

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLAINE TAYNÁ DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA A FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS POR
*Bacillus kochii***

PALOTINA

2023

CAROLAINÉ TAYNÁ DOS SANTOS

**ATIVIDADE ANTAGÔNICA A FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS POR
*Bacillus kochii***

Artigo apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Fiorini Rosado

PALOTINA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
Rua Pioneiro, 2153, - - Bairro Jardim Dallas, Palotina/PR, CEP 85950-000
Telefone: 3360-5000 - <http://www.ufpr.br/>

Ata de Reunião

Aos trinta dias do mês de novembro do ano de 2023, às vinte e uma horas, na sala 13 do Bloco Seminário da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "**Atividade antagônica a fungos filamentosos e leveduras por *Bacillus kochii***" apresentado pela discente **Caroline Tainá dos Santos**, orientada pela Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Defesa Oral, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Defesa Oral, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profa. Dra. Mabel Karina Arantes Alves, nota 90 (noventa), Prof. Dr. Fabio Rogério Rosado, nota 90: (noventa), e Profa. Dra. Adriana Fiorini Rosado, nota: 90 (noventa). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 90 (noventa). Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:20, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FABIO ROGERIO ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:22, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **MABEL KARINA ARANTES ALVES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 05/12/2023, às 14:55, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aquí](#) informando o código verificador **6245910** e o código CRC **9781C6C4**.

ATIVIDADE ANTAGÔNICA A FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS POR *Bacillus kochii*

Caroline Tayná dos Santos

RESUMO

As interações antagônicas são abundantes nas comunidades microbianas e contribuem para a estabilidade a longo prazo de uma comunidade. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade da bactéria *B. kochii* em antagonizar alguns fungos filamentosos e leveduras do gênero *Candida*, além de verificar o perfil de susceptibilidade a antifúngicos. Foram analisados os fungos *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* e *Fusarium* sp., *C. tropicalis* e *C. albicans*. O teste do antagonismo foi realizado utilizando o método de dupla cultura. Além da avaliação dos resultados de inibição do crescimento dos fungos, foi realizado, através de disco-difusão, um antifungigrama, para se avaliar a susceptibilidade dos fungos a alguns antifúngicos comerciais. A bactéria apresentou atividade antagonista contra os fungos *A. terreus*, *A. alternata* (36,9%) e *Fusarium* sp (40,6%). Não houve inibição do crescimento das leveduras. Os fungos filamentosos apresentaram um padrão similar de susceptibilidade antifúngica. Miconazol e cetoconazol inibiram o crescimento micelial com maior intensidade, seguido de nistatina e itraconazol. Todos os fungos filamentosos cresceram na presença de fluconazol e anfotericina B inibiu somente *A. alternata*. O perfil de susceptibilidade foi diferente entre as espécies de *Candida*. *C. tropicalis* apresenta maior resistência à fluconazol e itraconazol do que *C. albicans*. Halos de inibição menores também foram observados com miconazol e cetoconazol e para nistatina, o perfil foi similar. Dessa forma, o isolado de *B. kochii* utilizado neste trabalho tem um excelente potencial para atuar como agente de biocontrole contra doenças causadas principalmente por fungos fitopatogênicos, proporcionando uma alternativa aos fungicidas.

Palavras-chave: Antagonismo. Antifungigrama. *Bacillus kochii*.

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos antagonistas são considerados agentes de biocontrole eficazes devido à capacidade de produzir diferentes tipos de metabólitos considerados antibacterianos e antifúngicos (LUCON *et al.*, 2010). Bactérias do gênero *Bacillus* são fortes candidatas como agentes antagônicos para o biocontrole de patógenos. Trung e colaboradores (2022) verificaram que *Bacillus* sp. isolado de solo da rizosfera inibiu o crescimento micelial de *Alternaria alternata* através de atividade antagonista, demonstrando ser um potencial agente de controle biológico. Esse fungo filamentososo pode gerar podridão nas pontas do caule de plantas, como a pitaia, causando graves perdas econômicas (LUU *et al.*, 2021).

As leveduras são microrganismos frequentemente associados a infecções em hospedeiros que apresentam o sistema imunológico debilitado (CAMPOS, 2020). *Bacillus* sp. também demonstrou ser promissor contra a levedura *Candida albicans*. A espécie *B. brevis*, isolada de amostra de solo, apresentou atividade antagônica contra *C. albicans*, demonstrando ser uma alternativa no controle desse patógeno (GHAJ *et al.*, 2007). De uma forma geral, o gênero *Candida* pode provocar infecções graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos (RORIG, 2009).

A bactéria *Bacillus kochii* foi relatada recentemente na literatura por Seiler e colaboradores (2012). Existem ainda poucos trabalhos na literatura sobre o seu potencial biotecnológico. *B. kochii* apresentou potencial de biodegradação de amostra proveniente de efluente têxtil contendo azocorante (SAMPATH *et al.*, 2021); Degradação de substâncias orgânicas e perfil antagonista contra *Drechslera* sp., *Curvularia lunata* e *Fusarium* sp. (DA SILVA, 2023) e atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (CHINNACHAMY, 2015). Até onde sabemos, não há relatos sobre seu potencial em antagonizar outros microrganismos, como leveduras e fungos filamentosos do gênero *Alternaria* e *Aspergillus*.

Dessa forma, os objetivos principais deste trabalho foram avaliar a capacidade da bactéria *Bacillus kochii* em antagonizar alguns fungos filamentosos como *Alternaria alternata*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* e *Fusarium* sp. e leveduras do gênero

Candida, além de verificar o perfil de susceptibilidade desses fungos à antifúngicos comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A capacidade de alguns microrganismos em restringir o crescimento de outros é pesquisado desde o século XX, concentrando cada vez mais em busca por substâncias inibidoras. O termo “antagonismo microbiano” refere-se à ação de microrganismos contra microrganismos, produzindo substâncias com a capacidade de eliminar ou inibir o crescimento de outro microrganismo (PETERSON *et al.*, 2020).

Fungos patogênicos são uma das principais ameaças para a agricultura. Alguns fungos considerados patogênicos mais comuns pertencem ao gênero *Alternaria*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Além da perda de produtos agrícolas, tornam-se uma ameaça para a saúde por liberarem micotoxinas, incluindo aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisina e alternariol (AZEEM *et al.*, 2022; FENTA *et al.*, 2023).

Cada vez mais pesquisas surgem em busca de alternativas utilizando microrganismos como um agente biológico benéfico para controlar determinadas doenças na produção agrícola (LUU *et al.*, 2021). Uma das bactérias Gram-positivas mais relatadas pertence ao gênero *Bacillus*, com a capacidade de promover o crescimento de plantas e antagonizar uma série de patógenos de plantas, incluindo *A. niger* (SANTOSO *et al.*, 2020), *Fusarium* spp. (KHAN *et al.*, 2018) e *A. alternata* (JIA *et al.*, 2023).

O gênero *Bacillus* é considerado uma bactéria endofítica de biocontrole para diversas plantas, como as espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (XIA *et al.*, 2023). De acordo com Hashem *et al* (2019), o mecanismo desse gênero no controle de doenças patogênicas está relacionado na liberação de enzimas que degradam substâncias, atividade antagonistas, competição por nutrientes e promoção no crescimento através do aumento de absorção de ferro na planta.

B. kochii foi descrito pela primeira vez por Seiler e colaboradores (2012), como uma bactéria Gram-positiva, formadora de endósporos, estritamente aeróbica, bastonetes móveis, catalase positivo e oxidase negativo.

Existem poucos relatos na literatura sobre o potencial biotecnológico da *B. kochii*. Foi verificada a biodegradação da bactéria em amostra de efluente proveniente de indústria têxtil contendo o corante azocorante, observando a degradação ocasionado pela bactéria em grupos aromáticos, analisados por FTIR (Análise infravermelha por transformada de Fourier) (SAMPATH *et al.*, 2021). Recentemente, um trabalho recente realizado na nossa equipe de pesquisa abordou a prospecção de bactérias com potencial degradador de substâncias orgânicas, isoladas e blendas de diesel e *B. kochii* apresentou halos de hidrólise para as atividades lipolítica, celulolítica, amilolítica, proteolítica e β -hemólise para atividade hemolítica. Além disso, apresentou perfil antagonista contra três fungos filamentosos: *Drechslera* sp., *Curvularia lunata* e *Fusarium* sp. (DA SILVA, 2023).

Em relação à atividade antimicrobiana de *B. kochii* há poucos relatos. O pesquisador Chinnachamy (2015) investigou o potencial antibacteriano dessa espécie contra alguns patógenos considerados de risco para a saúde humana. Como resultado, a *B. kochii* inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, a produção de nanopartículas de prata com *B. kochii*, verificou a eficiência antimicrobiana contra *Salmonella Typhymurium*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (VALDIVEL *et al.*, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados no laboratório do Núcleo Experimental de Micologia Aplicada (NEMA) e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

3.2 MICRORGANISMOS SELECIONADOS

Quatro fungos filamentosos foram selecionados para o trabalho, sendo: *Alternaria alternata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* e *Fusarium* sp. e para leveduras, foram utilizadas duas cepas padrão de *Candida* spp., *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. albicans* (ATCC 9028). Todos os microrganismos são pertencentes à Micoteca do NEMA. Para a verificação do potencial antagonista, foi utilizado a bactéria *Bacillus kochii*, isolada a partir de blendas de diesel em um trabalho anterior desenvolvido pela nossa equipe (dados não publicados).

