

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

*Sporobolomyces koalae* **COMO UM NOVO AGENTE DE  
CONTROLE BIOLÓGICO**

**Deborah Maria de Paula Estevam**

Biomédica

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

*Sporobolomyces koalae* **COMO UM NOVO AGENTE DE  
CONTROLE BIOLÓGICO**

**Deborah Maria de Paula Estevam**

**Orientadora: Profa. Dra. Katia Cristina Kupper**

**Coorientador: Prof. Dr. Maurício Ventura Mazzi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária.

**2019**

E79s

Estevam, Deborah Maria de Paula

Sporobolomyces koalae como um novo agente de controle biológico  
/ Deborah Maria de Paula Estevam. -- Jaboticabal, 2019

47 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Katia Cristina Kupper

Coorientadora: Maurício Ventura Mazzi

1. Microbiologia. 2. Leveduras (Fungos). 3. Mecanismo de ação  
(Bioquímica). 4. Filogenia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**DEBORAH MARIA DE PAULA ESTEVAM** – Nascida em 07 de junho de 1994 em Campinas, SP. Iniciou sua graduação em Biomedicina em fevereiro de 2013 no Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, na cidade de Araras, SP, concluindo seu bacharelado em dezembro de 2016. Durante a graduação, estagiou na Clínica Sayão Araras atuando na área de análises clínicas, estagiou também no laboratório de pesquisa do Professor Maurício V. Mazzi, sob sua orientação, na Uniararas, atuando na área de bioquímica. Em março de 2017 ingressou no curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação da Profa. Dra. Katia Cristina Kupper, como bolsista Capes, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis, SP.

## **Epígrafe**

“Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.

Siga em frente. ”

**Walt Disney**

## **Dedico**

A minha mãe **Edilei** e ao meu pai **Luiz**, pela vida que me deram, pelo companheirismo e cumplicidade, pelo seu exemplo e por sempre me ensinarem a lutar pelos meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, e por me ensinarem a não ter medo de mudanças e sonhar alto, porque vão estar de braços abertos para me receber se tudo der errado e me ajudar a continuar seguindo.

Minha orientadora Katia Cristina Kupper por possibilitar a realização desse trabalho, por todos os ensinamentos e lições que me proporcionou nos últimos anos.

Ao meu co-orientador Maurício Ventura Mazzi, que me acompanha desde a graduação, durante o TCC e estágio, por sempre me dar todo o suporte necessário, e dividir seus conhecimentos comigo e com todos os alunos que passam pelo seu laboratório.

Ao meu namorado Lucas, pelo apoio, amor, conversas, amparo e companheirismo durante todos os momentos. Seus pais Fátima e Ricardo e seu irmão Vinícius, que eu considero minha segunda família, pelo suporte e amor que sempre me dão.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal e ao curso de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária pela oportunidade de ensino.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira e as pessoas que eu conheci lá, meus amigos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico, Vanessa, Lorena, Lilian, Amanda, Bianca, Ariane, Luriany, Flávia, Andréia, Mariana, Natália, Fernanda e Alisson.

Ao Eduardo Goulin, do setor de Biotecnologia, por toda ajuda e conhecimento compartilhado sempre.

Ao Luís Teheran, doutorando do programa, que sempre estava disposto a ajudar pelas dificuldades devidas ao projeto ser realizado longe da faculdade.

A Uniararas, aos professores e técnicos que me ajudaram durante os experimentos, principalmente a Prof<sup>a</sup> Vivian, Paula, Luciana, Carol e Pablo.

A Amanda Canelli e sua mãe Vivian, por me acolherem nesses 2 anos em sua casa em Araras, por todo carinho, companheirismo, amizade, e me fazerem sentir como mais um membro da família.

Ao Leonardo Bagne pela amizade, companheirismo, risadas, saídas para comer, histórias e desabafos nos últimos anos.

As minhas amigas de infância, Jordana Maria dos Reis, Beatriz Andrade, Júlia Bertazzi, Camila Roderó, Livia Boin, Eren Castellano, Vitória Giordano, por todos os anos de amizade, por sempre estarem disponíveis para conversa, risadas e desabafos.

A Lucinéia, por sempre lembrar e cuidar de mim durante praticamente toda a minha vida.

A Prof<sup>a</sup> Adriana Parada do IAC e doutoranda Ana Olívia, por me receberem no seu laboratório e ajuda durante um dos experimentos do estudo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma participaram dessa jornada, meu sincero agradecimento.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. Citricultura .....	4
2.2. Podridão azeda .....	5
2.3. Controle biológico e uso das leveduras.....	6
2.4. <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	8
2.5. Biossegurança.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Microrganismos .....	10
3.2. Identificação molecular da cepa de levedura ACBL-42 .....	10
3.3. Estudo do crescimento de <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42) .....	11
3.3.1. Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	11
3.3.2. Determinação da curva de crescimento de <i>Sporobolomyces</i> <i>koalae</i> (ACBL-42) .....	12
3.4. Atividade antagônica da levedura <i>Sporobolomyces koalae</i> contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	12
3.4.1. Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Sporo-</i> <i>bolomyces koalae</i> contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	12
3.4.2. Competição por nutrientes entre <i>Sporobolomyces koalae</i> e <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	14
3.5. Produção de biofilme por <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	14
3.6. Produção de sideróforos por <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	15
3.7. Estudo do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces ko-</i> <i>alae</i> .....	15
3.7.1. Avaliação do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces ko-</i> <i>alae</i> em membrana cório-alantóide: HET-CAM ( <i>hen's egg test chorional-</i> <i>lantoic membrane</i> ) .....	16
3.7.2. Avaliação do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces ko-</i> <i>alae</i> em membrana cório-alantóide com coloração por azul de <i>trypan</i> : CAM-TBS ( <i>chorionallantoic membrane – trypan blue staining</i> ) .....	16
4. RESULTADOS .....	17
4.1. Identificação da cepa de levedura ACBL-42 .....	17
4.2. Estudo do crescimento de <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42) .....	22

4.2.1. Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	22
4.2.2. Determinação da curva de crescimento de <i>Sporobolomyces koalae</i> (ACBL-42) .....	24
4.3. Atividade antagônica da levedura <i>Sporobolomyces koalae</i> contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	25
4.3.1. Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de <i>Sporobolomyces koalae</i> contra <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	25
4.3.2. Competição por nutrientes entre <i>Sporobolomyces koalae</i> e <i>Geotrichum citri-aurantii</i> .....	28
4.4. Produção de biofilme por <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	30
4.5. Produção de sideróforos por <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	32
4.6. Estudo do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	33
4.6.1. Avaliação do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces koalae</i> em membrana cório-alantóide: HET-CAM ( <i>hen's egg test choriallantoic membrane</i> ) .....	33
4.6.2. Avaliação do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces koalae</i> em membrana cório-alantóide com coloração por azul de <i>trypan</i> : CAM-TBS ( <i>chorionallantoic membrane – trypan blue staining</i> ) .....	34
5. DISCUSSÃO .....	35
6. CONCLUSÕES .....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41

## ***Sporobolomyces koalae* COMO NOVO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO**

**RESUMO** - Dentre as doenças de pós-colheita que ocorrem em citros, encontra-se a podridão azeda, causada por *Geotrichum citri-aurantii*, que afeta frutos de todas as espécies e cultivares em países produtores da cultura. Para as condições de Brasil, não existem fungicidas registrados para o controle desse patógeno. Na busca de uma alternativa de manejo, esse trabalho visa dar continuidade aos estudos da levedura *Sporobolomyces koalae*, que em pesquisas anteriores mostrou potencial para o controle da doença, tendo como objetivos específicos: (i) a análise filogenética para confirmação da espécie do isolado ACBL-42 (*Sporobolomyces koalae*); (ii) verificar o efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células da levedura; (iii) determinar a curva de crescimento de *S. koalae*; (iv) verificar o efeito de fontes nutricionais no cultivo da levedura para a atividade antagonista; (v) verificar mecanismos de ação da levedura que possam estar envolvidos no controle de *G. citri-aurantii*, e, finalmente, (vi) dar início a estudos de biossegurança do antagonista, visando a produção futura de um bioproduto. A partir dos resultados apresentados neste estudo, foi possível concluir que a região ITS foi suficiente para confirmar a espécie, porém a utilização das duas regiões (ITS e D1/D2) para a construção de uma árvore *multilocus* aumentou a precisão quanto a distinção entre os isolados da mesma espécie; o melhor meio de cultura para o crescimento de *S. koalae* foi o Sabouraud, que quando suplementado com sacarose 1% ou sulfato de cobre 0,05mM foi capaz de favorecer a produção de biofilme e viabilizar a atividade antagonista da levedura contra o *G. citri-aurantii*; a produção de sideróforos não é um mecanismo de ação da levedura e, finalmente, que a levedura *S. koalae* não apresenta efeitos pró-inflamatórios em testes de membrana cório-alantóide de ovos embrionados, necessitando, porém, de mais estudos para garantir a sua segurança, quando na confecção de um bioproduto.

**Palavras-chave:** curva de crescimento, antagonismo, podridão azeda, *Geotrichum citri-aurantii*.

## ***Sporobolomyces koalae* AS A NEW BIOLOGICAL CONTROL AGENT**

**ABSTRACT** - Among the post-harvest diseases that occur in citrus, there is the sour rot, caused by *Geotrichum citri-aurantii*, which affects fruits of all species in crop-producing countries. There are no fungicides registered for control in Brazil. This work aims to continue the studies of the yeast *Sporobolomyces koalae*, which in previous studies showed potential to control the disease, having as specific objectives: (i) phylogenetic analysis for confirmation of species for ACBL-42 (*Sporobolomyces koalae*); (ii) verify the effect of different culture media on production of yeast cells; (iii) determine growth curve of *S. koalae*; (iv) verify the effect of nutritional sources in the culture media for the antagonistic activity; (v) verify mechanisms of action that may be involved in the control of *G. citri-aurantii*, (vi) to initiate the biosafety studies of the antagonist, aiming a future production of a bio-product. From the results presented in this study, it was possible to conclude that the ITS region was sufficient to confirm species, but the use of two regions (ITS and D1/D2) for the construction of a multilocus tree increased the precision regarding the distinction among isolates of the same species; the best culture medium for *S. koalae* was Sabouraud, which when supplemented with 1% sucrose or 0.05mM copper sulfate, was able to favor biofilm production and antagonism; there is no production of siderophores and, finally, *S. koalae* does not present proinflammatory effects in tests of chorioallantoic membrane of embryonated eggs, but more studies are necessary to guarantee a safe bio-product.

**Key words:** growth curve, antagonism, sour rot, *Geotrichum citri-aurantii*.

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1.</b> Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito de diferentes meios de cultivo em diferentes tempos de incubação de <i>Sporobolomyces koalae</i> em relação a contagem de UFC/mL .....	22
<b>Tabela 2.</b> Variação do efeito de diferentes meios de cultivo em relação a contagem de UFC/mL. ....	23
<b>Tabela 3.</b> Análise da variação de UFC/mL de <i>Sporobolomyces koalae</i> , em meio Sabouraud, nos diferentes períodos de incubação. ....	23
<b>Tabela 4.</b> Competição por nutrientes entre <i>Sporobolomyces koalae</i> ACBL-42 e <i>Geotrichum citri-aurantii</i> ... ..	29
<b>Tabela 5.</b> Efeito do meio de cultura na produção de biofilme por <i>Sporobolomyces koalae</i> , avaliado através dos valores de absorvância (540 nm) .....	30
<b>Tabela 6.</b> Resultados da classificação final obtida com as médias dos testes HET-CAM e CAM-TBS das células de <i>Sporobolomyces koalae</i> .... ..	34

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Metodologia para avaliação do potencial irritante das células de <i>Sporobolomyces koalae</i> em membrana cório-alantóide com coloração por azul de trypan: CAM-TBS ( <i>chorionallantoic membrane – trypan blue staining</i> ).....	17
<b>Figura 2.</b> Eletroforese em gel de agarose 1% utilizando uma única amostra de produto de PCR realizada em triplicata para cada par de primer, sendo (A) primer ITS e (B) primer D1/D2. Padrão de peso molecular de 1 kb (Prolab). A seta indica o peso aproximado da fração, sendo aproximadamente 1200pb..	18
<b>Figura 3.</b> Árvore filogenética extraída da análise <i>neighbour-joining</i> das sequências do domínio 5.8S rDNA ITS, mostrando as relações de cepas de <i>Sporobolomyces koalae</i> com espécies intimamente relacionadas. O grupo externo foi <i>Bensingtonia yamatoana</i> CBS 7243..	19
<b>Figura 4.</b> Árvore filogenética extraída da análise <i>neighbour-joining</i> das sequências do domínio 26S rDNA D1/D2, mostrando as relações de cepas de <i>Sporobolomyces koalae</i> com espécies intimamente relacionadas. O grupo externo foi <i>Bensingtonia yamatoana</i> CBS 7243. ....	20
<b>Figura 5.</b> Árvore filogenética <i>multilocus</i> extraída da análise <i>neighbour-joining</i> das sequências do domínio 8.6S e 26S rDNA ITS e D1/D2 consecutivamente, mostrando as relações de cepas de <i>Sporobolomyces koalae</i> com espécies intimamente relacionadas. O grupo externo foi <i>Bensingtonia yamatoana</i> CBS 7243. ....	21
<b>Figura 6.</b> Efeito do meio de cultivo e do período de incubação na produção de células de <i>Sporobolomyces koalae</i> .....	24

<b>Figura 7:</b> Curva de crescimento para a produção de células de <i>Sporobolomyces koalae</i> ACBL-42 cultivada em meio Sabouraud em diferentes períodos de incubação. ....	25
<b>Figura 8:</b> Efeito de fontes de nitrogênio no meio de cultivo de <i>Sporobolomyces koalae</i> na atividade antagônica de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ). ....	26
<b>Figura 9.</b> Efeito de fontes de carbono no meio de cultivo de <i>Sporobolomyces koalae</i> na atividade antagônica de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ).. ....	27
<b>Figura 10:</b> Efeito de fontes de micronutrientes no meio de cultivo de <i>Sporobolomyces koalae</i> na atividade antagônica de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ )... ..	27
<b>Figura 11:</b> Efeito da combinação das melhores fontes escolhidas em meio de cultivo de <i>Sporobolomyces koalae</i> na atividade antagônica de <i>Geotrichum citri-aurantii</i> . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ) .....	28
<b>Figura 12:</b> Efeito do meio de cultura e tempo de incubação na produção de biofilme por <i>Sporobolomyces koalae</i> com inóculo inicial de $1 \times 10^5$ células/mL, avaliado através dos valores de absorbância (540 nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade .....	31
<b>Figura 13:</b> Efeito do meio de cultura e tempo de incubação na produção de biofilme por <i>Sporobolomyces koalae</i> com inóculo inicial de $1 \times 10^7$ células/mL, avaliado através dos valores de absorbância (540 nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade .....	31
<b>Figura 14:</b> Avaliação qualitativa colorimétrica de produção de sideróforos por <i>Sporobolomyces koalae</i> . ....	32

**Figura 15:** Demonstração da avaliação macroscópica do potencial pró-inflamatório das células de *Sporobolomyces koalae* pelo teste HET-CAM na membrana cório-alantóide em ovos de galinha SPF embrionados. Visualização das reações fisiológicas nos vasos sanguíneos da membrana..... 31

## 1. INTRODUÇÃO

A citricultura é um dos principais pilares da economia brasileira, com uma das maiores parcelas de exportação, principalmente, de sucos processados.

