. 1244–1248, 2002.

SHIRKHANI, S. *et al.* Activités phospholipase et protéinase d'isolats de *Candida* spp de vulvo-vaginite en Iran. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 26, n. 3, p. 255–260, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.05.001>>.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SOARES FILHO, C. V. *et al.* The Impact of Organic Biofertilizer Application in Dairy Cattle Manure on the Chemical Properties of the Soil and the Growth and Nutritional Status of Urochroa Grass. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 49, n. 3, p. 358–370, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00103624.2018.1427261>>.

SOLÉ-BUNDÓ, M. *et al.* Co-digestion strategies to enhance microalgae anaerobic digestion: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 112, n. June, p. 471–482, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.05.036>>.

SONMEZ, M.; ERBAS, G. Isolation and Identification of *Candida* spp. from Mastitis Cattle Milk and Determination of Antifungal Susceptibilities. *American Journal of Human Genetics*, v. 6, n. 2, p. 18–28, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12259079%0Ahttp://dx.doi.org/10.1186/s13620-016-0074-5>>.

SOSA-HERNÁNDEZ, O. *et al.* Evaluating biochemical methane production from brewer's spent yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 43, n. 9, p. 1195–1204, 2016.

SOUZA, A. C. R. *et al.* Pathogenesis of the *Candida* parapsilosis complex in the model host *Caenorhabditis elegans*. *Genes*, v. 9, n. 8, 2018.

SOUZA, C. DE F. *et al.* Produção volumétrica de metano - dejetos de suínos. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 1, p. 219–224, 2008.

SPANAMBERG, A. *et al.* Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural*, v. 39, n. 1, p. 282–290, 2009.

ST-PIERRE, B.; WRIGHT, A. D. G. Metagenomic analysis of methanogen populations in three full-scale mesophilic anaerobic manure digesters operated on dairy farms in Vermont, USA. *Bioresource Technology*, v. 138, p. 277–284, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.188>>.

STANISZEWSKA, M. Virulence Factors in *Candida* species. *Current Protein & Peptide Science*, v. 21, n. 3, p. 313–323, 2020.

STERKEN, M. G. *et al.* The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*. *Trends in Genetics*, v. 31, n. 5, p. 224–231, 2015.

SUNDBERG, C. *et al.* 454 Pyrosequencing Analyses of Bacterial and Archaeal Richness in 21 Full-Scale Biogas Digesters. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 85, n. 3, p. 612–626, 2013.

ŠVEC, P. *et al.* Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, v. 247, n. 1, p. 59–63, 2005.

SWIATCZAK, P.; CYDZIK-KWIATKOWSKA, A.; RUSANOWSKA, P. Microbiota of anaerobic digesters in a full-scale wastewater treatment plant. *Archives of Environmental Protection*, v. 43, n. 3, p. 53–60, 2017.

SYAICHURROZI, I. *et al.* Kinetics studies impact of initial pH and addition of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on biogas production from tofu wastewater in Indonesia. *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, v. 29, n. 8, p. 1037–1046, 2016.

TAFF, H. T. *et al.* Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.*, v. 8, n. 10, p. 1325–1337, 2013.

TAMURA, N. K. *et al.* [Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers hands]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 1, p. 91–3, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486265>>.

TASNIM, F.; IQBAL, S. A.; CHOWDHURY, A. R. Biogas production from anaerobic co-digestion of cow manure with kitchen waste and Water Hyacinth. *Renewable Energy*, v. 109, p. 434–439, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2017.03.044>>.

TÓTH, R. *et al.* *Candida* parapsilosis: From genes to the bedside. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 2, p. 1–38, 2019.

TROEMEL, E. R. Host-Microsporidia Interactions in *Caenorhabditis elegans* a Model Nematode Host. *The Fungal Kingdom*, n. 1, p. 975–980, 2017.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, v. 74, n. March, p. 1–13, 2016.

TURKER, G. *et al.* Operating conditions influence microbial community structures, elimination of the antibiotic resistance genes and metabolites during anaerobic digestion of cow manure in the presence of oxytetracycline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 147, n. March 2017, p. 349–356, 2018.

TÜRKYILMAZ, S.; KAYNARCA, S. The slime production by yeasts isolated from subclinical mastitic cows. *Acta Veterinaria Brno*, v. 79, n. 4, p. 581–586, 2010.

VENGLOVSKY, J.; MARTINEZ, J.; PLACHA, I. Hygienic and ecological risks

connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Science*, v. 102, n. 3, p. 197–203, 2006.

VIVAN, M. *et al.* Eficiência da interação biodigestor e lagoas de estabilização na remoção de poluentes em dejetos de suínos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 3, p. 320–325, 2010.

VON SPERLING, MARCOS. *Princípios Básicos do tratamento de esgoto*. 2ª ed. Belo Horizonte: SEGRAC, 2018.

VON SPERLING, MARCUS. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 2ª ed. Belo Horizonte: SEGRAC, 1996.

WALSH, J. J. *et al.* Fungal and bacterial growth following the application of slurry and anaerobic digestate of livestock manure to temperate pasture soils. *Biology and Fertility of Soils*, v. 48, n. 8, p. 889–897, 2012.

WANG, F. J. *et al.* Species distribution and in vitro antifungal susceptibility of vulvovaginal *Candida* isolates in China. *Chinese Medical Journal*, v. 129, n. 10, p. 1161–1165, 2016.

WANG, N. *et al.* A comprehensive analysis on spread and distribution characteristic of antibiotic resistance genes in livestock farms of Southeastern China. *PLoS ONE*, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.

WANG, P. *et al.* Microbial characteristics in anaerobic digestion process of food waste for methane production—A review. *Bioresource Technology*, v. 248, p. 29–36, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.152>>.

WERKNEH, A. A.; BEYENE, H. D.; OSUNKUNLE, A. A. Recent advances in brewery wastewater treatment; approaches for water reuse and energy recovery: a review. *Environmental Sustainability*, v. 2, n. 2, p. 199–209, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42398-019-00056-2>>.

WHALEY, S. G. *et al.* Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.

WILLE, M. P. *et al.* Historical trends in the epidemiology of candidaemia: Analysis of

an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 3, p. 288–292, 2013.

WILLEMS, H. M. E. *et al.* Vulvovaginal Candidiasis : A Current Understanding and Burning Questions. *Journal of Fungi*, v. 2, p. 1–20, 2020.

WIRTH, R. *et al.* Characterization of a biogas producing microbial community by short read next generation DNA sequencing. *Biotechnol Biofuels*, v. 5, p. 1–16, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-5-41>>.

XIE, S. *et al.* Review on the removal of antibiotic resistance genes from livestock manure by composting. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, v. 237, n. 5, 2019.

XISTO, M. I. D. S. *et al.* Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous erg11 mutations at position K143R: A new emerging superbug? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 4, p. 988–992, 2017.

YANG, Y. L. *et al.* Comparison of human and soil *Candida tropicalis* isolates with reduced susceptibility to fluconazole. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, 2012.

YILMAZ, L. S.; WALHOUT, A. J. M. Worms, bacteria and micronutrients: an elegant model of our diet. *Physiology & behavior*, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.

ZHANG, R.; HOU, A. Host-Microbe Interactions in *Caenorhabditis elegans* . *ISRN Microbiology*, v. 2013, p. 1–7, 2013.

ZUPANČIČ, G. D.; PANJIČKO, M.; ZELIĆ, B. Biogas production from brewer's yeast using an anaerobic sequencing batch reactor. *Food Technology and Biotechnology*, v. 55, n. 2, p. 187–196, 2017.