3.3 CULTIVO DOS FUNGOS E LEVEDURAS

Os fungos foram repicados para placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), com auxílio de alça microbiológica, em condições assépticas. Após a inoculação dos fungos, as placas foram incubadas de 28°C a 30°C por 5 dias para ocorrer o desenvolvimento do micélio na superfície do ágar. As leveduras também foram cultivadas em SDA e as placas foram incubadas a 35°C de 3 a 5 dias.

3.4 CULTIVO E IDENTIFICAÇÃO DE *B. kochii*

O isolado de *B. kochii* foi mantido em freezer a -20 °C, contendo meio LB (Luria-Bertani) e glicerol (15%). A bactéria foi reativada em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubada a 36 °C por 24h. A partir do caldo, com o auxílio de uma alça microbiológica e sob condições assépticas, foi estriado na superfície da placa contendo SDA e incubado a 36 °C de 24 a 48 horas. Em seguida, foram analisados os aspectos de morfologia da colônia e características morfotintoriais (Coloração de Gram), de acordo com o método descrito por Strohl *et al.* (2004).

3.5 CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROSCÓPICA DOS FUNGOS E LEVEDURAS

Essas observações foram realizadas para a confirmação da pureza das colônias e registro das características macro e microscópicas de cada fungo e levedura

analisadas. Após o crescimento das colônias fúngicas e leveduras, analisou-se as suas características macroscópicas como a cor, textura e tamanho. Posteriormente iniciou-se a análise microscópica, em que foram preparadas lâminas para a análise com o auxílio de um microscópio óptico com o objetivo de observar e identificar as principais estruturas como hifas e estruturas de reprodução assexuada. Na preparação das lâminas para microscopia de luz utilizou-se a técnica com fita adesiva (durex), em que um pedaço de fita foi estendido sobre a superfície da colônia e em seguida foi removida cuidadosamente e aderida à lâmina contendo corante lactofenol azul de algodão. Após a preparação das lâminas, procedeu-se à observação microscópica e a fotodocumentação.

3.6 ATIVIDADE ANTAGONISTA

O teste do antagonismo foi realizado para verificar se *B. kochii* apresentava capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos e leveduras. O método de dupla cultura foi realizado conforme descrito por Haidar *et al.* (2016). Para essa análise, a bactéria foi inoculada por picada central com agulha microbiológica em placas de Petri estéreis de poliestireno 60 x 15 mm em ágar SDA, juntamente com um pequeno fragmento da colônia fúngica (ágar e micélio, quadrado de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm). Como controle, os fungos foram inoculados sem a bactéria. O ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 28°C por 5 dias. A inibição do crescimento fúngico foi avaliada medindo o diâmetro da colônia fúngica e expressa com a seguinte equação, de acordo com Jia *et al.* (2023):

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = [(d - d_0)/d] \times 100\%$$

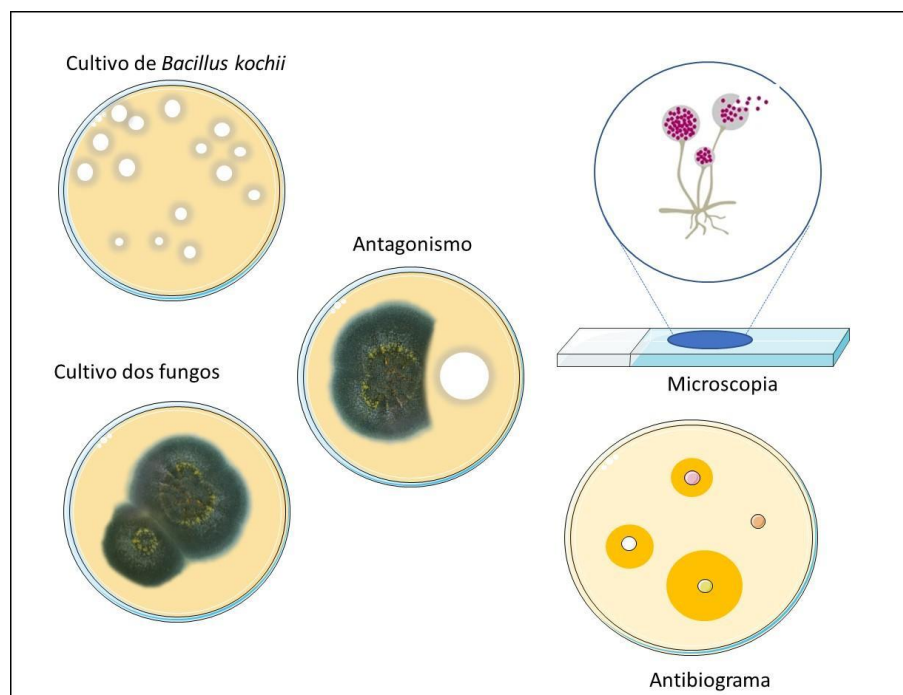
onde d (mm) representa o raio de crescimento radial da colônia fúngica sem a presença da bactéria e d_0 (mm) representa a média do raio de crescimento radial da colônia na presença de *B. kochii*.

3.7 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS FUNGOS À ANTIFÚNGICOS COMERCIAIS

O teste de disco-difusão em ágar foi realizado de acordo com a metodologia descrita no documento M51-A (CLSI 2010), para fungos filamentosos e M44-A2 (CLSI 2018) para leveduras e pelo fabricante (CECON, Brasil). O inóculo foi preparado diluindo algumas colônias das leveduras e a parte superficial do micélio dos fungos filamentosos em 3 mL de solução salina (NaCl 0,85%), na escala 0,5 de McFarland. Após breve homogeneização em Vórtex, os fungos foram coletados com auxílio de um *swab* de algodão de haste longa e semeado sobre a superfície de uma placa de Petri de vidro 150 x 15 mm, em 4 planos diferentes. Em cada placa foi adicionado, com auxílio de uma pinça flambada, 1 disco de cada um dos antifúngicos (anfotericina B 100 µg, nistatina 100 U.I, miconazol 50 µg, cetoconazol 50 µg, fluconazol 25 µg e itraconazol 10 µg (Cecon, Brasil). O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h, para as leveduras e a 28°C por 5 dias, para os fungos filamentosos. Após o período de incubação, os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital.

A Figura 1 representa o esquema do procedimento experimental realizado neste trabalho.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL



FONTE: A Autora (2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS DE *B. kochii*

A cultura na *B. kochii* em SDA apresentou coloração bege/amarela com bordas irregulares. As colônias formam um relevo no meio de cultura, com um centro mais alto do que as bordas e com textura cremosa (FIGURA 2).

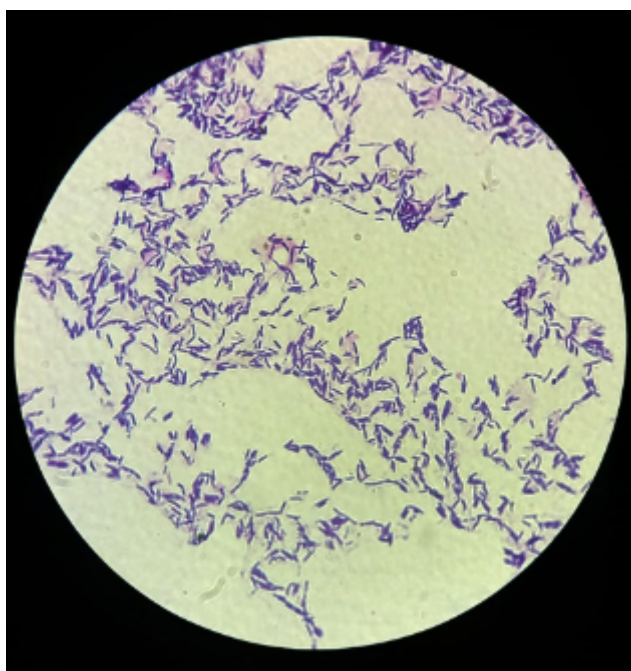
Através da técnica de Coloração de Gram, foi possível determinar as características morfotintoriais da bactéria. *Bacillus kochii* apresentou uma morfologia de bastonetes Gram-positiva (FIGURA 3) conforme relatado por Seiler e colaboradores (2012).

FIGURA 2 - MACROMORFOLOGIA DE *B. kochii* EM ÁGAR SDA



FONTE: A autora (2023).

FIGURA 3 - MICROMORFOLOGIA DE *B. kochii* em SDA.