Apesar de toda magnitude da citricultura, o setor citrícola, especialmente nas áreas dos estados de São Paulo e Minas Gerais, responsáveis pela maior parte da produção de citros, apresentou uma queda de 30% na produção de laranjas na safra de 2018/19, quando comparada à safra anterior (2017/18), devido aos problemas climáticos, de pragas e doenças, gerando um prejuízo de 320 milhões de reais, de acordo com o levantamento do Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus, 2018).

A cultura dos citros sofre com as doenças que ocorrem, principalmente, na fase de pós-colheita, as quais são iniciadas no campo e se desenvolvem durante o beneficiamento dos frutos em *packing houses*.

Dentre as doenças de pós-colheita encontra-se a podridão azeda, também chamada de podridão ácida, causada pelo fungo *Geotrichum citri-aurantii*. Os maiores problemas ocorrem nos períodos chuvosos, onde a doença pode afetar todas as espécies e cultivares em todos os países produtores de citros (Talibi et al., 2013). Fungicidas comumente usados no Brasil, durante o beneficiamento dos frutos cítricos, como o imazalil, tiabendazol, pirimetanil ou o fludioxonil, não controlam o agente etiológico da podridão azeda (Zhou et al., 2014). Em países da África do Sul e da Europa, os fungicidas guazatina e propiconazol são utilizados para o controle do patógeno, porém, tais produtos não apresentam registros no Brasil (Klein e Kupper, 2018).

Diante do exposto, uma das alternativas é o uso do controle biológico para o manejo de doenças na pré e pós-colheita, em substituição total, ou parcial, dos fungicidas comumente usados para o controle de doenças. Por serem considerados mais seguros à saúde humana e ao ambiente, o uso de agentes antagonistas poderia atender à demanda da sociedade por uma diminuição do uso de agrotóxicos. Dentre esses, as leveduras têm apresentado destaque, especialmente, para controle de patógenos que ocorrem na pós-colheita de citros (Ferraz et al., 2016; Kupper et al., 2013).

As leveduras, de um modo geral, utilizam como mecanismos de ação contra fitopatógenos, a competição por espaço e nutrientes (Bleve et al., 2006); a predação (Pimenta et al., 2008); a indução de resistência (Klein e Kupper, 2018); a produção de sideróforos (Botha, 2011), de biofilmes (LaFleur et al., 2006) e de toxinas e/ou enzimas hidrolíticas (Ferraz et al., 2016). No entanto, é necessário entender os mecanismos de ação que estão envolvidos nas interações com os patógenos, as plantas e o ambiente, além de se saber o impacto ambiental desses agentes de biocontrole. Tais estudos são importantes para o conhecimento quanto à forma, à quantidade adequada e à época de aplicação desses antagonistas (Bettioli e Morandi, 2009).

O estudo da taxonomia de leveduras utilizando apenas testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos, muitas vezes, não é suficiente para identificação à nível de espécie, por isso testes moleculares são uma importante ferramenta na análise filogenética. Filogenia é a história genealógica de um grupo de organismos e uma representação hipotética das relações ancestral/descendente. Um dos maiores objetivos das ciências biológicas é a determinação da história de vida dos descendentes e um cladograma pode ser utilizado como base para um sistema de classificação, assim como para traçar a biogeografia histórica de um grupo (Pederneiras, 2011).

O sequenciamento e comparação da região espaçadora interna transcrita (ITS) são amplamente utilizados em estudos filogenéticos de espécies, visto que o polimorfismo dessa região permitir a diferenciação de indivíduos de grupos taxonômicos próximos. Entretanto, em muitos casos, a comparação da região ITS não é suficiente para diferenciar indivíduos próximos, com isso, outras regiões genômicas podem ser incluídas na análise, dentre essas, a região D1/D2 do 26S rDNA é sequenciada em leveduras, e observou-se que essa região também é capaz de diferenciar isolados a nível de espécie (Landell et al., 2006).

A espécie *Sporobolomyces koalae* foi descrita por Satoh e Makimura (2008), como sendo obtida da secreção nasal de coalas (*Phascolarctos cinereus*) em um zoológico no Japão. No Brasil, o isolado ACBL-42 foi obtido por Ferraz et al. (2016), que demonstrou que a cepa apresentou potencial para o biocontrole de *G. citri-aurantii*, sendo dois dos mecanismos de ação explorados a produção de toxina *killer* e por afetar a germinação do fitopatógeno.

Considerando o potencial dessa levedura para o biocontrole, os próximos passos devem ser direcionados para a confecção de um bioproduto, visando a aplicabilidade durante o beneficiamento dos frutos cítricos. No entanto, cuidados devem ser tomados com relação à biossegurança da aplicação e manuseio desse microrganismo e seus derivados.

O potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é avaliado desde a década de 1940 por meio de experimentos com animais de laboratório (Oliveira et al., 2012). Na busca de alternativas para substituir o uso de animais, a membrana cório-alantóide (CAM) de ovos embrionados de galinha está se tornando um modelo de estudo por fornecer informações sobre os efeitos que podem ocorrer na conjuntiva do olho humano após exposição a uma substância teste, como substituto do teste de Draize realizado em coelhos (Vinardell e Mitjans, 2006; Steiling et al., 1999). Os testes HET-CAM (*hen's egg test chorionallantoic membrane*) e CAM-TBS (*chorionallantoic membrane – trypan blue staining*) vêm sendo utilizados como metodologias qualitativa e quantitativa para avaliação do potencial irritante de substâncias, por serem acessíveis, possuírem baixo custo e serem métodos alternativos em substituição aos testes feitos por via ocular em modelos animais, e preliminares de segurança (Freire, 2017).

Portanto, considerando o potencial de biocontrole de *S. koalae* e o pouco conhecimento que se tem sobre essa espécie de levedura através da literatura, este trabalho teve por objetivos: (i) a análise filogenética para confirmação da espécie do isolado ACBL-42 (*Sporobolomyces koalae*); (ii) verificar o efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células da levedura; (iii) determinar a curva de crescimento de *S. koalae*; (iv) verificar o efeito de fontes nutricionais no cultivo da levedura para a atividade antagônica; (v) verificar mecanismos de ação da levedura que possam estar envolvidos no controle de *G. citri-aurantii*, e, finalmente, (vi) dar início aos estudos de biossegurança do antagonista, visando a produção futura de um bioproduto.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Citricultura

A citricultura brasileira tem grande importância econômica e social. O país é responsável por 34% da produção de laranja e 56% do suco produzido no mundo (Neves e Trombin, 2017), com 704.238 hectares plantados e produção de 18.666.928 toneladas, segundo dados do IBGE (2018), o que o torna o principal fornecedor global, além de gerar um PIB de US\$ 6,5 bilhões de dólares em todas as ramificações de sua cadeia produtiva e cerca de 200 mil empregos diretos e indiretos.

Há muito tempo a agricultura praticada no Brasil tem uma forte dependência da utilização de agrotóxicos, os quais têm a finalidade de controlar pragas e doenças, garantindo patamares mais elevados de produtividade e, assim, maior retorno econômico. No entanto, organismos não-alvos são altamente afetados pela toxicidade desses fungicidas e pesticidas, afetando também o equilíbrio do ecossistema (Scorza-Junior et al, 2010).

Por ser tão representativa a cultura dos citros necessita de cuidados fitossanitários precisos e investimentos em alta tecnologia para o manejo do cultivo (Almeida, 2016). Na classe dos agroquímicos, é destacado o uso de acaricidas, seguido pelos inseticidas foliares e por fungicidas de aplicação foliar. Essas três classes representam 55% dos gastos com agroquímicos no setor.

O setor também sofre grandes perdas causadas particularmente por fungos patogênicos, que podem afetar até 50% de sua produção. Com relação às doenças de pós-colheita, alguns autores relatam que as perdas na produção dos frutos podem variar de 3 a 6%, em uma única safra (Agrios, 2005; Fischer et al., 2008).

Pós-colheita é o período que transcorre a partir do momento que em que os produtos são colhidos no campo, até o seu consumo em estado fresco, preparado ou, transformado industrialmente. Dentre as doenças de pós-colheita em frutos cítricos, destacam-se os bolores azul e verde, causados por *Penicillium italicum* e *P. digitatum*, respectivamente, bem como a podridão azeda, ocasionada por *Geotrichum citri-aurantii*. (Ferraz et al., 2016).

Devido aos problemas causados ao meio ambiente pela utilização de produtos químicos, a busca por tecnologias tem impulsionado o desenvolvimento de métodos

alternativos de controle de doenças de plantas, considerados ambientalmente mais seguros. Diversas pesquisas vêm avaliando produtos alternativos que reduzem os problemas fitossanitários (Broetto et.al., 2014).

## 2.2. Podridão azeda

A podridão azeda ou podridão ácida, causada pelo fungo leveduriforme *Geotrichum citri-aurantii* está difundida em todos os países produtores de citros no mundo, afetando todas as variedades, mas, principalmente tangerinas. Frutos lesionados e sobremaduros são os mais afetados, sendo que as variedades de tangerina, geralmente, desenvolvem a doença mais rapidamente do que as outras variedades de laranjas ou *grapefruits*, devido a maior fragilidade da casca. A doença é potencializada por longos períodos chuvosos ou, longo período de armazenamento (Talibi et al., 2011).

O fungo possui duas denominações, quando se encontra no seu estado teleomórfico ou sexual, recebe a denominação de *Galactomyces citri-aurantii* E. E. Butler e, para o estado anamórfico ou assexual, de *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraris) Butler (Brown e Eckert, 2000). A fase assexual é a mais comum e facilmente detectada. Ela é caracterizada por possuir micélio hialino, hifas septadas, colônias em meio de cultura branco-acinzentadas e membranosas, contendo cadeias de artrósporos e de conídios (Oliveira et al., 2016).

O fungo é um saprófita que habita o solo, chegando seus conídios à superfície dos frutos por meio de respingos de água, provocados pela chuva, vento e/ou irrigação, normalmente, são carregados em partículas de poeira (Hershenhorn et al., 1992).

A infecção no fruto pode ocorrer antes ou após a colheita, permanecendo latente e manifestar a doença quando o fruto amadurece ou, pelo aumento da umidade devido a chuvas. Os sintomas da doença nos frutos se iniciam com lesões umedecidas, brilhantes e de coloração marrom-clara. Em seguida, enzimas extracelulares produzidas pelo fungo degradam a casca e as vesículas de sumo, formando, no local, uma massa aquosa, cujo suco se espalha (Oliveira et al., 2016). Em decorrência, ocorre uma podridão com forte odor pútrido, que atrai dípteros, como

a mosca-do-vinagre (*Drosophila* sp.), que deposita seus ovos nos tecidos decompostos dos frutos afetados, que, em pouco tempo, estão repletos de larvas e de mosquitos (Tuset, 2000).

O fungo dissemina-se por contato direto entre frutos sadios e os afetados pela doença ou, indiretamente, por meio do contato com sacolas de colheita, caixas e containers contaminados (Oliveira et al., 2016).

O uso dos fungicidas comumente utilizados para o controle das outras podridões (bolor azul e bolor verde), imazalil e tiabendazol, não possuem ação contra o patógeno da podridão azeda. Existem dois produtos que possuem ação contra o fungo, o ortofenilfenato de sódio (OPP), que controla parcialmente a doença (Liu et al., 2009; Feng et al., 2011), porém, é considerado um composto cancerígeno (Kitagawa e Kawada, 1984) e, o Guazatine que é usado para o controle da podridão azeda em países da Europa, África e Austrália (Ismail e Zhang, 2004; McKay et al., 2012; Kellerman et al., 2018). No Brasil, não existem produtos registrados para controle da doença (Ferraz et al., 2016).