FONTE: A autora (2023). Aumento de 1000x

4.2 ASPECTOS MACRO E MICROSCÓPICOS DOS FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS

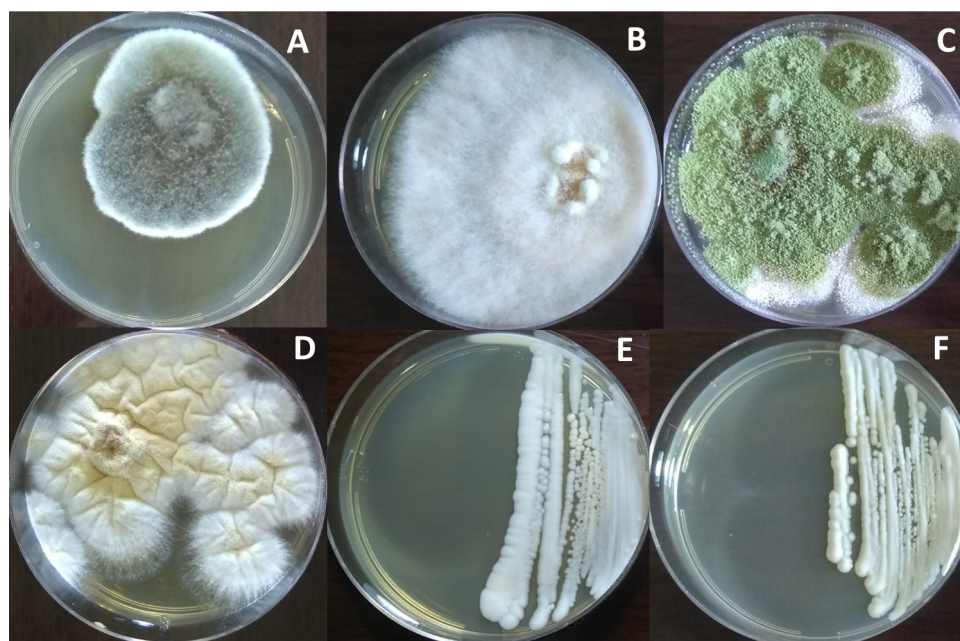
As principais características macromorfológicas dos fungos e leveduras analisadas neste trabalho, incluindo morfologia, coloração e aspecto das colônias estão apresentadas na Tabela 1 e Figura 4. A Figura 5 mostra as características microscópicas, evidenciando as hifas e estruturas de reprodução assexuadas.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS DOS FUNGOS E LEVEDURAS

Microrganismo	Aspecto	Aspecto da colônia		
		Textura	Cor	Bordas
<i>Alternaria alternata</i>	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Regulares
<i>Aspergillus oryzae</i>	Filamentoso	Algodonosa	Branco/Verde	Regulares
<i>Aspergillus terreus</i>	Filamentoso	Algodonosa	Acinzentado	Regulares
<i>Fusarium sp.</i>	Filamentoso	Algodonosa	Branco	Regulares
<i>Candida tropicalis</i>	Leveduriforme	Cremosa	Branco	Irregulares
<i>Candida albicans</i>	Leveduriforme	Cremosa	Amarelo/Creme	Irregulares

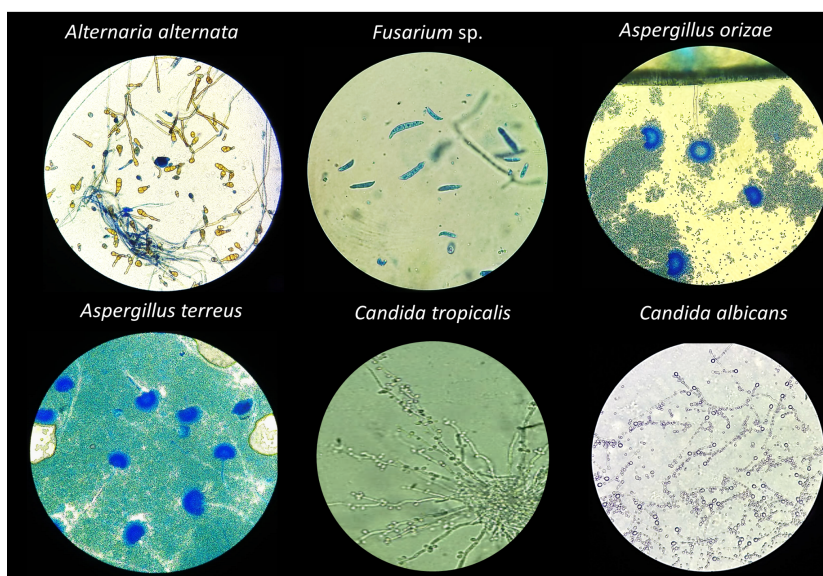
FONTE: A autora (2023).

FIGURA 4 - MACROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ANALISADOS EM ÁGAR SDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO ENTRE 28°C a 30°C, E LEVEDURAS EM ÁGAR SDA, APÓS 3 a 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM 35°C



LEGENDA: **A.** *Alternaria alternata*, **B.** *Fusarium sp.*, **C.** *Aspergillus oryzae*, **D.** *Aspergillus terreus*, **E.** *Candida tropicalis*, **F.** *Candida albicans*. FONTE: A autora (2023).

FIGURA 5 - MICROMORFOLOGIA DOS FUNGOS ANALISADOS EM ÁGAR SDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO ENTRE 28°C a 30°C, E LEVEDURAS EM ÁGAR SDA, APÓS 3 a 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM 35°C



LEGENDA: As imagens de *C. tropicalis* e *C. albicans* pertencem ao banco de imagens do NEMA e foram obtidas após laminocultivo em ágar fubá com Tween 80. FONTE: A autora (2023). Aumentos de 400x, exceto para *Fusarium* sp. (1000x)

4.3 ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *B. kochii* CONTRA FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS

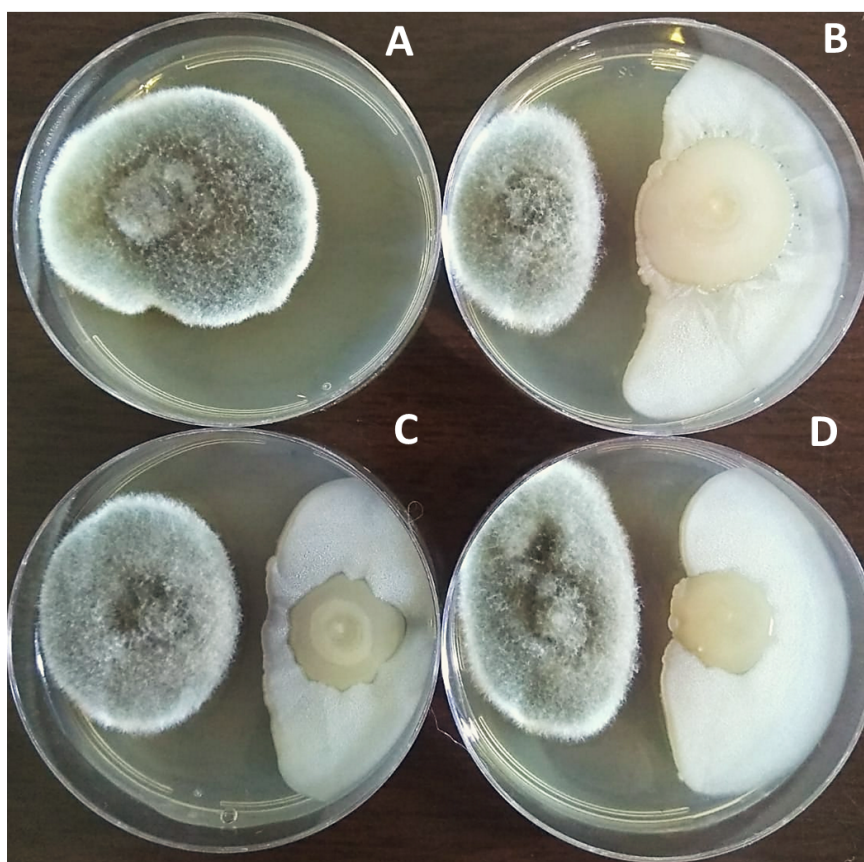
A bactéria *B. kochii* apresentou atividade antagonista, verificada pela inibição do crescimento micelial, contra os fungos filamentosos *A. terreus*, *A. alternata* e *Fusarium* sp., exceto para *A. oryzae*. Não foi possível observar inibição do crescimento das leveduras do gênero *Candida*. As Figuras 6 a 9 ilustram o resultado da cultura pareada entre a bactéria e os fungos *A. alternata*, *A. terreus*, *Fusarium* sp. e *A. oryzae*, respectivamente e as Figuras 10 e 11, respectivamente para as leveduras *C. tropicalis* e *C. albicans*.

A bactéria foi capaz de inibir em 36,9% o crescimento micelial do fungo *A. alternata* (FIGURA 6). Em um trabalho recente, Jia *et al.* (2023) analisaram o efeito antagonista de uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, isolada da rizosfera, contra *A. alternata*. Os autores propõem utilizar essa bactéria para combater a alternariose, uma

doença de tomateiros que se caracteriza pelo aparecimento de manchas negras nos frutos e folhas, causada por esse fungo. Através de análises por UPLC-QTOF-MS, o composto antifúngico detectado, produzido pela bactéria foi a fengicina.

A. alternata apresenta colônias com coloração parda, presença de alteração da coloração na superfície entre o contorno e as margens, variando de branco para palha. São produtores de micotoxinas, nas quais realizam um importante papel na patogênese e podem ser empregadas como agentes seletivos na seleção *in vitro* no nível celular para resistência a doenças (HAMID, 2000). A morfologia microscópica desta espécie é reconhecida principalmente pelos grandes conídios multicelulares marrons. Além disso, apresenta hifas proliferantes dando origem a conidióforos, cujos ramos formam conídios ainda imaturos.