### **2.3. Controle Biológico e uso de leveduras**

Microrganismos desempenham papéis centrais nas atividades humanas e em toda vida na Terra. Constituem a maior massa de matéria viva na Terra, realizam processos químicos necessários a outros organismos, como os produtos de excreção das suas atividades metabólicas, e correspondem a reservatórios chave dos nutrientes essenciais à vida (Madigan, et al., 2016).

Doenças em frutas e vegetais causadas por fungos são muito comuns e causam prejuízos significativos para o agronegócio. Esses processos patológicos e de deterioração, frequentemente, estão relacionados a fatores de virulência microbianos, que podem incluir substâncias químicas conhecidas como micotoxinas. Em um ecossistema os organismos estão constantemente interagindo entre si, sendo que as relações de dependência entre si podem ser harmônicas e desarmônicas. Nas relações harmônicas não existe prejuízo para nenhuma das espécies envolvidas e, pelo menos uma delas, é beneficiada; já nas desarmônicas, ocorre prejuízo de uma das espécies e benefício da outra (Tortora et al., 2012). Essas relações podem ser

exploradas no agronegócio por meio da utilização de microrganismos para controle de doenças.

O controle biológico de doenças de plantas iniciou-se como ciência em 1926. Os componentes do controle biológico são o patógeno, o hospedeiro e os antagonistas, sob a influência do ambiente, todos interagindo num sistema biológico. Ele pode ser definido como “a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais organismos” (Michereff et al., 2005).

Os agentes de controle biológico têm surgido como alternativa mais efetiva do que os diversos fungicidas agrícolas existentes no mercado para o controle de fitopatógenos em pré- e/ou pós-colheita. Por serem considerados mais seguros à saúde humana e ao ambiente, esses agentes atendem à crescente demanda da sociedade para a diminuição do uso de agrotóxicos (Zucchi e Melo, 2009). Dentre esses, as leveduras têm apresentado destaque, especialmente, para controle de doenças de pós-colheita em diversas culturas (Jijakli e Lepoivre, 1998; Masih et al., 2001; Kupper et al., 2013; Ferraz et al., 2016).

As leveduras são fungos unicelulares amplamente distribuídas na natureza, pois são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, podendo utilizar oxigênio ou um composto orgânico como aceptor final dos elétrons, o que possibilita sua sobrevivência em ambientes diversos. Alguns mecanismos de ação utilizados pelas leveduras contra fitopatógenos são: competição por espaço e nutriente (Bleve et al., 2006), predação (Pimenta et al., 2008), indução de resistência nos frutos (Klein e Kupper, 2018), produção de sideróforos (Botha, 2011), produção de biofilme (LaFleur et al., 2006), produção de toxinas e/ou enzimas hidrolíticas (Ferraz et al., 2016). É necessário o melhor entendimento desses mecanismos envolvidos nas interações entre os agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o ambiente, além de estudos do impacto ambiental dos agentes, pois esse conhecimento colabora na determinação da época, forma e quantidade adequadas para aplicação dos antagonistas (Bettioli e Morandi, 2009).

Já existem produtos à base de levedura comercializados para controle biológico, como Shemer® (*Metschnikowia fructicola*) em Israel (Droby et al., 2009), Candifruit™ (*Candida sake*) na Espanha (Usall et al., 2009), Nexy (*Candida oleophila*)

na Bélgica (EFSA, 2012), e Boni-Protect® e o Blossom Protect®, contendo cepas de *Aureobasidium pullulans*, na Alemanha (Wagner et al., 2013).

#### **2.4. *Sporobolomyces koalae***

Espécies do gênero *Sporobolomyces* estão disseminados no meio-ambiente, presentes na filosfera, no ar e também em ambientes sub-aquáticos. São leveduras basidiomiceto anamórfo, terminologia utilizada para fungos que perderam a capacidade de se reproduzir sexuadamente (TORTORA et al., 2012). O gênero consiste em 49 espécies registradas no Mycobank até o momento.

A espécie *S. koalae* foi descrita por Satoh e Makimura (2008), como sendo isolada da secreção nasal de coalas (*Phascolarctos cinereus*) em um zoológico no Japão. Foram definidas características morfológicas como sendo uma célula ovóide, elíptica a alongada, 2,5–5,0x5,0–15,0  $\mu\text{m}$ , apresentando células isoladas, em pares ou em grupos de quatro. Sua colônia tem aspecto viscoso, coloração rosa a laranja-avermelhado e a temperatura ideal de crescimento é 28-30°C.

A literatura atual sobre essa levedura é escassa. No Brasil, o isolado ACBL-42 foi obtido por Ferraz et al. (2016), o qual apresentou potencial como agente de biocontrole contra *Geotrichum citri-aurantii*. Os autores apresentaram, ainda, os possíveis mecanismos de ação utilizados pela levedura, sendo um deles a produção de toxina *killer* e por afetar a germinação do fitopatógeno. Esse isolado não produziu substâncias antifúngicas ou enzimas hidrolíticas contra o fungo.

Em outro estudo realizado por Machado (2018), o isolado ACBL-42 combinado com meia-dose do fungicida guazatine (1%) proporcionou 100% de controle da podridão azeda em frutos de laranja Pêra tratados, preventivamente e, inoculados artificialmente com *G. citri-aurantii*.

#### **2.5. Biossegurança**

O potencial irritante de diversos produtos e substâncias químicas como agrotóxicos, cosméticos e medicamentos de uso tópico, é avaliado desde a década de 1940 por meio de experimentos com modelos animais em laboratório (Oliveira et al., 2012).

O desenvolvimento de modelos experimentais torna-se importante na medida em que estes auxiliam na compreensão dos fenômenos naturais. No contexto atual, a utilização de modelos experimentais tem sido muito importante não somente para o aperfeiçoamento e comprovação de técnicas e procedimentos já existentes, como também, para o desenvolvimento de outros. A experimentação animal, assim como os estudos clínicos em humanos, têm permitido a compreensão dos diversos processos fisiológicos e patológicos que os acometem (Ferreira, 2005).

Porém, com a busca global por substituir os testes *in vivo*, cientistas de diversas áreas passaram a desenvolver e apresentar resultados de métodos alternativos *in vitro* para demonstrar a segurança e a eficácia de seus produtos, oferecendo menor custo e maior facilidade de difusão e incorporação de tais metodologias por outros laboratórios (Coelho, 2003; Oliveira, 2012).

A membrana cório-alantóide (CAM) de ovos embrionados de galinha está se tornando um modelo de estudo por fornecer informações sobre os efeitos que podem ocorrer na conjuntiva do olho humano após exposição a uma substância teste, como substituto do teste de Draize realizado em coelhos (Vinardell e Mitjans, 2006; STEILING et al., 1999). Os testes HET-CAM (*hen's egg test chorionallantoic membrane*) e CAM-TBS (*chorionallantoic membrane – trypan blue staining*) vêm sendo utilizados como metodologias qualitativa e quantitativa para avaliação do potencial irritante de substâncias, por serem acessíveis, possuírem baixo custo e serem métodos alternativos em substituição aos testes feitos por via ocular em modelos animais, e preliminares de segurança (Freire, 2017).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismos

Foram utilizados no presente estudo a levedura *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42) e o fitopatógeno *Geotrichum citri-aurantii*, ambos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro Avançado de Pesquisa de Citros “Sylvio Moreira”/IAC, Cordeirópolis/SP, Brasil.

#### 3.2. Identificação molecular da cepa de levedura ACBL-42

A cepa ACBL-42 foi isolada por Ferraz et al. (2016) da folha de Tangor Murcott no município de Colina-SP. Utilizou-se o protocolo do método CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) para extração de DNA do isolado, segundo a metodologia descrita pelo mesmo autor.

A amplificação da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do rDNA, incluindo o gene 5.8S, foi realizada através de reação de PCR, utilizando-se os seguintes iniciadores: *forward* - ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e *reverse* - ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), conforme protocolo de White et al., 1994. A amplificação da região D1/D2 do rDNA, incluindo o gene 26S, foi realizada utilizando os seguintes iniciadores: *forward* - 28SF1 (5'-AAGCATATCAATAAGCGGAGG-3') e *reverse* - 635 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') conforme protocolo de Sugita et al., 2003.

Para a amplificação das regiões gênicas foi utilizada a enzima GoTaq® DNA Polimerase (Promega), e a reação utilizando o termociclador com os parâmetros: 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 40 segundos, e extensão a 72 °C por 45 segundos, seguido de 1 ciclo final de extensão 72 °C por 1 minuto. A confirmação da amplificação dos fragmentos esperados foi feita em eletroforese com gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TBE 1x. O produto da amplificação foi purificado utilizando o kit comercial “PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit” (Invitrogen™) (Ferraz et al., 2016).

A reação de sequenciamento das amostras foi realizada no Centro de Recursos

Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, câmpus de Jaboticabal/São Paulo.

As sequências consenso foram geradas utilizando-se o programa BioEdit (Hall, 2011), o alinhamento manual foi ajustado usando o programa MEGA v.7 e o mesmo foi usado para gerar as árvores filogenéticas com análise *neighbour-joining* para conjuntos de dados combinados de sequências. As análises foram executadas a partir de árvores aleatórias por 1.000 gerações e amostradas a cada 100 gerações, e os resultados comparados com os de Satoh e Makimura (2008). Foi também gerada uma árvore *multilocus* com os dados das duas regiões utilizadas.

### **3.3. Estudo do crescimento de *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42)**

#### **3.3.1. Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de *Sporobolomyces koalae***

Uma alçada do isolado da levedura, retirada de colônia ativa cultivada em meio Ágar Sabouraud por 72 horas, foi transferida para frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Sabouraud líquido. A cultura foi incubada a 25 °C, a 150 rpm, no escuro, durante 24h. Um mililitro do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyer contendo 99 mL dos diferentes meios de cultivo: BD (infusão de 200 g de batata; 20% dextrose, dissolvidos em água destilada), YEPD (1% extrato de levedura; 2% peptona; 2% glicose, dissolvidos em água destilada), YM (0,3 % de extrato de malte, 0,3 % de extrato de levedura, 0,5% de peptona, 1 % de glicose, dissolvidos em água destilada), Caldo Sabouraud-Dextrose® e Caldo TSB® (Soja Trypticaseína).

As culturas foram incubadas a 25 °C, sob agitação a 150 rpm, no escuro e, em diferentes tempos (0; 7; 25; 32; 48; 120 e 192 horas). De acordo com os tratamentos, alíquotas de 1 mL da cultura foram submetidas às diluições seriadas até 10<sup>-7</sup>. Em seguida, 100 µl de cada diluição foram transferidos para placas de Petri, contendo os respectivos meios de cultura, adicionando-se 20 g/L de ágar (metodologia adaptada de Guetsky et al., 2001).

A avaliação se deu pela contagem das unidades formadoras de colônias, após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi expressa em log<sub>10</sub> UFC/mL. Foi utilizado um delineamento fatorial, sendo cada tratamento

composto por 6 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.3.2. Determinação da curva de crescimento de *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42)**

Este ensaio teve por finalidade determinar a curva de crescimento da levedura *S. koalae* (ACBL-42), utilizando o melhor meio de cultura, de acordo com os resultados do ensaio anterior.

Inicialmente, uma alçada da levedura, proveniente de uma cultura ativa (72 horas) foi transferida para um frasco de Erlenmeyer contendo 100 mL de meio Sabouraud líquido e incubado a 25 °C, a 150 rpm, no escuro durante 24h. Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo ( $1 \times 10^5$  células/mL) foi transferido para frasco contendo 99 mL de meio Sabouraud líquido e a cultura incubada nas mesmas condições. Para a avaliação da curva de crescimento da levedura, alíquotas de 1 mL da cultura foram coletadas em diferentes tempos (6; 12; 24; 36; 48; 60; 72; 84; 96; 120; 144; 168; 216; 240 e 264h), submetidas às diluições decimais e, 100 µL de cada diluição foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud. A contagem de unidades formadoras de colônias foi realizada após 48 horas do plaqueamento. A densidade populacional da levedura foi expressa em  $\log_{10}$  UFC/mL.

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, sendo cada placa de Petri considerada uma repetição.

### **3.4. Atividade antagônica da levedura *Sporobolomyces koalae* contra *Geotrichum citri-aurantii***

#### **3.4.1. Efeito de fontes de nutrientes na atividade antagônica de *Sporobolomyces koalae* contra *Geotrichum citri-aurantii***

Este ensaio teve por objetivo verificar o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, carbono e elementos traço em meio Sabouraud para cultivo da levedura, quanto à inibição do crescimento micelial de *G. citri-aurantii*.

Foram utilizadas como fontes de nitrogênio: ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), triptona e nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) nas

concentrações de 0,02; 0,1 e 0,5% (w/v). Como fontes de carbono: sacarose, maltose, frutose e galactose nas concentrações de 0,5 e 1,0% (w/v) e, como micronutrientes foram testados: boro (ácido bórico - $H_3BO_4$ ), cobre (sulfato de cobre -  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ), manganês (sulfato de manganês -  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ), cobalto (cloreto de cobalto -  $CoCl_2 \cdot 12H_2O$ ), ferro (cloreto de ferro -  $FeCl_3$ ), zinco (sulfato de zinco -  $ZnSO_4$ ) e molibdato (molibdato de amônio- ( $NH_4$ ) $_6$ Mo $_7$ O $_{24} \cdot 4H_2O$ ), com concentrações finais de 0,05; 0,2 e 1 mM, respectivamente (metodologia adaptada de Wiyono et al., 2008).

Frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido Sabouraud estéril adicionada fonte de nitrogênio, carbono e de micronutrientes, acrescido de uma alíquota de 1 mL de uma suspensão de levedura ( $1 \times 10^7$  células/mL) foram submetidos à agitação constante, a 25 °C, em incubadora tipo shaker, por 72 horas. Em seguida, os caldos cultivados foram filtrados em papel de filtro Whatman® n.1 estéril e, posteriormente, amostras de 10 mL de cada filtrado foram transferidas para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL, contendo 90 mL de Sabouraud fundente.

Os meios, correspondentes a cada tratamento, foram vertidos em placas de Petri e, após a solidificação, um disco de meio de cultivo (0,7 cm de diâmetro), contendo o fitopatógeno com 8 dias de crescimento, foi transferido para o centro das placas. Os controles foram constituídos de placas de Ágar Sabouraud contendo apenas o fitopatógeno. As culturas foram incubadas em estufa a 25 °C, no escuro, durante 9 dias e a avaliação foi efetuada por meio da análise do diâmetro médio da colônia do patógeno, em dois sentidos perpendiculares.

Os melhores resultados de antagonismo com as diferentes fontes nutricionais foram, também, comparados com o meio constituído pela combinação das fontes, com o meio Sabouraud padrão e com o tratamento testemunha (*G. citri aurantii* cultivado em Sabouraud padrão, ausente da levedura).

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 5 repetições.

### **3.4.2. Competição por nutrientes entre *Sporobolomyces koalae* e *Geotrichum citri-aurantii***

Para o estudo da competição por nutrientes entre a levedura e o fitopatógeno foram utilizadas diferentes fontes de nitrogênio (ureia, sulfato de amônio e nitrato de potássio a 0,02 e 0,1%) e de carbono (sacarose, galactose e dextrose a 0,5 e 1,0%).

Para tal, uma alíquota de 10 µL da suspensão da levedura contendo  $1 \times 10^7$  células/mL, juntamente com 10 µL da suspensão de esporos do patógeno, contendo  $1 \times 10^5$  conídios/mL foram depositados em áreas demarcadas de lâminas, previamente preparadas, com meio ágar-água, com a adição das diferentes fontes de nutrientes. Os controles foram constituídos do patógeno com diferentes fontes de nutrientes; patógeno com ou sem levedura (sem nutriente). As culturas foram incubadas em estufa incubadora para BOD, em fotoperíodo 12/12h, a 25 °C, por 16 horas, conforme metodologia de Kupper et al. (2013).

A avaliação foi realizada através da contagem de esporos germinados e não germinados, em um total de 100 conídios ao acaso, efetuando-se o cálculo da porcentagem de germinação. Foi considerado germinado o conídio cujo tamanho do tubo germinativo era maior ou igual à largura do conídio. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, sendo cada tratamento composto por 8 repetições.

### **3.5. Produção de biofilme por *Sporobolomyces koalae***

A quantificação de biofilme produzido pela levedura *S. koalae* foi realizada segundo metodologia descrita por Furletti et al. (2011). Microplacas de fundo em “U” esterilizadas de 96 poços foram utilizadas para avaliar meios contendo as melhores fontes nutricionais, após resultados obtidos no item 2.4.1. Para esse ensaio foram utilizadas duas concentrações da levedura  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^7$  células/mL. Em cada poço, foram adicionados 100µL de cada meio e 100µL de cada concentração da levedura. As culturas foram incubadas em estufa a 25°C por diferentes tempos (48; 72 e 96h).

Depois do tempo indicado, o conteúdo das placas foi descartado, adicionando-se 150µL de solução de cristal violeta (1%) nos poços durante 30 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi descartado novamente, a placa foi lavada

cuidadosamente com água e então adicionou-se 200µL de álcool 96% por 15 minutos antes da leitura.

As microplacas foram lidas em um comprimento de onda de 540nm em leitor Elisa Biotek ELX800. Foi utilizado um delineamento em esquema fatorial, sendo cada tratamento composto por 5 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.6. Produção de sideróforos por *Sporobolomyces koalae***

Para esse ensaio foi utilizado o método adaptado de Schwyn e Neilands (1987), utilizando um complexo-ferro altamente colorido.

Primeiramente a levedura ACBL-42 foi cultivada em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido TSB (caldo tripticaseína de soja) diluído 10 vezes. A solução indicadora de cromo azurol S (CAS) foi preparada conforme descrito no manual da Embrapa (Cattelan, 1999).

As culturas foram incubadas a 25°C sob agitação constante em shaker, em diferentes períodos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas). Após o cultivo, em cada período correspondente, o conteúdo foi centrifugado a 12.000 G durante 10 minutos, transferindo-se 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio estéril, onde se adicionou 1 mL da solução CAS. Após 15 minutos fez-se a comparação visual dos resultados com o controle negativo (1 mL de meio TSB + 1 mL CAS).

Os isolados que convertem a cor azul / arroxeadado da solução CAS para amarelo a rosado foram considerados produtores de sideróforos, uma vez que, o tempo de transformação e intensidade da cor é indicativo de maior ou, menor produção de sideróforos.

### **3.7. Estudo do potencial irritante das células de *Sporobolomyces koalae***

Para esse estudo foram realizados dois ensaios seguindo a metodologia descrita por Oliveira, et al. (2012), utilizando 4 ovos SPF (*Specific Pathogen Free*) embrionados de galinha por grupo; sendo duas concentrações da levedura como

tratamentos ( $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  células/mL); histamina 0,1% como controle positivo; água destilada estéril como controle negativo e o grupo controle sem aplicação (Sham).

### **3.7.1. Avaliação do potencial irritante das células de *Sporobolomyces koalae* em membrana cório-alantóide: HET-CAM (*hen's egg test chorionallantoic membrane*)**

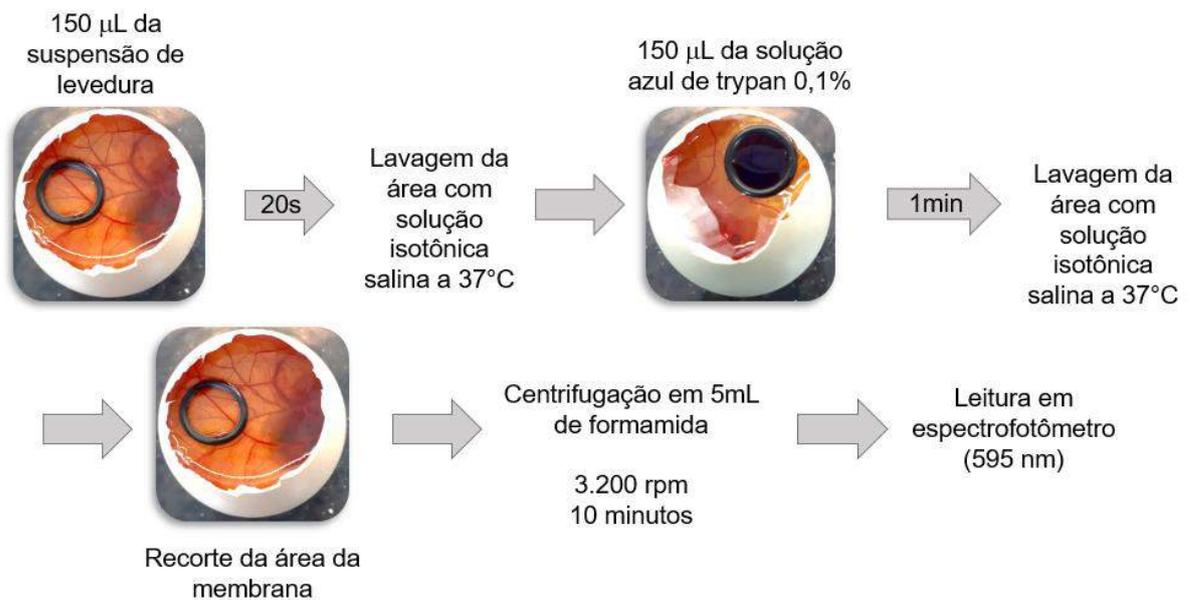
Após 10 dias de incubação em estufa a 37°C, cada ovo teve a remoção da casca ao redor da câmara de ar, evidenciando, assim, a membrana interna. Após remoção cuidadosa, a membrana cório-alantóide foi exposta e foram aplicados 300 µL de cada tratamento, como citado anteriormente. Depois de 20 segundos de contato, o produto foi removido, lavando-se a membrana cório-alantóide com solução salina isotônica a 37,0 °C. Durante 5 minutos, a membrana cório-alantóide foi examinada e as reações fisiológicas observadas foram graduadas em função de seu tempo de aparecimento.

### **3.7.2. Avaliação do potencial irritante das células de *Sporobolomyces koalae* em membrana cório-alantóide com coloração por azul de trypan: CAM-TBS (*chorionallantoic membrane – trypan blue staining*)**

No décimo dia de incubação, cada ovo teve a remoção da casca ao redor da câmara de ar, evidenciando, assim, a membrana interna. Esta foi removida cuidadosamente, a membrana cório-alantóide foi exposta. Sobre esta, foi colocado um anel de borracha de 1,5 cm estéril para delimitar a área tratada, conforme Figura 1. Foram aplicados 100 µL da suspensão de células sobre a membrana cório-alantóide, e, após 20 segundos, a área foi lavada com água destilada em temperatura ambiente. Depois, foram aplicados 500 µL da solução corante azul de trypan a 0,1% (P/V), deixando agir por 1 minuto. Em seguida, o corante foi removido lavando-se a área tratada com água destilada durante 20 segundos. Com auxílio de uma pinça, a área tratada da membrana foi cortada com uma tesoura. Então ela foi pesada e colocada em um tubo contendo 5 mL de formamida, o qual foi centrifugado com velocidade de 3.200 rpm por aproximadamente 10 minutos. O sobrenadante foi

transferido para uma cubeta de quartzo, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

A quantidade de azul de *trypan* absorvido pela membrana cório-alantóide foi calculada usando a média dos 4 ovos sobre o peso, e o controle negativo como referência (Tabela 10). As amostras foram classificadas segundo Yang et al. (1991): 0-0,1 = não irritante (NI), 0,1-0,2 = moderado-irritante (MI), acima de 0,2 = severo-irritante (SI).



**Figura 1:** Metodologia para avaliação do potencial irritante das células de *Sporobolomyces koalae* em membrana cório-alantóide com coloração por azul de trypan: CAM-TBS (*chorionallantoic membrane – trypan blue staining*).

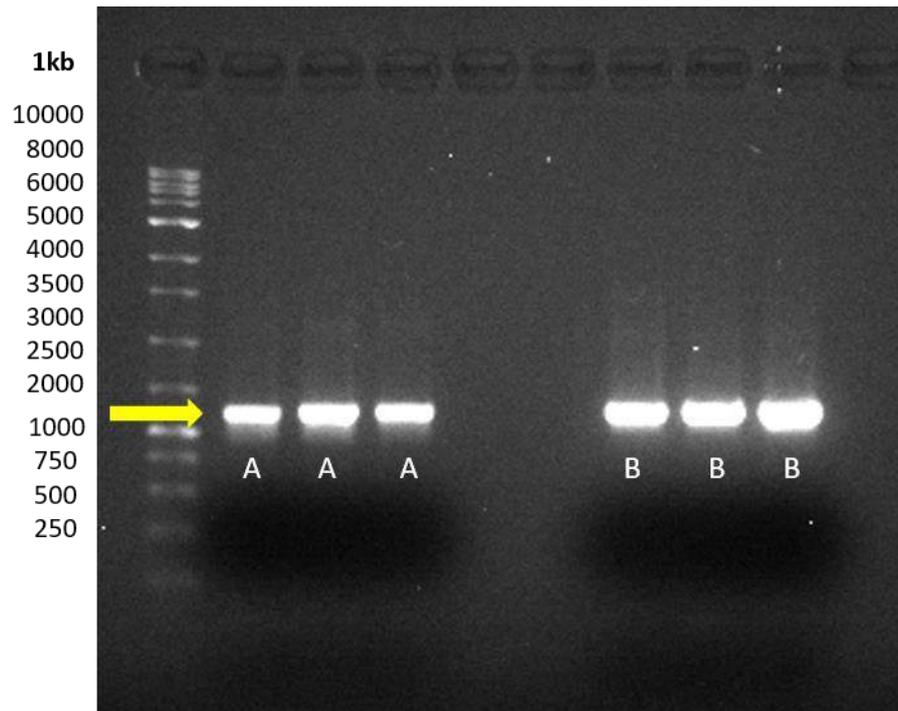
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação da cepa de levedura ACBL-42