FIGURA 6 - ANTAGONISMO DE *Bacillus kochii* CONTRA *Alternaria alternata* EM ÁGAR SDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA DE 28°C A 30°C

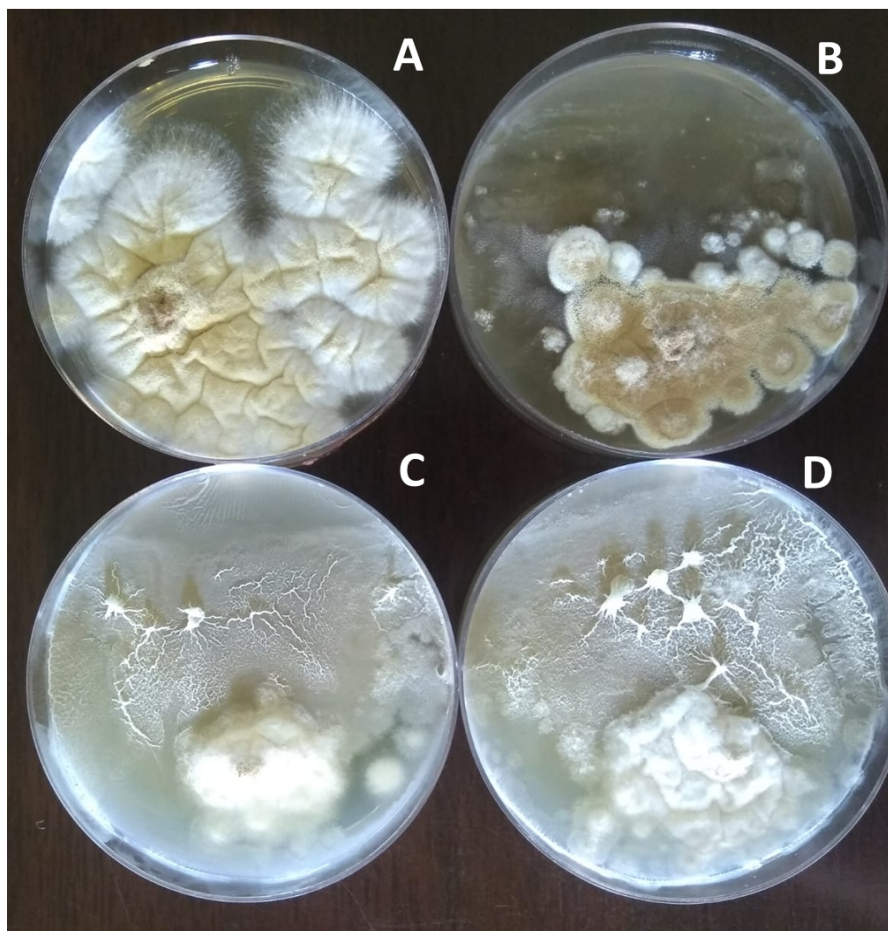


LEGENDA: (A) Controle *Alternaria alternata*. (B, C e D) ensaio em triplicata. FONTE: A autora (2023).

Quanto ao ensaio de antagonismo contra o fungo *A. terreus*, foi possível observar que *B. kockii* causou uma diminuição significativa no espalhamento da colônia, apesar de *A. terreus* ser um fungo que produz muitos esporos e que facilmente se espalha sobre a superfície do meio de cultura (FIGURA 7). Não foi possível estimar a porcentagem de inibição micelial e as observações são apenas visuais. Foi possível observar (FIGURA 7B) que as colônias individuais apresentaram diâmetros reduzidos, na presença da bactéria, comparando com o controle. Não foram encontrados trabalhos na literatura reportando o antagonismo de microrganismos contra o fungo *A. terreus*. No entanto, autores reportaram a utilização desse fungo contra outros fungos, como o relatado por Melo, Faul e Nascimento (2006), em que linhagem de *A. terreus* mostrou forte atividade parasítica contra *Sclerotinia sclerotiorum*, um fungo fitopatogêno bastante comum. Interações entre o patógeno e o antagonista revelaram que *A. terreus* esporulou profusamente sobre os escleródios. Em um outro trabalho mais recente, Choi e Ahsan (2022) isolaram uma linhagem de *A. terreus* e verificam que essa espécie é capaz de inibir o crescimento de fitopatogênos *Colletotrichum acutatum*, *A. alternata* e *Fusarium oxysporum*.

Apesar dos relatos encontrados neste trabalho, vale ressaltar que *A. terreus* constitui um fungo oportunista emergente e infecções invasivas por este patógeno estão associadas a infecções disseminadas e altas taxas de mortalidade (RISSLEGGGER *et al.*, 2017) e para alguns autores, pode ser considerado um fitopatogêno (GRESSLER *et al.*, 2015). Por outro lado, tem sido estudado como fonte de lovastatina, um metabólito secundário que pode reduzir o risco de doenças cardíacas em seres humanos (BORUTA e BIZUKOJC, 2017).

FIGURA 7 - ANTAGONISMO DE *Bacillus kochii* CONTRA *Aspergillus terreus* EM ÁGAR SDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA DE 28°C A 30°C



LEGENDA: (A) Controle *Aspergillus terreus*. (B, C e D) ensaio em triplicata. FONTE: O autor (2023).

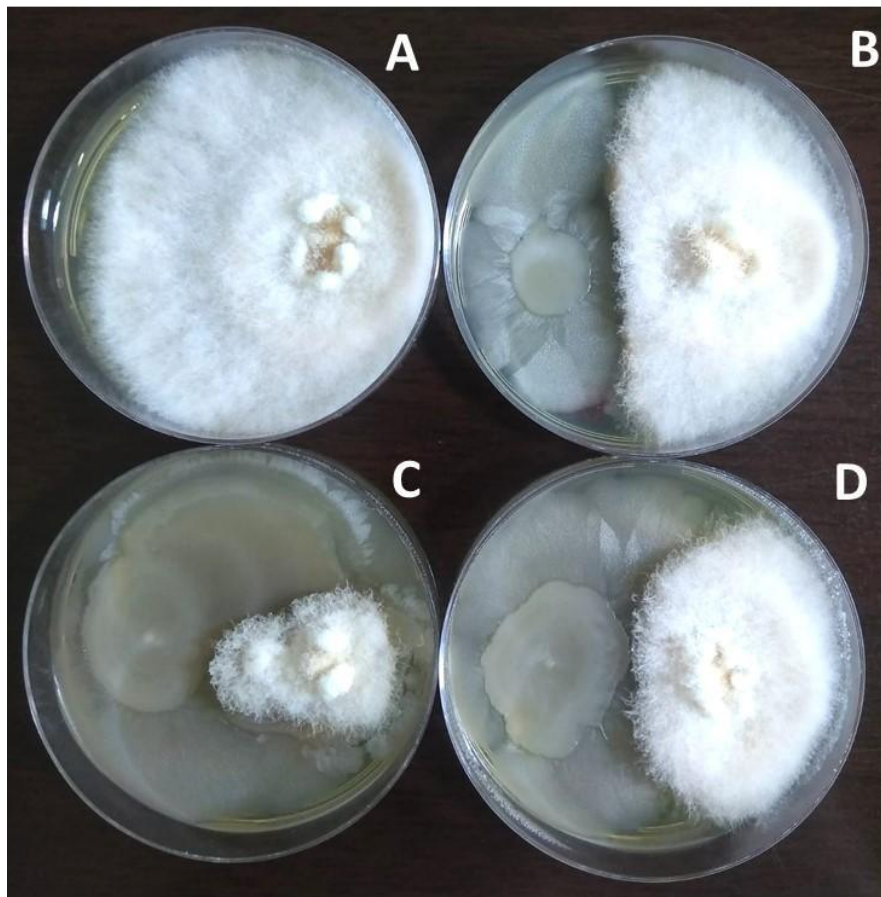
A porcentagem de inibição de *Fusarium* sp., por *B. kochii* foi de 40,6% (FIGURA 8). O efeito antagonista de microrganismos, principalmente bactérias, tem sido grandemente relatado sobre espécies fitopatogênicas de *Fusarium*. Santos e colaboradores (2022), verificam que um isolado de *Bacillus* sp. apresenta capacidade de inibir o crescimento micelial do fungo *Fusarium kalimantanense*, um fitopatógeno da linhagem genética de *F. oxysporum*, conhecido por causa doenças em bananeira. Outras espécies de *Bacillus* foram relatadas como antagonistas de *Fusarium* spp. por exemplo, uma cepa de *B. amyloliquefaciens* foi capaz de causar inibição de 30 a 40% do micélio de *F. oxysporum* (YUAN *et al.*, 2012), e *B. velezensis* causou uma inibição variando entre 19,76% e 55,02% do crescimento de *F. oxysporum* sp. *fragariae* (LI *et al.*, 2020).

As espécies de *Fusarium* apresentam colônias de crescimento rápido com

micélios aéreos em forma de feltro ou flocoso. As colônias apresentam coloração diversificada podendo ser rosa, bordô, branco e violeta azulado, isto vai depender da espécie. Os conídios, alongados ou arredondados, são geralmente produzidos em esporodóquios e aparecem como manchas viscosas nas plantações (MOLINA *et al.* 2015).

A maioria das espécies de *Fusarium* são encontradas nas frutas, uma vez que produzem grandes quantidades de micotoxinas que geram podridão radicular, cancrios e murchação das folhas, o que pode gerar doenças tanto em humanos quanto em animais. Contudo, eles podem ser muito benéficos, já que produzem metabólitos secundários e podem ser usados como pigmentos ou ter atividades biológicas com importância na área médica (NIRMALADEVI *et al.*, 2014). Caracteriza-se por desenvolver colônias com um aspecto circular de textura aveludada ou lanosa, plana ou com sulcos radiais, com micélio branco. A coloração pode variar do marrom canela ao marrom amarelado, o reverso da placa de cultura pode ser visto como amarelo, dourado ou marrom e às vezes com um pigmento amarelo difusível no meio. O conidióforo é formado por três estruturas distintas, como a vesícula biliar, o estipe e a célula do pé que se liga ao resto das hifas. Células conidiogênicas, chamadas células filóides, se formam na vesícula biliar e, dependendo da espécie, outras células se desenvolvem entre as vesículas e as células filóides, chamadas medulas.