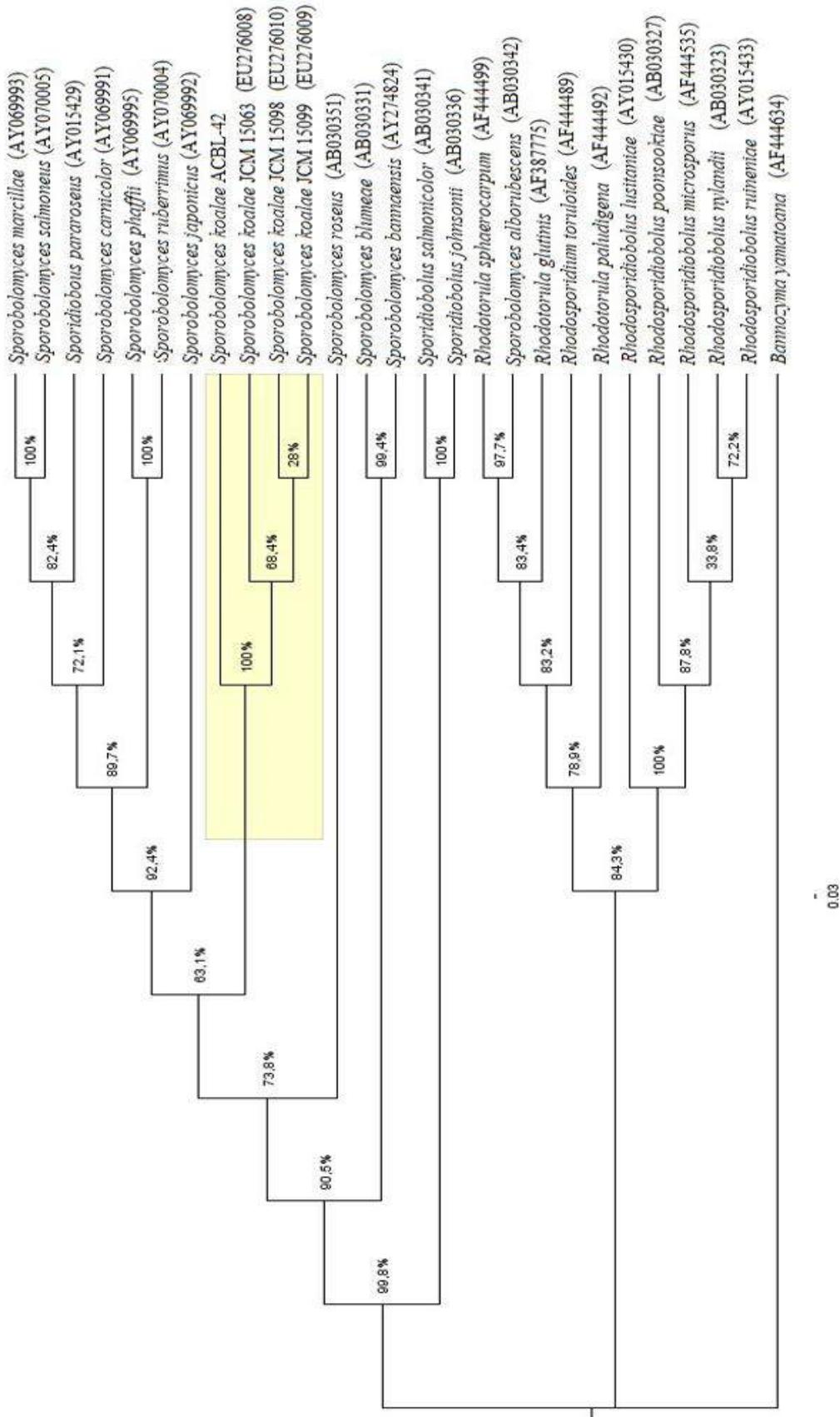
O protocolo de CTAB permitiu a extração de DNA com qualidade para as posteriores reações de amplificação e sequenciamento. O gel de agarose com o resultado da PCR (Figura 2) indicou que os *primers* amplificaram corretamente as regiões gênicas, possuindo aproximadamente 1200 pb em ambos.

Ambas as árvores sugerem que a cepa ACBL-42 é classificada como *Sporobolomyces koalae*, apresentando 100% (ITS) (Figura 3) e 99,5% (D1/D2) (Figura

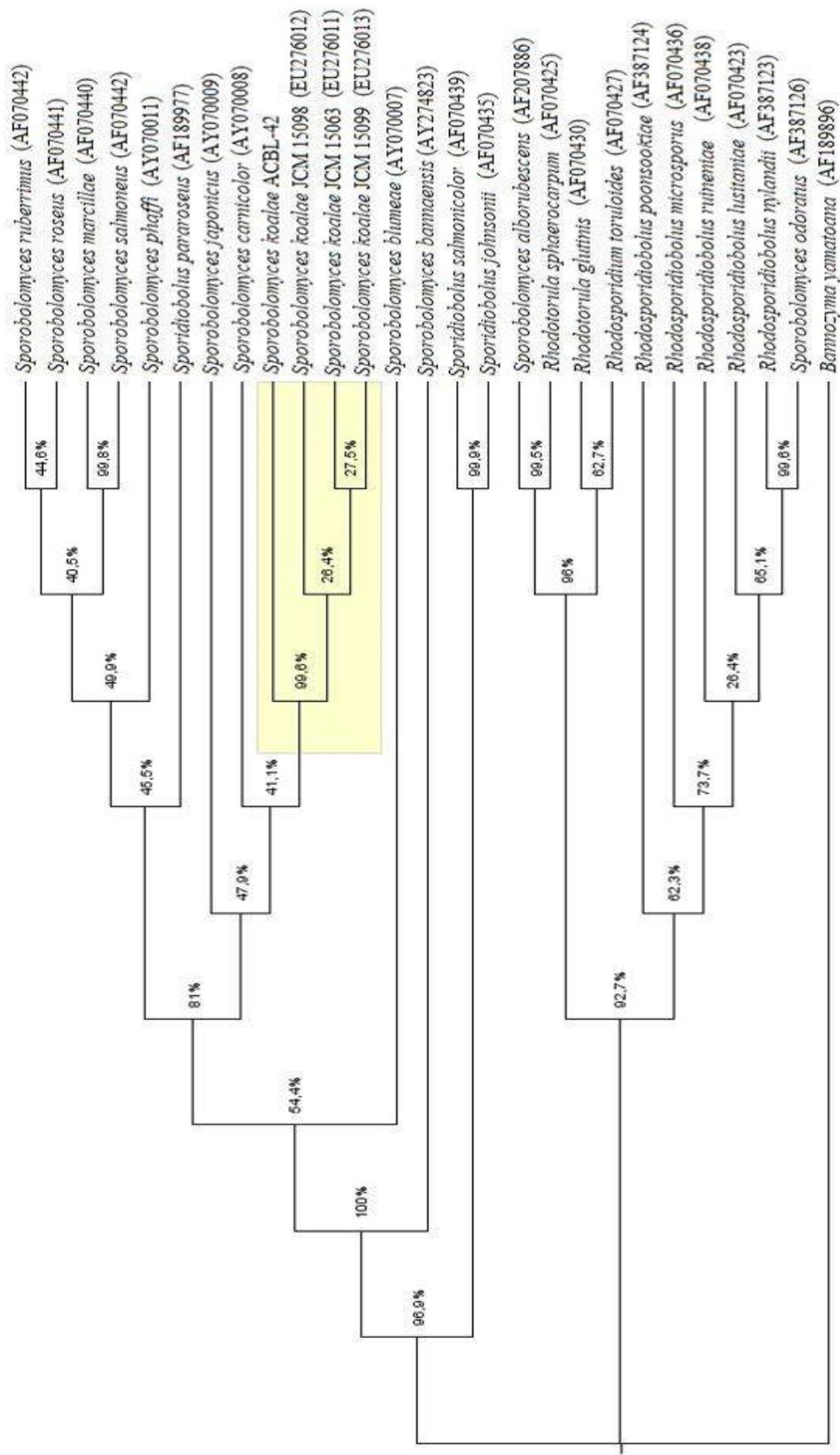
4) de similaridade com as outras cepas da mesma espécie, o que está de acordo com os dados apresentados nas árvores de Satoh e Makimura (2008). Em seguida foi construída, de forma inédita, uma árvore filogenética *multilocus* (Figura 5) para comparação dos dados de sequenciamento de ambas as regiões acima mencionadas em conjunto, o que aumenta a confiabilidade das informações.



**Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose 1% utilizando uma única amostra de produto de PCR realizada em triplicata para cada par de primer, sendo (A) primer ITS e (B) primer D1/D2. Padrão de peso molecular de 1 kb (Prolab). A seta indica o peso aproximado da fração, sendo aproximadamente 1200pb.



**Figura 3:** Árvore filogenética extraída da análise *neighbour-joining* das sequências do domínio 5.8S rDNA ITS, mostrando as relações de cepas de *Sporobolomyces koalae* com espécies intimamente relacionadas. O grupo externo foi *Bensingtonia yamatoana* CBS 7243.



**Figura 4:** Árvore filogenética extraída da análise *neighbour-joining* das sequências do domínio 26S rDNA D1/D2, mostrando as relações de cepas de *Sporobolomyces koalae* com espécies intimamente relacionadas. O grupo externo foi *Bensingtonia yamatoana* CBS 7243.



## 4.2. Estudo do crescimento de *Sporobolomyces koalae* (ACBL-42)

### 4.2.1. Efeito de diferentes meios de cultivo na produção de células de *Sporobolomyces koalae*

Os dados referentes ao efeito do meio de cultivo e do período de incubação na produção de células de *S. koalae* ACBL-42 encontram-se nas Tabelas de 1 a 3 e ilustrados na Figura 6.

O meio de cultura que apresentou maior número de unidades formadoras de colônia (UFC) /mL foi o Sabouraud, com média de  $2,01 \times 10^8$  UFC/mL, seguido do BDA com  $1,53 \times 10^8$  UFC/mL. Todos os meios diferiram estatisticamente entre si e o melhor período de incubação da cultura foi de 48h, com a maior concentração de células da levedura.

**Tabela 1.** Valores correspondentes à soma de quadrado, quadrado médio, significância e coeficiente de variação do efeito de diferentes meios de cultivo em diferentes tempos de incubação de *Sporobolomyces koalae* em relação a contagem de UFC/mL.

Coeficiente de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F
Meio (M)	4	29080535,7945	7270133,9486	359,787*
Tempo de incubação (TI)	6	214141980,1695	35690330,0282	1766,255*
M x TI	24	215294799,0732	8970616,6280	443,941*
Coeficiente de variação (%)				11,90

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ )

**Tabela 2:** Variação do efeito de diferentes meios de cultivo para *Sporobolomyces koalae* em relação a contagem de UFC/mL.

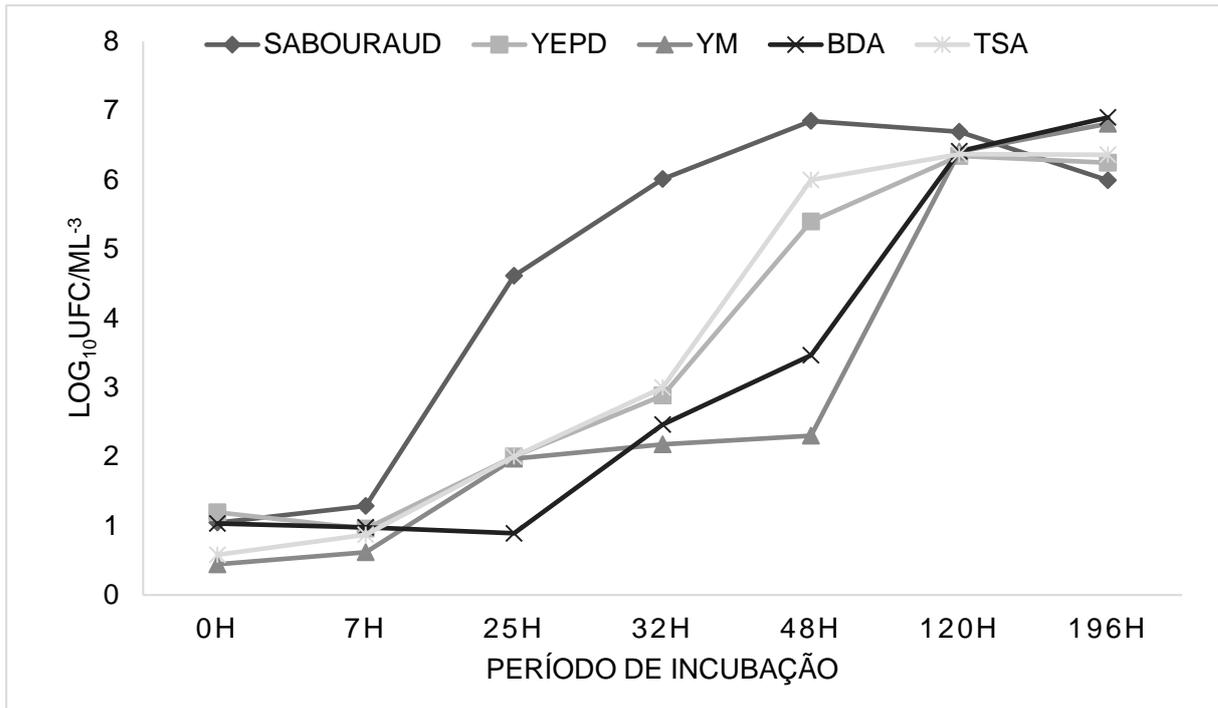
Meios de cultura	Médias de UFC x 10 <sup>5</sup>
YEPD	583,0071 a
TSA	724,9538 b
YM	1119,0704 c
BDA	1528,6219 d
SAB	2014,9047 e

(1) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 3:** Análise da variação de UFC/mL de *Sporobolomyces koalae*, em meio Sabouraud, nos diferentes períodos de incubação.

Períodos de incubação (horas)	Médias de UFC x 10 <sup>5</sup>
0	0,0000 a
7	0,0000 a
25	41,0000 a
32	1030,0000 b
48	7066,6667 d
120	4933,3333 c
192	1033,3333 b

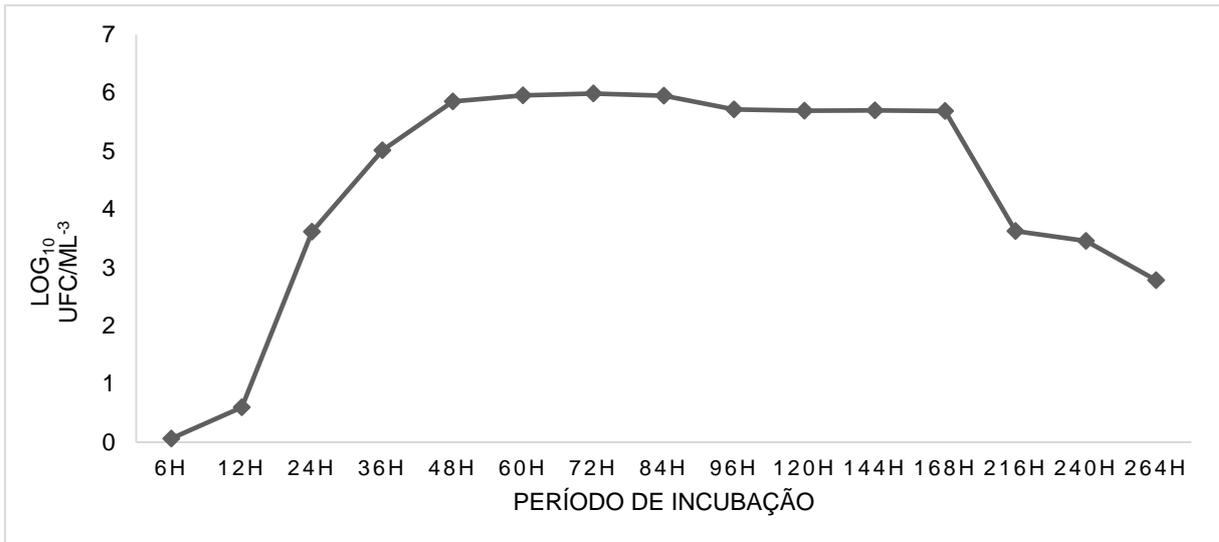
(1) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 6:** Efeito do meio de cultivo e do período de incubação na produção de células de *Sporobolomyces koalae*.

#### 4.2.2. Determinação da curva de crescimento de *S. koalae* (ACBL-42)

Com relação aos estudos de crescimento da levedura, foi possível verificar que o meio Sabouraud proporcionou o maior desenvolvimento do microrganismo, sendo a maior concentração de células da levedura obtida no período de 48 horas. Ao se observar a curva de crescimento de ACBL-42 cultivada em meio Sabouraud, notou-se que a fase *lag* foi de 6 horas, a exponencial de 12 a 48h e a fase estacionária de 48 a 84h, começando a decair lentamente a partir desse tempo, entrando na fase de declínio com 168h (Figura 7).



**Figura 7:** Curva de crescimento para a produção de células de *Sporobolomyces koalae* ACBL-42 cultivada em meio Sabouraud em diferentes períodos de incubação.

### 4.3. Atividade antagônica da levedura de *Sporobolomyces koalae* contra *Geotrichum citri-aurantii*

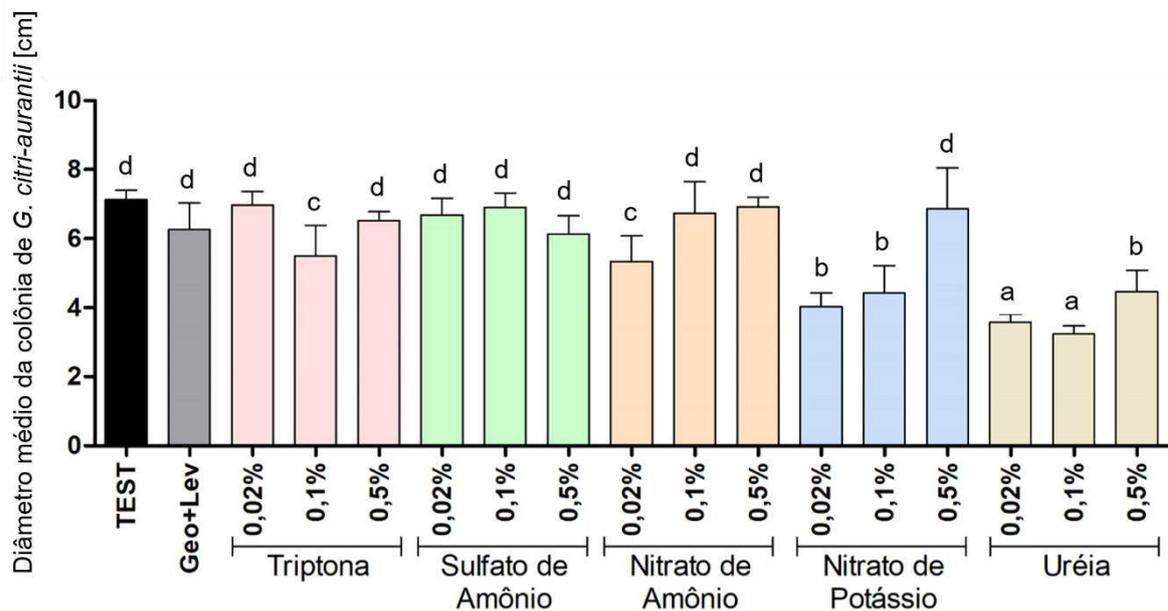
#### 4.3.1. Adição de fonte nitrogenada em meio de cultivo de *Sporobolomyces koalae* e seu efeito na atividade antagônica contra *Geotrichum citri-aurantii*

O presente estudo mostrou que adições de fontes nutricionais em meio de cultivo da levedura podem favorecer a sua atividade antagônica contra *Geotrichum citri-aurantii*. Como fonte de nitrogênio, a ureia nas menores concentrações (0,1% e 0,02%) diminuiu, estatisticamente, o desenvolvimento do fitopatógeno. As fontes de nitrogênio, nitrato de potássio (0,02 e 0,1%), também, favoreceram o antagonismo, porém, numa proporção menor quando comparado à ureia nas duas concentrações citadas. Todos esses tratamentos diferiram da levedura cultivada em meio Sabouraud padrão (Figura 8).

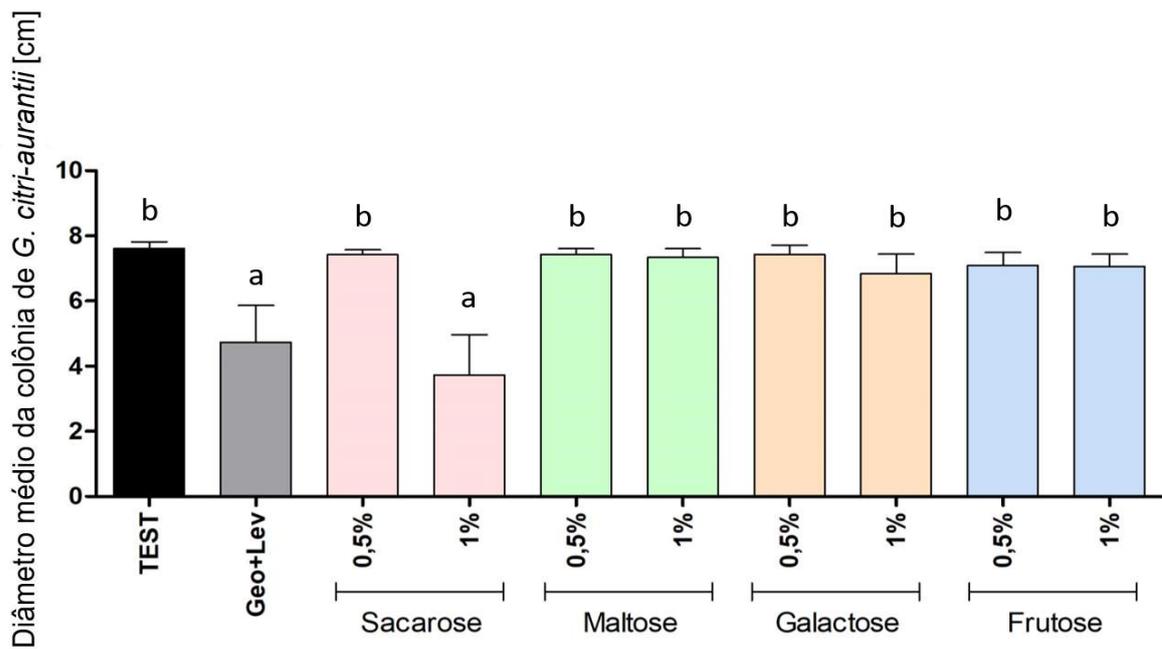
Como fonte de carbono, a sacarose a 1% afetou, estatisticamente, o crescimento da colônia do fitopatógeno, porém, não diferiu do meio Sabouraud padrão (Figura 9).

A utilização de micronutrientes combinada com o meio de cultivo Sabouraud também favoreceu o antagonismo da levedura, sendo o menor tamanho da colônia de *Geotrichum citri-aurantii* obtido com o sulfato de cobre (0,05mM), seguido de sulfato de zinco (0,05mM) (Figura 10).

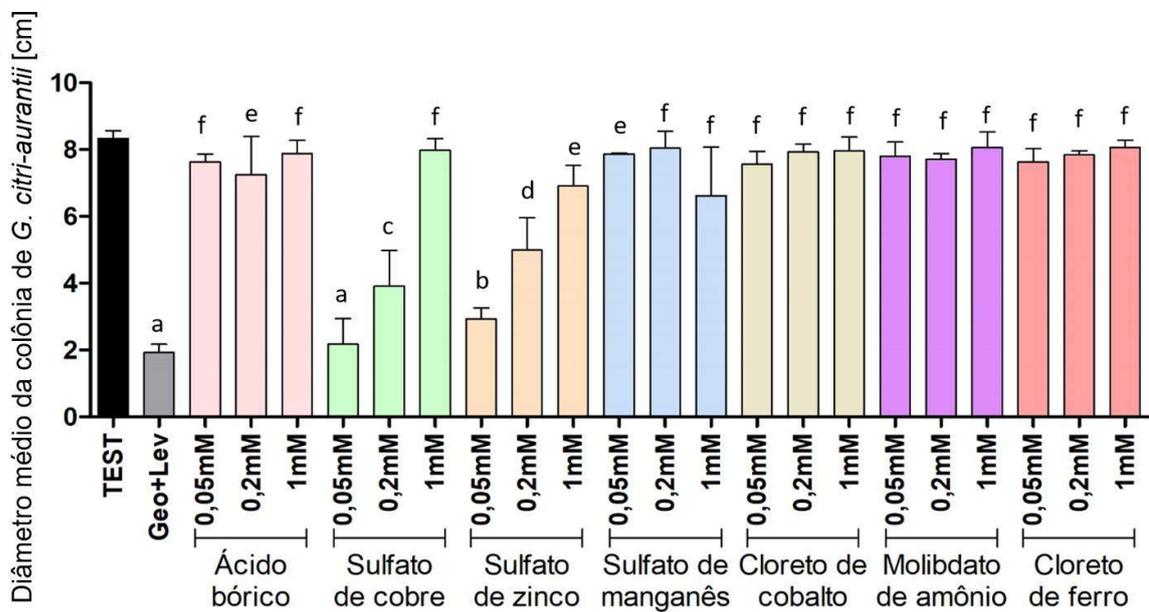
A levedura quando cultivada em meio acrescido das melhores fontes nutricionais (ureia 0,1%; sacarose 1% e sulfato de cobre 0,05mM) não inibiu o crescimento da colônia do fitopatógeno (Figura 11).



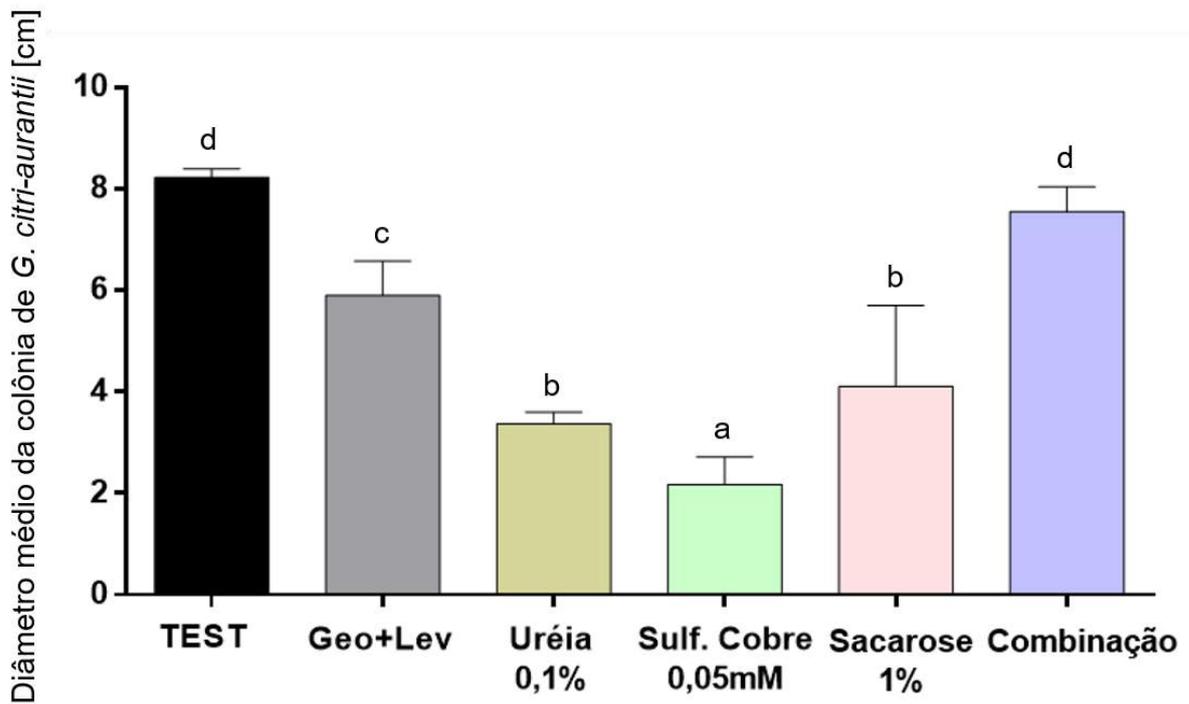
**Figura 8:** Efeito de fontes de nitrogênio no meio de cultivo de *Sporobolomyces koalae* na atividade antagônica de *Geotrichum citri-aurantii*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 9:** Efeito de fontes de carbono no meio de cultivo de *Sporobolomyces koalae* na atividade antagônica de *Geotrichum citri-aurantii*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 8:** Efeito de fontes de micronutrientes no meio de cultivo de *Sporobolomyces koalae* na atividade antagônica de *Geotrichum citri-aurantii*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ).