FIGURA 8 - ANTAGONISMO DE *Bacillus kochii* CONTRA *Fusarium* sp. EM ÁGAR SDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA DE 28°C A 30°C



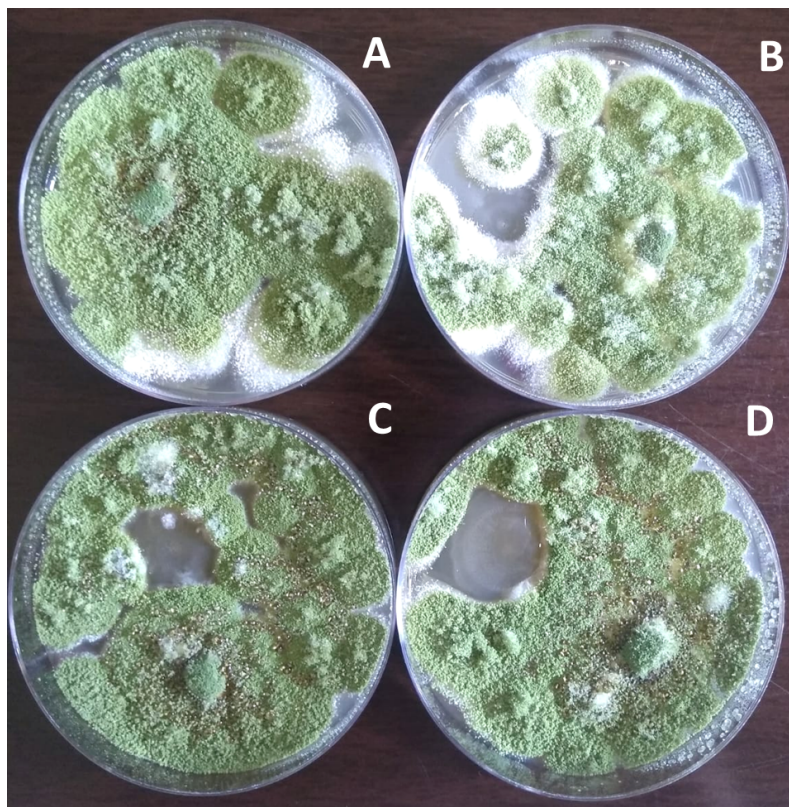
LEGENDA: (A) Controle *Fusarium* sp. (B, C e D) ensaio em triplicata. FONTE: O autor (2023).

Em relação ao ensaio realizado com *A. oryzae*, podemos observar que o micélio fúngico se espalhou por toda a placa, mas, diferentemente de *A. terreus*, não houve inibição do crescimento fúngico, na presença da bactéria (FIGURA 9). Foi possível observar que o fungo apenas não cresceu sobre a colônia bacteriana.

A. oryzae apresenta-se com uma coloração esbranquiçada e depois fica com uma coloração esverdeada e com o passar do tempo fica amarronzada. A textura da cultura tem aspecto aveludado, sendo encontrado no solo e materiais vegetais em decomposição, em regiões tropicais já que requer temperatura de crescimento relativamente quente. A espécie é uma grande aliada para a biotecnologia, já que apresenta um grande potencial de produzir e secretar grandes quantidades de proteínas e principalmente enzimas (MACHIDA et al., 2008). Como todas as espécies

do gênero, a estrutura de reprodução assexuada é representada por uma hifa aérea (conidióforo) que forma uma vesícula com fiálide e fialósporos.

FIGURA 9 - ANTAGONISMO DE *Bacillus kochii* CONTRA *Aspergillus oryzae* EM ÁGAR SDA, APÓS 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA DE 28°C A 30°C



LEGENDA: (A) Controle *Aspergillus oryzae*. (B, C e D) ensaio em triplicata. FONTE: O autor (2023).

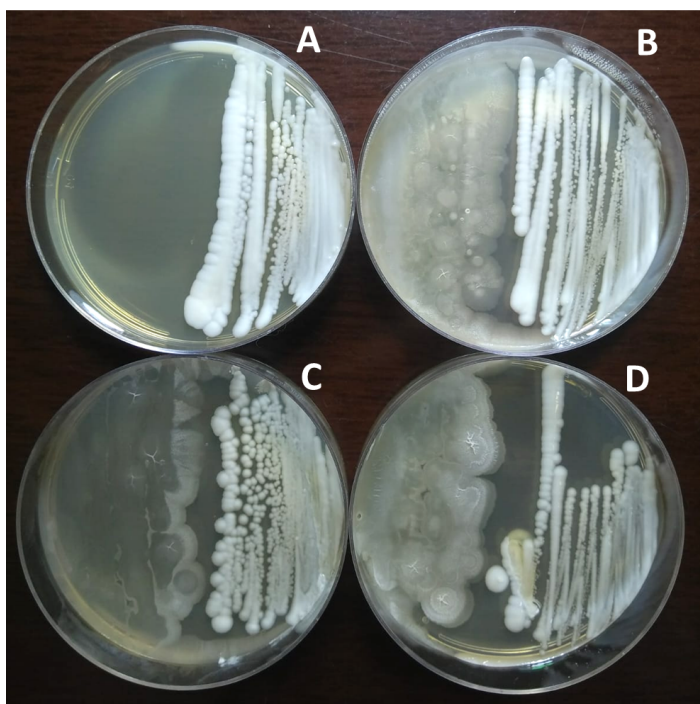
Da Luz *et al.* (2022), em um estudo para avaliar a atividade antagonista da bactéria *Bacillus licheniformis*, verificaram que essa bactéria foi capaz de inibir 45% do crescimento micelial de *A. oryzae*, além de outros fungos, apresentando efeito antifúngico sobre essa espécie de *Aspergillus*.

Hussein e colaboradores (2015) avaliaram o efeito antagonista da levedura *C. albicans* contra fungos filamentosos patogênicos e relataram que *A. oryzae* foi o mais sensível. Os autores concluem que a ação inibitória de *C. albicans* contra outros fungos não apenas torna *C. albicans* mais competente na microbiota, mas também fornece ao corpo humano mais uma linha de defesa contra fungos oportunistas. A principal via de entrada dos fungos no corpo humano é geralmente através do sistema respiratório e *C. albicans* é geralmente encontrada na superfície mucosa do nariz e da boca

(NASUTION et al., 2013).

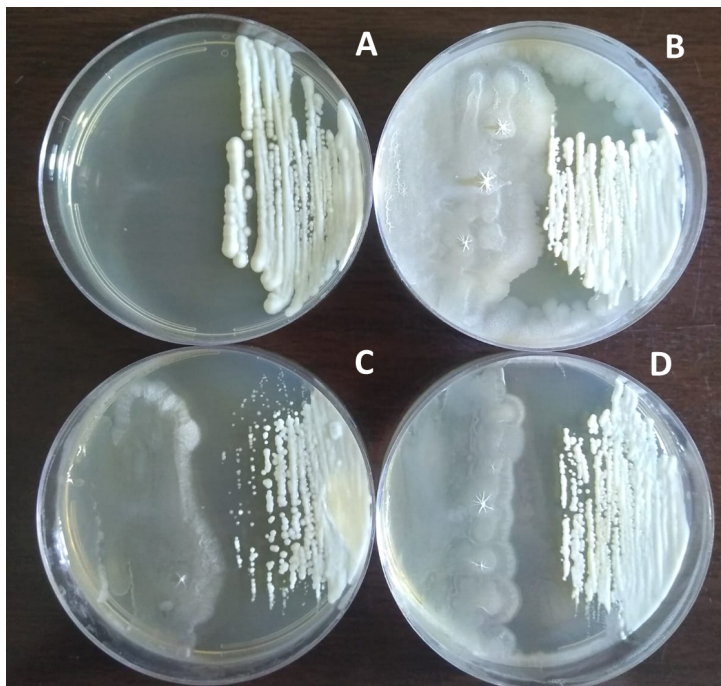
Nenhum efeito inibitório foi observado quando *C. tropicalis* e *C. albicans* foram cultivadas com *B. Kochii* (FIGURAS 10 e 11).

FIGURA 10 - ANTAGONISMO DE *Bacillus kochii* CONTRA *Candida tropicalis* EM ÁGAR SDA, APÓS 3 A 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA DE 35°C



LEGENDA: (A) Controle *Candida tropicalis*. (B, C e D) ensaio em triplicata. FONTE: O autor (2023).

FIGURA 11 - ANTAGONISMO DE *B. kochii* CONTRA *Candida albicans* EM ÁGAR SDA, APÓS 3 A 5 DIAS DE INCUBAÇÃO EM ESTUFA DE 35°C



LEGENDA: (A) Controle *Candida albicans*. (B, C e D) ensaio em triplicata. FONTE: O autor (2023).

C. albicans é um patógeno fúngico oportunista do gastrointestinal humano e está associado a infecções que variam desde infecções superficiais da mucosa até doenças disseminadas com risco de vida. Considerado um fungo dimórfico, apresenta-se sob a forma leveduriforme (blastocónídios) no estado saprofítico, de forma assintomática ou na forma filamentosa (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), no processo patogênico. Além disso, sob ótimas condições de crescimento, podem ocorrer a formação de clamidósporos, que são esporos mais arredondados com uma espessa parede celular. Portanto, *C. albicans* é considerado um organismo pleomórfico (KADOSH, 2016).