**Figura 11:** Efeito da combinação das melhores fontes selecionadas em meio de cultivo de *Sporobolomyces koalae* na atividade antagônica de *Geotrichum citri-aurantii*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p \geq 0,05$ ).

#### 4.3.2. Competição por nutrientes entre *Sporobolomyces koalae* e *Geotrichum citri-aurantii*

Os dados do estudo de competição por nutrientes nas interações entre *S. koalae* ACBL-42 e *G. citri-aurantii*, avaliados pela germinação de conídios do fitopatógeno encontram-se na Tabela 4.

A levedura *S. koalae* ACBL-42 inibiu a germinação de conídios de *G. citri-aurantii* (66,4%), independente da fonte nutricional. Quando adicionado uma fonte de carbono ou de nitrogênio juntamente com a levedura, a porcentagem de inibição variou de 92 a 96%, fornecendo um aumento na inibição de 38%.

**Tabela 4:** Competição por nutrientes entre *Sporobolomyces koalae* ACBL-42, e *Geotrichum citri-aurantii*.

Tratamentos	% conídios germinados <i>Geotrichum citri-aurantii</i>	% inibição em relação a testemunha
ACBL-42	26,6 b <sup>(1)</sup>	66,42
Testemunha (apenas <i>G. citri-aurantii</i> )	79,3 d	-
Ureia 0,02%	78,6 d	0,85
Ureia 0,1%	80,4 d	-1,36
ACBL-42 + Ureia 0,02%	5,00 a	93,69
ACBL-42 + Ureia 0,1%	2,88 a	96,37
Sulfato de amônio 0,02%	77,3 d	2,59
Sulfato de amônio 0,1%	77,5 d	2,27
ACBL-42 + Sulfato de amônio 0,02%	5,13 a	93,54
ACBL-42 + Sulfato de amônio 0,1%	4,13 a	94,80
Nitrato de Potássio 0,02%	77,5 d	2,27
Nitrato de Potássio 0,1%	76,6 d	3,37
ACBL-42 + Nitrato de Potássio 0,02%	4,88 a	93,85
ACBL-42 + Nitrato de Potássio 0,1%	6,63 a	91,65
Sacarose 0,5%	79,0 d	0,38
Sacarose 1%	76,4 d	3,69
ACBL-42 + Sacarose 0,5%	6,13 a	92,28
ACBL-42 + Sacarose 1%	3,63 a	95,43
Dextrose 0,5%	77,5 d	2,27
Dextrose 1%	63,5 c	19,92
ACBL-42 + Dextrose 0,5%	5,38 a	93,22
ACBL-42 + Dextrose 1%	3,63 a	95,43
Galactose 0,5%	65,8 c	17,09
Galactose 1%	67,0 c	15,51
ACBL-42 + Galactose 0,5%	5,50 a	93,06
ACBL-42 + Galactose 1%	6,25 a	92,12

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

#### 4.4. Produção de biofilme por *Sporobolomyces koalae*

*Sporobolomyces koalae* produz biofilme e essa produção dependeu do meio de cultivo da levedura. Os meios enriquecidos com sulfato de cobre (0,05mM) ou com sacarose favoreceram a produção de biofilme (Tabela 5), nas duas concentrações de inóculo da levedura. A combinação [ureia (0,1%) como fonte de nitrogênio, sacarose (1%) como fonte de carbono e sulfato de cobre (0,05mM), como micronutriente] aumentou a produção de biofilme pela levedura somente quando se utilizou a maior concentração de inóculo inicial ( $1 \times 10^7$  células/mL).

A maior concentração inicial do inóculo ( $1 \times 10^7$  células/mL) e o tempo de incubação de 48 e 72h favoreceram a produção do biofilme pela levedura (Figuras 12 e 13).

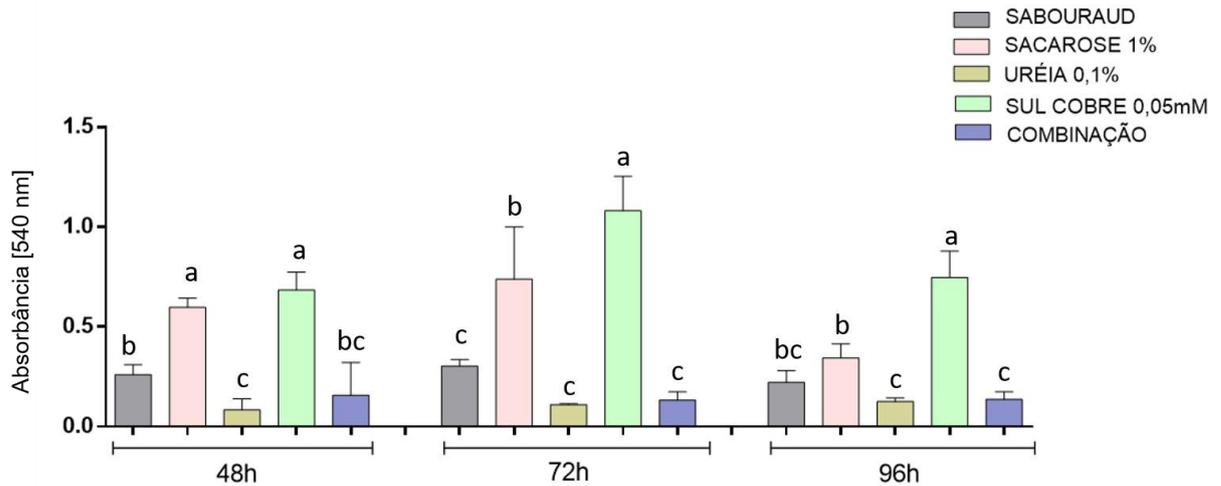
Pode-se observar, ainda que, na menor concentração de inóculo ( $1 \times 10^5$  células/mL) usada, o meio com adição de sulfato de cobre estimulou a produção do biofilme pela levedura em todos os períodos de incubação, não diferindo do meio com sacarose 1% apenas no período de 48 horas (Figura 12).

Quando se utilizou uma concentração de inóculo de  $1 \times 10^7$  células/mL, a maior produção de biofilme ocorreu com o meio de sacarose 1% ou, com a combinação, no período de 48 h. Nos períodos de incubação de 72 e 96 h, o meio acrescido das três fontes nutricionais favoreceu a produção de biofilme por *S. koalae* (Figura 13).

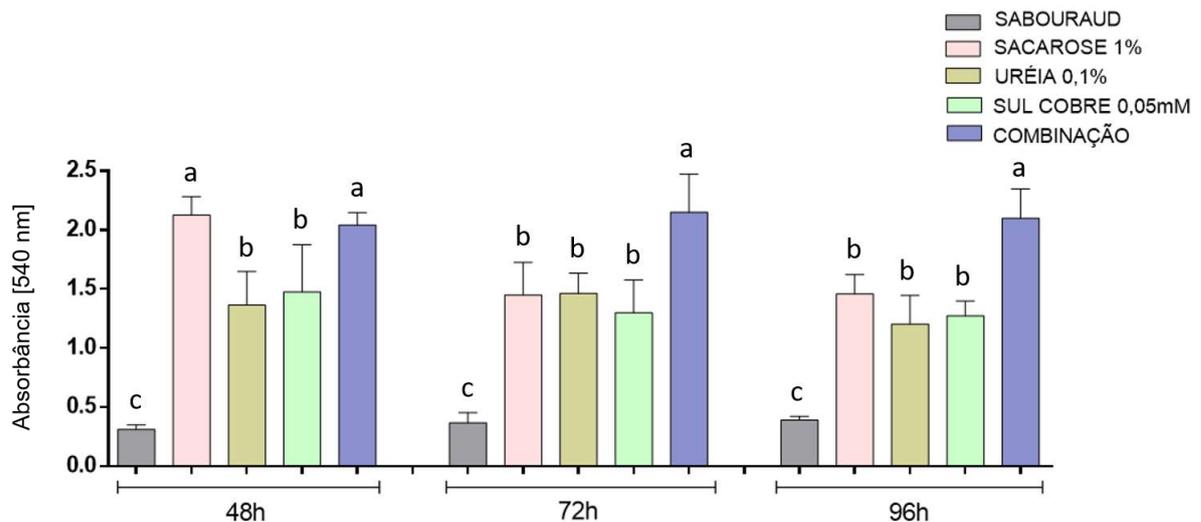
**Tabela 5:** Efeito do meio de cultura na produção de biofilme por *Sporobolomyces koalae*, avaliado através dos valores de absorbância (540 nm).

Meio de cultura	Valor médio de absorbância (540 nm)
Sabouraud (SAB)	0,3093 c
Ureia 0,1%	0,7245 b
Sulfato de cobre (0,05mM)	1,0934 a
Sacarose (1%)	1,1189 a
Combinação	1,1198 a

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



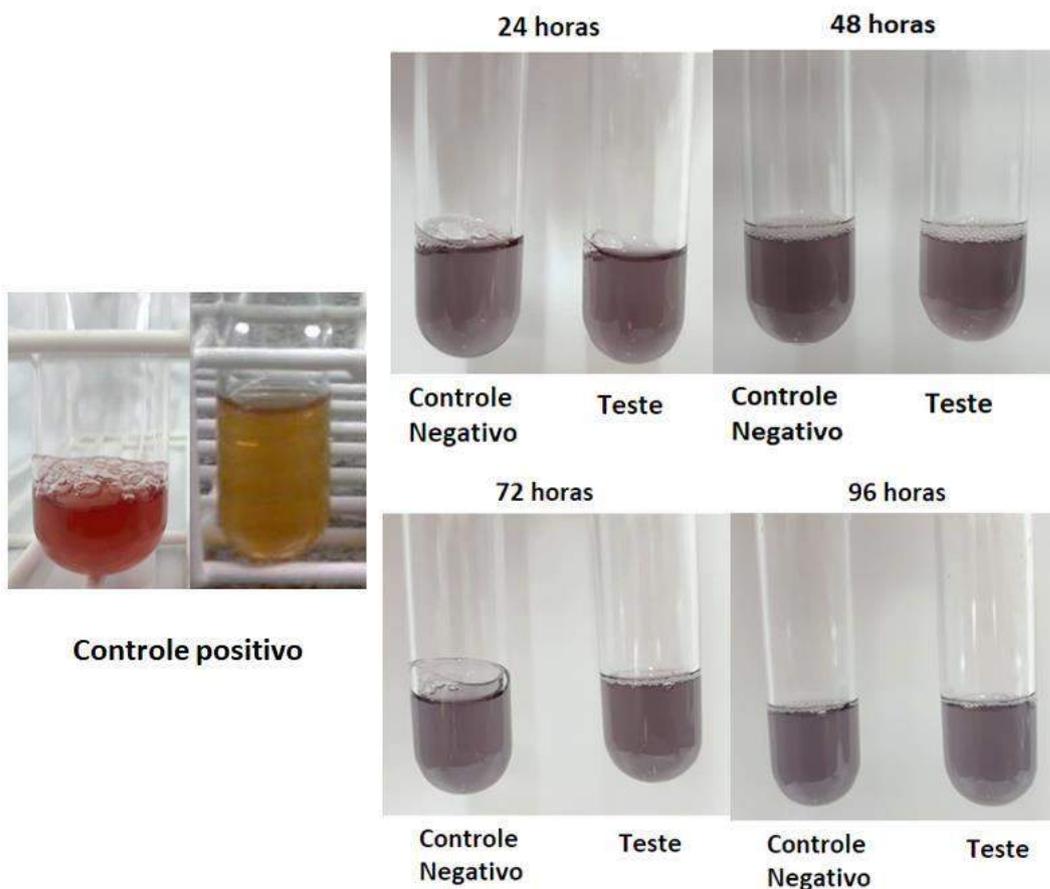
**Figura 12:** Efeito do meio de cultura e tempo de incubação na produção de biofilme por *Sporobolomyces koalae* (inóculo inicial de  $1 \times 10^5$  células/mL), avaliado através dos valores de absorbância (540 nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.



**Figura 13:** Efeito do meio de cultura e tempo de incubação na produção de biofilme por *Sporobolomyces koalae* (inóculo inicial de  $1 \times 10^7$  células/mL), avaliado através dos valores de absorbância (540 nm). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

#### 4.5. Produção de sideróforos por *Sporobolomyces koalae*

Os dados referentes à produção de sideróforos pelas células de *S. koalae* ACBL42 encontram-se ilustrados na Figura 14. A levedura não apresentou produção de sideróforos no teste visual qualitativo utilizado, portanto acredita-se que, esse não é um dos mecanismos possíveis de ação no biocontrole.