C. albicans possui uma interação complexa com o hospedeiro através da parede celular, que é a principal estrutura em contato com o hospedeiro. É essencial para a integridade celular dos fungos. A parede celular fúngica protege as células do estresse ambiental, incluindo mudanças drásticas de temperatura, alterações osmóticas, desidratação e resposta imunológica (GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020).

C. tropicalis é uma levedura considerada oportunista, colonizando o trato gastrointestinal, trato geniturinário e cavidade oral. As colônias são brancas a creme, com textura cremosa e aparência lisa, podendo apresentar bordas levemente enrugadas. Considerado um fungo dimórfico com a formação de pseudo-hifa, gerando estruturas longas, ramificadas e com blastoconídios esféricos. Sob ótimas condições de crescimento, pode formar hifas verdadeiras, uma característica bastante semelhante com a *C. albicans* (TREVINO-RANGEL *et al.*, 2018).

Dentre todas as espécies pertencentes ao gênero *Candida*, a *C. tropicalis* é considerada de grande importância para a saúde, devido ao seu alto fator de virulência e a capacidade de mudar seu estado morfológico entre a forma leveduriforme e filamentosa, bem como a formação de biofilme. Essa mudança permite que a levedura consiga se adaptar e sobreviver a diversas variações no ambiente do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2012).

Vários relatos na literatura sugerem que espécies do gênero *Bacillus* são fontes de compostos voláteis antimicrobianos (como Propanona, 1-butanol, 3-metil-butanol, ácido acético, ácido 2-metil-propanóico, dissulfeto de carbono, ácido 3-metil-butanóico e acetato de etila) sendo fortes candidatos para biocontrole de patógenos do solo e pós-colheita (SHAFI *et al.*, 2017, CHAVES-LÓPEZ *et al.* 2015).

5.2 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS

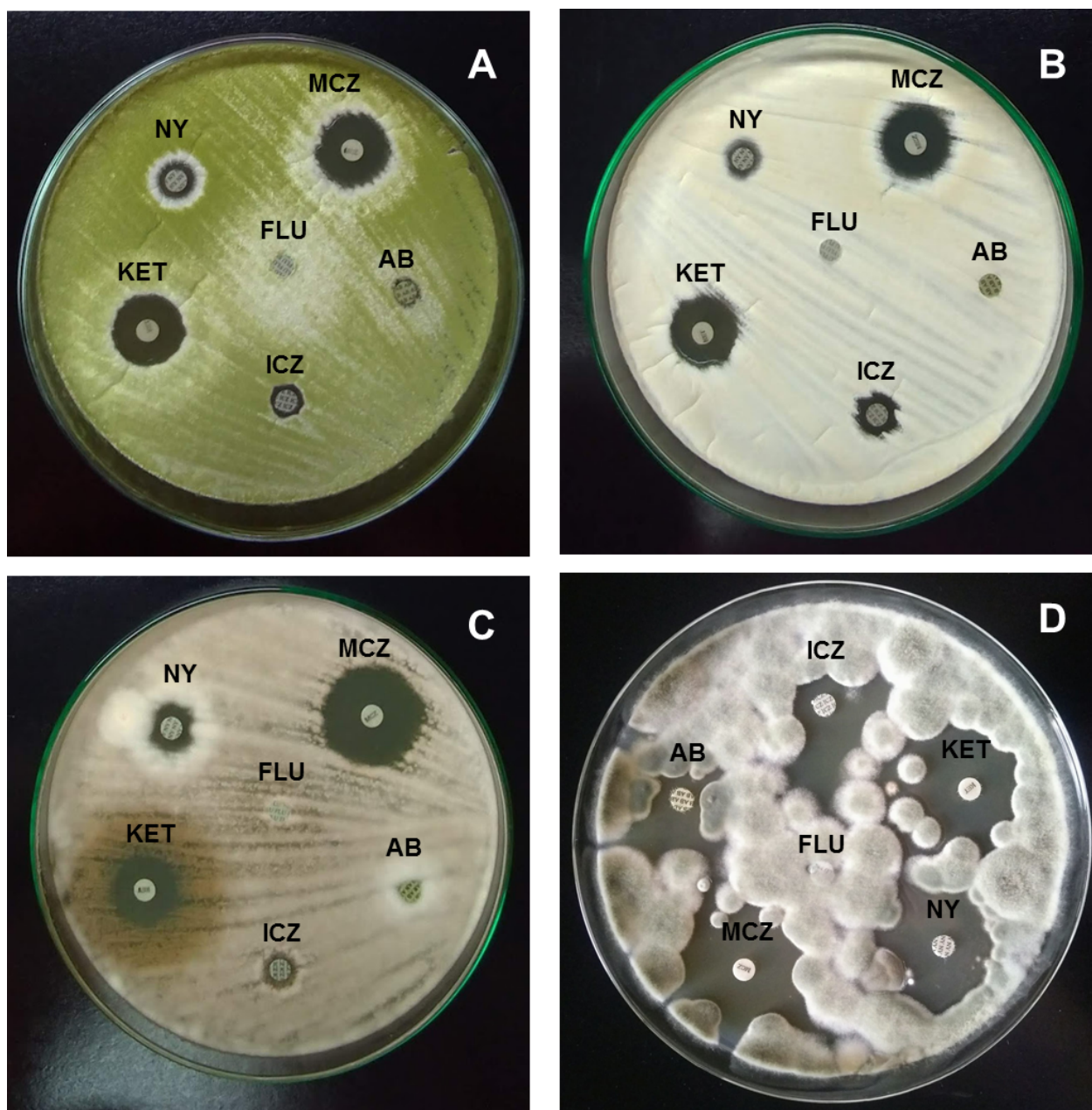
As Figuras 12 e 13 e a Tabela 2 mostram os resultados do perfil de susceptibilidade a antifúngicos dos fungos e leveduras analisados. Os critérios interpretativos das zonas de inibição para as leveduras foram baseados nas normas publicadas no CLSI: sensível, diâmetro da zona ≥ 19 mm; suscetível dependente da dose, diâmetro da zona de 15 a 18 mm; resistente, diâmetro de zona ≤ 14 mm.

Não foi possível classificar os fungos filamentosos quanto ao perfil de susceptibilidade pois, embora o CLSI tenha desenvolvido procedimentos reprodutíveis para o teste de suscetibilidade antifúngica de leveduras e bolores por microdiluição em caldo (documentos M27-A2 e M38-A) e leveduras por disco-difusão (documento M44-A), as diretrizes de referência não estão disponíveis para testes de disco-difusão

com fungos filamentosos. No entanto, foi possível observar que os fungos filamentosos apresentaram um padrão similar, frente aos diferentes antifúngicos utilizados. Miconazol e cetoconazol parecem inibir o crescimento micelial com maior intensidade, seguido de nistatina e itraconazol. Todos os fungos filamentosos cresceram na presença de fluconazol e anfotericina B apresentou efeito inibitório somente para *A. alternata*.

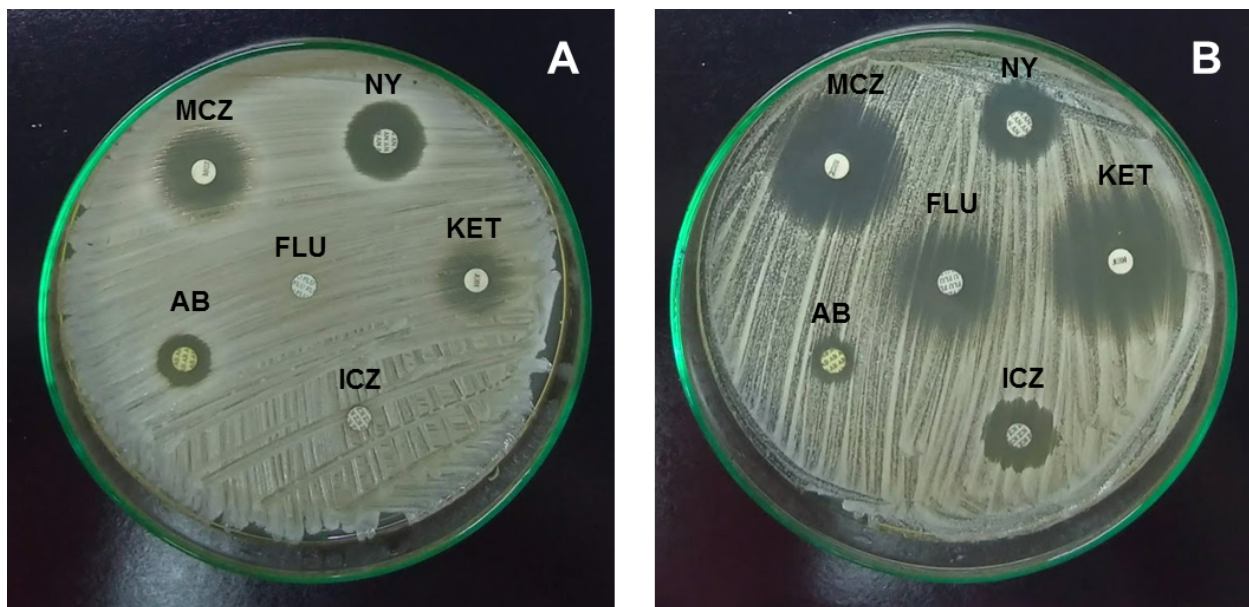
O perfil de susceptibilidade foi diferente entre as espécies de *Candida*, *C. tropicalis* apresenta uma maior resistência à fluconazol e itraconazol do que *C. albicans*. Halos de inibição menores também foram observados quando se utilizou os antifúngicos miconazol e cetoconazol. Já para nistatina, o perfil foi similar.

FIGURA 12 - PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DOS FUNGOS FILAMENTOSOS



LEGENDA: (A) *A. oryzae*. (B) *A. terreus*. (C) *Fusarium* sp. (D) *A. alternata*. Discos antifúngicos: (AB) Anfotericina B 100 µg. (NY) Nistatina 100 U.I. (MCZ) Miconazol 50 µg. (KET) Cetoconazol 50 µg. (FLU) Fluconazol 25 µg. (ICZ) Itraconazol 10 µg. FONTE: O Autor (2023).

FIGURA 13 - PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*



LEGENDA: (A) *C. tropicalis*. (B) *C. albicans*. Discos antifúngicos: (AB) Anfotericina B 100 µg. (NY) Nistatina 100 U.I. (MCZ) Miconazol 50 µg. (KET) Cetoconazol 50 µg. (FLU) Fluconazol 25 µg. (ICZ) Itraconazol 10 µg. FONTE: O Autor (2023).

TABELA 2 - PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DOS FUNGOS ANALISADOS

Fungo	Antifúngico	Zona inibição (mm)	Susceptibilidade
<i>Alternaria alternata</i>	Anfotericina B	12	
	Nistatina	25	
	Miconazol	27	
	Cetoconazol	25	
	Fluconazol	-	
	Itraconazol	15	
<i>Fusarium sp.</i>	Anfotericina B	-	
	Nistatina	17	
	Miconazol	31,5	
	Cetoconazol	23,5	
	Fluconazol	-	
	Itraconazol	10,5	
<i>Aspergillus oryzae</i>	Anfotericina B	9	
	Nistatina	15	
	Miconazol	23	
	Cetoconazol	24,5	
	Fluconazol	-	
	Itraconazol	11	
<i>Aspergillus terreus</i>	Anfotericina B	-	
	Nistatina	14,5	
	Miconazol	24	
	Cetoconazol	24,5	
	Fluconazol	-	
	Itraconazol	13	
<i>Candida tropicalis</i>	Anfotericina B	15,5	I
	Nistatina	22,5	S
	Miconazol	26	S
	Cetoconazol	14,5	R
	Fluconazol	-	R
	Itraconazol	-	R
<i>Candida albicans</i>	Anfotericina B	24	S
	Nistatina	21	S
	Miconazol	36	S
	Cetoconazol	35	S
	Fluconazol	28	S
	Itraconazol	22	S

LEGENDA: (S) Sensível. (I) Intermediário. (R) Resistente. FONTE: A Autora (2023).

Aspergillus spp. e *Fusarium spp.* fazem parte dos principais agentes causadores de infecções pulmonares severas (ITO, 2022). Os agentes antifúngicos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos e potencialmente utilizados para o tratamento da aspergilose são anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B, voriconazol, itraconazol, posaconazol, isavuconazol, caspofungina e micafungina. Dentre esses, é bastante citado o uso de anfotericina B, que pode ser

administrada através de partículas lipossomais. Anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos e se liga ao ergosterol nas membranas fúngicas formando poros e levando à morte celular, mas tratamentos sistêmicos com esse antifúngico apresentam risco de nefrotoxicidade (ITO, 2021).

A. terreus e *A. fumigatus* são conhecidos por apresentarem resistência intrínseca à anfotericina B (REICHERT-LIMA *et al.*, 2018). Entre as cinco espécies mais comuns de *Aspergillus*, *A. terreus* é frequentemente associado ao aumento da mortalidade devido à sua resistência intrínseca à anfotericina B (HACHEM *et al.*, 2014). Os resultados apresentados por esses autores indicam que este padrão de suscetibilidade depende das espécies crípticas dentro da seção Terrei. O mecanismo de resistência intrínseca de *A. terreus* à anfotericina B não é muito claro. Foi relatado que a menor quantidade de ergosterol na membrana celular de *A. terreus* é parcialmente responsável pela fraca atividade da anfotericina B contra este fungo (CHAMILOS e KONTOYIANNIS, 2005). Segundo Trifilio e colaboradores (2005) o triazol voriconazol é o antifúngico de escolha para aspergilose causada por esse agente (antifúngico não analisado neste trabalho).

Aspergillus oryzae não está entre os principais agentes causadores de aspergilose em humanos e animais, mas existem relatos sobre a ocorrência de infecções humanas causadas por esse agente, como o trabalho realizado por Schwetz *et al.* (2007), que relata um caso de peritonite. A doença foi tratada com sucesso com anfotericina B e caspofungina, seguido de itraconazol e remoção do cateter peritoneal. É considerado como seguro (Generally Recognized as Safe) pelo FDA e apresenta algumas propriedades biotecnológicas (revisão em DABA, MOSTAFA e ELKHATEEB, 2021).

Fusarium spp., apesar de conter numerosas espécies fitopatogênicas, podem ser responsáveis por micoses em humanos e animais, incluindo infecções superficiais, como ceratite e onicomicose, bem como infecções localmente invasivas e disseminadas (ABDULLAH *et al.*, 2018). A fusariose é a segunda infecção por fungos mais comum depois da aspergilose, e a ceratite é a infecção de implantação mais encontrada em indivíduos imunocompetentes. O antifúngico natamicina é ativa contra espécies de *Fusarium* tanto *in vitro* quanto *in vivo* e é usada junto com o voriconazol, como base do tratamento da ceratite por *Fusarium*. A onicomicose é tratada com terbinafina, voriconazol e às vezes itraconazol. Embora os mecanismos de resistência antifúngica de *Fusarium* não sejam totalmente compreendidos, alterações de

aminoácidos e/ou superexpressão de CYP51, o gene que codifica a esterol 14 α -desmetilase, pode estar envolvido na resistência à azólicos, como o fluconazol, semelhante à *Aspergillus* spp (MEIS *et al.*, 2016) Pujol e colaboradores demonstraram que, para cepas ambientais, anfotericina B e o cetoconazol, que foram mais ativos. Em relação ao cetoconazol, nossos resultados indicam que esse antifúngico é ativo contra *Fusarium* sp.

Alternaria alternata é um conhecido fitopatógeno causador da doença da mancha negra em kiwi (HUANG *et al.*, 2021). Um trabalho recente realizado por Li e colaboradores (2023) reportam o uso de tetramicina para o tratamento da doença da da podridão mole nos kiwis, causado por *A. alternata*. Tetramicina um antibiótico poliênico com amplo espectro, alta eficiência e baixa toxicidade que exerce forte atividade inibitória contra ascomicetos, basidiomicetos e adelomicetos (SONG *et al.*, 2016). O gênero *Alternaria* contém várias espécies de hifomicetos melanizados que causam infecções oportunistas em humanos. As manifestações clínicas mais frequentes são infecções cutâneas e subcutâneas, seguidas de oculomicose, rinosinusite invasiva e não invasiva e onicomiose (PASTOR e GUARRO, 2006). Esses autores avaliaram a susceptibilidade a antifúngicos de vários isolados de *A. alternata* e mostraram que a anfotericina B apresentou atividade *in vitro* variável. Dentre os azóis, o fluconazol não apresentou atividade contra o fungo, como observado neste trabalho, e o resultado para cetoconazol foi variável. Itraconazol, voriconazol e posaconazol mostraram boa atividade contra o agente, como também observado neste trabalho, em que o itraconazol promoveu um halo de inibição de 15 mm, maior que o observado para outros fungos filamentosos analisados.

Por fim, as duas espécies de *Candida* analisadas apresentaram perfis diferentes de susceptibilidade aos antifúngicos testados, sendo observado uma maior resistência de *C. tropicalis* ao fluconazol e itraconazol, seguido de miconazol e cetoconazol, comparando com *C. albicans*. Já para nistatina, o perfil foi similar. Espécies distintas de *Candida* podem causar doenças em seres humanos, mas a maioria das infecções invasivas é provocada por cinco patógenos: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (RIERA *et al.*, 2022). Embora *C. albicans* seja a espécie principal, a candidemia causada por espécies não-albicans, como *C. tropicalis* tem se tornado motivo de preocupação nas últimas décadas (GUO *et al.*, 2021). O tratamento das doenças causadas por *Candida* spp. geralmente depende da condição da doença. Os medicamentos azólicos são uma das classes mais comuns de medicamentos

utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* em todo o mundo, tanto para infecções mucosas quanto sistêmicas. Esses antifúngicos têm como alvo a via biossintética do ergosterol e, assim, inibem o crescimento de fungos (KABIR e AHMAD, 2013). Devido à crescente resistência aos antifúngicos, a combinação de dois ou mais medicamentos e novas formulações podem ser eficazes no tratamento das infecções causadas por *Candida* spp., como por exemplo: anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B, dispersão coloidal de anfotericina B, anfotericina B em uma formulação de nanoesferas lipídicas, itraconazol e ciclodextrina ou combinação de um ou mais compostos antifúngicos, por exemplo, anfotericina B + flucitosina, fluconazol + flucitosina, anfotericina B + fluconazol, caspofungina + anfotericina B lipossomal e caspofungina + fluconazol (SPAMPINATO e LEONARDI, 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados neste trabalho fornecem uma visão geral da interação entre microrganismos e da importância dos ensaios de antagonismo para selecionar microrganismos com potencial biológico, que podem vir a ser utilizados para promover o biocontrole de patógenos. Dessa forma, o isolado de *B. kochii* utilizado neste trabalho tem um excelente potencial para atuar como agente de biocontrole contra doenças causadas principalmente por fungos fitopatogênicos, proporcionando uma alternativa aos fungicidas. Além disso, o estudo das substâncias produzidas por *B. kochii* será importante para trabalhos futuros que visem a utilização de moléculas alternativas aos antifúngicos comerciais contra patógenos humanos e animais. Essas moléculas poderão ser uma alternativa antifúngica devido à resistência dos fungos aos antifúngicos já utilizados e à citotoxicidade que alguns desses fármacos podem apresentar.

Trabalhos futuros poderão ser realizados utilizando um maior número de microrganismos patogênicos. A verificação, através de microscopia óptica e eletrônica de varredura poderá ser realizada para verificar possíveis alterações nas estruturas miceliais e/ou de reprodução dos fungos, após o co-cultivo com a bactéria. A detecção de possíveis compostos antifúngicos produzidos pela bactéria, através de análises

cromatográficas como GC–MS, auxiliará no maior entendimento da fisiologia deste microrganismo.

REFERÊNCIAS

- AZEEM, S., et al. Characterization and survival of broad-spectrum biocontrol agents against phytopathogenic fungi. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 54, n. 3, p. 233-242, 2022.
- BORUTA, T.; BIZUKOJC, M. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. **World Journal Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 2, p. 34, 2017.
- CAMPOS, T.; COSENTINO, C.; SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. **Revista Ciência & Inovação**. v.5, n.1, 2020.
- CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. Update on Antifungal drug resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resist Update**, v. 8, p. 344–358, 2005.
- CHAVES-LÓPEZ, C. et al. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, 2015.
- CHOI, H. W.; AHSAN, S. M. Biocontrol Activity of *Aspergillus terreus* ANU-301 against Two Distinct Plant Diseases, Tomato *Fusarium* Wilt and Potato Soft Rot. **Plant Pathology Journal**, v. 38, n. 1, p. 33-45, 2022.
- CLSI-M44-A2. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. CLSI document. Wayne, 2018.
- CLSI-M51-A. Method for Antifungal Disk Difusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. **Clinical and Laboratory Standards Institute**; v. 30, 2010.
- DA LUZ, L. A. D., et al. Antagonism of *Bacillus licheniformis* M2–7 against phytopathogen fungi of *Mangifera indica* L. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 38, p. 1-10, 2022.
- DA SILVA, Gabriela Cristina Alves. **Análise do potencial biotecnológico de bactérias isoladas de blendas de diesel**. 2023. 53 f. Dissertação (mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2023. Dados não publicados.
- DABA, G. M.; MOSTAFA, F. A. E.; ELKHATEEB, W. A. The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 52, 2021.

- FENTA, L.; MEKONNEN, H.; KABTIMER, N. The Exploitation of Microbial Antagonists against Postharvest Plant Pathogens. **Microorganisms**, v. 11, p. 1044, 2023.
- GARCIA-RUBIO R. et al. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2993, 2020.
- GHAI, S.; SOOD, S. S.; JAIN, R. K. Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolates collected from soil samples. **Indian Journal Microbiology**, v. 47, p. 77–80, 2007.
- GRESSLER, M. et al. Phytotoxin production in *Aspergillus terreus* is regulated by independent environmental signals. **Elife**, v. 14, 2015.
- GUO, J. et al. Prevalence and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis* Species Complex in Eastern China: A 15-Year Retrospective Study by ECIFIG. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 644000, 2021.
- HACHEM, R. et al. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus*: an emerging opportunistic infection with poor outcome independent of azole therapy. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 3148–3155, 2014.
- Haidar et al. Screening and modes of action of antagonistic bacteria to control the fungal pathogen *Phaeoemoniella chlamydospora* involved in grapevine trunk diseases. **Microbiology Research**, v. 192:172-184, 2016.
- HASHEM, A.; TABASSUM, B.; FATHI, A. A. E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1291–1297, 2019.
- HUANG K. et al. Whole Genome Sequence of *Alternaria alternata*, the Causal Agent of Black Spot of Kiwifruit. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 713462, 2021.
- JIA, Q. et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on Growth of *Alternaria alternata* and Production of Tenuazonic Acid. **Toxins**, v. 15, n. 1, p. 53, 2023.
- KABIR, M. A.; AHMAD, Z. *Candida* infections and their prevention. **ISRN Preventive Medicine**, v. 4, n. 763628, 2013.
- KADOSH, D. Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 4265-4278, 2016.
- KHAN, N., et al. Antifungal Activity of *Bacillus* Species against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
- LI, W. et al. Antifungal activity and mechanism of tetramycin against *Alternaria alternata*, the soft rot causing fungi in kiwifruit. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 192, n. 105409, 2023.
- LI, X. et al. Antifungal effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. **Processes**, v. 8, n. 12, 2020.

LUCON, C. M. M. et al. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges. **Crop Protection Journal**, v. 29, p. 766-772, 2010.

LUU, T.; PHI, Q.; NGUYEN, T. et al. Antagonistic activity of endophytic bacteria isolated from weed plant against stem end rot pathogen of pitaya in Vietnam. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 14, 2022.

MACHIDA, M. et al. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. **Journal DNA Research**, v. 15, p.173-183, 2008.

MEIS, J.F.; CHOWDHARY, A.; RHODES, J.L. et al. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1709, 2016.

MELO, I. S.; FAULL, J. L.; NASCIMENTO, R. S. Antagonism of *Aspergillus terreus* to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 417-419, 2006.

MOLINA, G. et al. Comparative study of the bioconversion process using R-(+)- and S-(-) limonene as substrates for *Fusarium oxysporum* 152B. **Journal Food Chemistry**, p. 606-613, 2015.

NASUTION, A. I. Virulence factor and pathogenicity of *Candida albicans* in oral Candidiasis. **World Journal of Dentistry**, v. 4, p. 267-271, 2013.

NIRMALADEVI, D. et al. Neuroprotective effects of bikaverin on H₂O₂-induced oxidative stress mediated neuronal damage in SH-SY5Y cell line. **Journal Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 973-985, 2014.

PASTOR F. J.; GUARRO, J. *Alternaria* infections: laboratory diagnosis and relevant clinical features. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, n. 8, p. 734-746, 2008.

PETERSON, S. B.; BERTOLLI, S. K.; & MOUGOUS, J. D. The Central Role of Interbacterial Antagonism in Bacterial Life. **Current Biology**, v. 30, n. 19, p.1203-1214, 2020.

REICHERT-LIMA, F.; LYRA, L.; PONTES, L. et al. Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, v. 61, p. 360-365, 2018.

RIERA F. O. et al. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 7, p. 877, 2022.

RISSLEGGGER, B. et al. A prospective international *Aspergillus terreus* survey: an EFISG, ISHAM and ECMM joint study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, p. 7761-7765, 2017.

RORIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 7, p. 225, 2009.

- SAMPATH, P. et al. Characterization and biodecolorization of azo dye using *Bacillus kochii* mh152512 from textile dye effluent from tamil nadu. **EM International**, v. 40, p. 1065-1073, 2021.
- SANTOS, J. E. A. et al. Antagonism of volatile organic compounds of the *Bacillus* sp. against *Fusarium kalimantanense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 60, p. 1-11, 2022.
- SANTOSO, I. et al. Antagonist effect of *Bacillus* spp. against *Aspergillus niger* CP isolated from cocopeat powder. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Sciences**, v. 1, p. 846, 2021.
- SCHWETZ, I.; HORINA, J.; BUZINA, W. et al. *Aspergillus oryzae* peritonitis in CAPD: case report and review of the literature. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 49, n. 5, p. 701-704, 2005.
- SEILER, H. et al. *Bacillus kochii* sp. nov., isolated from foods and a pharmaceuticals manufacturing site. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1092-1097, 2012.
- SHAF, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, 2017.
- SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, P. 288–305, 2012.
- SONG Y. et al. Baseline sensitivity and control efficacy of antibiotics fungicide tetramycin against *Botrytis cinerea*. **European Journal Plant Pathology**, v. 146, p. 337-347, 2016.
- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 204-237, 2013.
- STROHL, W.A., ROUSE, H, FISHER, B.D. Microbiologia Illustrada. Porto Alegre: **Artmed**, p. 531, 2004
- TRIFILIO, S.; ORTIZ, R.; PENNICK, G. et al. Voriconazole therapeutic drug monitoring in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. **Bone Marrow Transplant**, v. 35, p. 509–513, 2005.
- TRUNG, D. Q.; ANH, L. T.; VAN, D. M. et al. Biocontrol of *Alternaria alternata* YZU, a causal of stem end rot disease on pitaya, with soil phosphate solubilizing bacteria. **Hue University Journal of Science: Natural Science**, v. 131, n. 1, p. 39–46, 2022.
- VADIVEL, M. et al. Biofabrication of isotropic silver nanoparticles using cell-free metabolic extract of *Bacillus kochii*, and evaluation of their antimicrobial, antioxidant and catalytic potentials. **Research Square**, v. 1, 2021.

XIA, Y. et al. Antagonistic Activity and Potential Mechanisms of Endophytic *Bacillus subtilis* YL13 in Biocontrol of *Camellia oleifera* Anthracnose. **Forests**, v. 14, n. 5, p. 886, 2023.