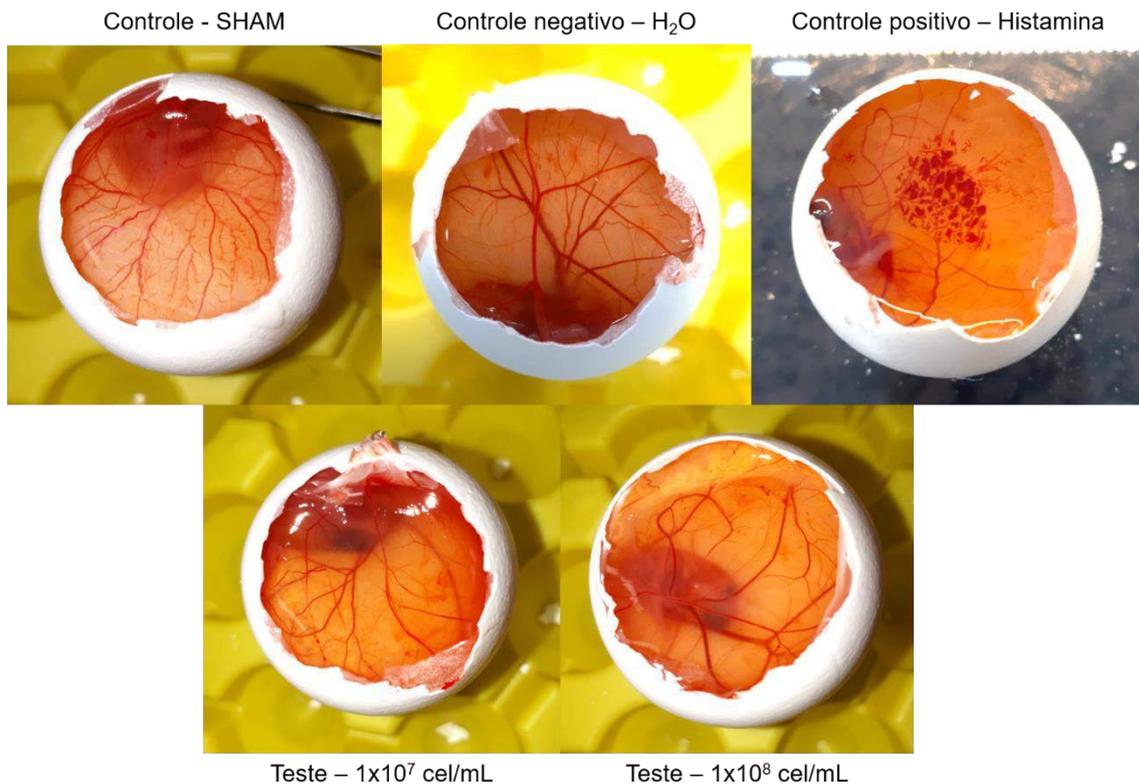


**Figura 14:** Avaliação qualitativa colorimétrica de produção de sideróforos por *Sporobolomyces koalae*.

#### 4.6. Estudo do potencial irritante das células de *Sporobolomyces koalae*

##### 4.6.1. Avaliação do potencial pró-inflamatório das células de *Sporobolomyces koalae* em membrana cório-alantóide: HET-CAM (*hen's egg test chorionallantoic membrane*)

O teste de atividade pró inflamatória em ovos demonstrou que a levedura, em ambas as concentrações testadas, foi classificada como levemente irritante (LI) pela metodologia de Oliveira et al., (2012). A visualização foi contabilizada macroscopicamente (Figura 15) e foi calculada a classificação final de acordo com a graduação do aparecimento de lesões (Tabela 6).



**Figura 15:** Demonstração da avaliação macroscópica do potencial pró-inflamatório das células de *Sporobolomyces koalae* pelo teste HET-CAM na membrana cório-alantóide em ovos de galinha SPF embrionados. Visualização das reações fisiológicas nos vasos sanguíneos da membrana.

**4.6.2. Avaliação do potencial irritante das células de *Sporobolomyces koalae* em membrana cório-alantóide com coloração por azul de trypan: CAM-TBS (*chorionallantoic membrane – trypan blue staining*)**

Ambas as concentrações da levedura *S. koalae* ( $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  cél/mL) testadas foram classificadas como não-irritantes segundo a metodologia CAM-TBS de Yang et al. (1991) (figura 15).

**Tabela 6.** Resultados da classificação final obtida com as médias dos testes HET-CAM e CAM-TBS das células de *Sporobolomyces koalae*.

Tratamentos	HET-CAM		CAM-TBS	
	Média	Classificação	Média	Classificação
$1 \times 10^7$ cél/mL	2,5	IL	0,01	NI
$1 \times 10^8$ cél/mL	2,75	IL	0,03	NI
Histamina 0,1%	8	IM	0,63	SI
Água	0	NI	0,0	NI
Sham	0	NI	0,0	NI

\*NI: não-irritante;/IL: irritante-leve; IM: irritante moderado; IS: irritante severo.

## 5. DISCUSSÃO

A cepa ACBL-42 foi isolada por Ferraz et al. (2016) e identificada apenas pelo sequenciamento de nucleotídeos da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) como *Sporobolomyces koalae*, sendo reconhecida no Brasil de forma inédita. Essa espécie foi descrita por Satoh e Makimura (2008) no Japão, utilizando a identificação pela região ITS e D1/D2. Com isso, para a caracterização da espécie, foi realizado o sequenciamento e análise de ambas as regiões.

A região ITS é utilizada para diferenciação de eucariotos, pois é altamente conservada intraespecificamente, mas variável entre diferentes espécies, o que possibilita a distinção a nível específico (Fungaro, 2000). Porém, há casos em que o gene ITS não é suficiente para diferenciar linhagens, como, por exemplo, com linhagens de *Aspergillus* (Batista, 2007), sendo necessário o uso de outros marcadores moleculares para correta classificação.

Comparando-se as árvores filogenéticas do respectivo estudo, é possível observar que a região ITS foi suficiente para confirmar a espécie, porém a utilização das duas regiões (ITS e D1/D2) para a construção de uma árvore *multilocus* aumentou a precisão quanto à distinção entre os isolados da mesma espécie, ou seja, o isolado ACB-42 e os três isolados (JCM 15063, 15098 e 15099) estudados por Satoh e Makimura em 2008. A subdivisão encontrada dentro do ramo da *S. koalae* entre os isolados pode indicar um processo de especiação devido à separação geográfica e as diferentes pressões de seleção (Diniz-Filho et al., 2009).

Com relação aos estudos de crescimento da levedura, foi possível verificar que o meio Sabouraud proporcionou o melhor desenvolvimento do microrganismo, sendo a maior concentração de células da levedura no período de 48 horas.

O ágar Sabouraud é, comumente, utilizado para isolamento e cultivo de fungos, utilizando a peptona como fonte de nitrogênio e a dextrose como fonte de carbono. Foi criado por Ajello et al., 1963, no qual descreve a elevada concentração de dextrose neste meio, como uma vantagem para o desenvolvimento de fungos, uma vez que, quando comparado com bactérias, sabe-se que a maioria delas não tolera uma elevada concentração de açúcar.

Ao se observar a curva de crescimento de ACBL-42 cultivada em meio Sabouraud, notou-se que a fase *lag* foi de 6 horas, a exponencial de 12 a 48h e a fase

estacionária de 48 a 84h, começando lentamente a fase de queda de crescimento bacteriano a partir desse tempo, entrando na fase de declínio com 168h.

O conhecimento da curva de crescimento da levedura foi importante para a realização dos outros ensaios propostos neste trabalho, como por exemplo, a verificação da produção de biofilme pelo isolado ACBL-42, considerando os resultados obtidos por Ravella et al. (2010). Segundo os autores, a produção de biofilme de *Aureobasidium pullulans* ocorreu na fase estacionária da levedura, o que corrobora com os dados encontrados no presente estudo.

Dando continuidade aos estudos de biocontrole pela levedura, uma vez que, em estudos anteriores foi verificado o potencial de *S. koalae* como um agente de controle biológico contra *Geotrichum citri-aurantii* (Ferraz et al., 2016), o respectivo estudo mostrou que adições de fontes nutricionais em meio de cultivo da levedura podem favorecer a atividade antagônica contra *G. citri-aurantii*. Como fonte de carbono, a sacarose a 1% afetou, estatisticamente, o desenvolvimento do fitopatógeno, porém, não diferiu da levedura cultivada no meio padrão de Sabouraud (Figura 9). Um estudo realizado por Zimmer et al. (2013) demonstrou que a fonte de carbono utilizada no meio de cultivo interferiu na indução da produção de substância inibitória de crescimento de *Aspergillus fumigatus* USP2 por *Corynebacterium* sp, sendo dextrose a mais eficiente, seguida de sacarose, o que corrobora com os dados encontrados neste estudo.

Como fonte de nitrogênio, a ureia (0,1% e 0,02%) afetou o desenvolvimento do fitopatógeno, o nitrato de potássio (0,02 e 0,1%) e triptona (0,1%) também favoreceram o antagonismo, porém, numa proporção menor quando comparado à ureia. Resultados semelhantes foram obtidos por Klein e Kupper (2018), que ao trabalharem com um isolado de *Aureobasidium pullulans* observaram um aumento da sua atividade antagônica contra *G. citri-aurantii*, quando a levedura foi cultivada em meio acrescido de sulfato de amônio (0,5%), causando mais de 50% de inibição do crescimento micelial do patógeno.

Com relação à utilização de micronutrientes, combinadas com o meio de cultivo Sabouraud, verificou-se que, houve um favorecimento na atividade antagônica de *S. koalae*, sendo sulfato de cobre (0,05mM) o melhor, seguido de sulfato de zinco (0,05mM) (Figura 10). Klein e Kupper (2018) verificaram que o melhor resultado de

antagonismo de *A. pullulans* contra *G. citri aurantii* foi obtido com a adição de sulfato de cobre (1mM) ao meio de cultivo.

A combinação das melhores fontes nutricionais ao meio de cultura não favoreceu o antagonismo de ACBL-42, sendo que os nutrientes sozinhos apresentaram os melhores resultados de inibição da colônia de *G. citri-aurantii* (Figura 11).

O estudo de competição por nutrientes entre *S. koalae* e *G. citri-aurantii* mostraram que a levedura inibiu a germinação de conídios do fitopatógenos, independentemente, da fonte nutricional utilizada, porém, quando se adicionou uma fonte de carbono ou, de nitrogênio juntamente com o antagonista, a taxa de inibição apresentou um aumento acima de 38%. Possivelmente, a competição por nutrientes não é um dos mecanismos de ação adotado pela levedura, embora os nutrientes tenham favorecido a atividade antagônica. Esse estudo não corrobora com Liu et al. (2013) que relataram ser a competição por nutrientes o mecanismo de ação utilizado pela levedura *Kloeckera apiculata* contra *Penicillium italicum*, agente causal do bolor azul em citros.

A formação de biofilme por antagonistas pode ser considerada como uma vantagem, também, para o controle biológico, considerando que o antagônico necessita, muitas vezes aderir e manter-se em superfícies específicas, como em fermentos em frutos (Droby et al., 2009).

Nesse estudo foi verificado que *S. koalae* produz biofilme e essa produção dependeu do inóculo inicial e do meio de cultivo da levedura. A adição de sulfato de cobre e/ou de sacarose contribuíram para que houvesse um aumento na produção de biofilme.

Dados de literatura relatam que o favorecimento pela sacarose na formação de biofilme se dá pela síntese de polissacarídeos extracelulares, decorrentes da variação de energia livre da hidrólise da sacarose pela ação de glicosiltransferases. Isso corrobora com os dados encontrados por Borges et al. (2008), que demonstraram uma maior produção de biofilme *in vitro* por *Streptococcus mutans* em meio enriquecido com sacarose a 20%.

O bom resultado encontrado com a utilização de sulfato de cobre pode ser explicado pelo fato dos íons cobre servirem como ativadores de enzimas, importantes

co-fatores catalíticos nas reações de redox de proteínas, que possuem funções biológicas fundamentais e exigidas durante o crescimento e desenvolvimento de microrganismos e plantas (Sampaio et al., 2013). Os resultados obtidos por Yurlova e Hoog (1997) mostraram que a quantidade de exopolissacarídeos pode ser estimulada pela concentração de diferentes fontes de nitrogênio durante o cultivo de *A. pullulans*, não corroborando com o observado por este estudo, onde a ureia (1%) só foi importante quando combinada com a sacarose 1% e sulfato de cobre 0,05mM para a produção de biofilme, no entanto, a combinação só favoreceu quando se utilizou a maior concentração da levedura.

O desenvolvimento e reprodução das células depende da disponibilidade de nutrientes em seu ambiente. Células de leveduras são conhecidas por terem a capacidade de alterar seu crescimento e comportamento de acordo com os nutrientes disponíveis (Broach, 2012). Boer et al. (2008) demonstrou que as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* respondem a disponibilidade de fontes de nitrogênio, fosfato, sulfato e açúcares, sendo que as vias de assimilação modificam suas funções celulares em resposta ao estresse. Como pode ser observado nesse estudo, a levedura ACBL-42 não foi eficaz no antagonismo em meio com a combinação de nutrientes, no qual apresentou maior produção de biofilme. Sugere-se que a presença dos nutrientes selecionados pode ter a capacidade de alterar as funções celulares da *S. koalae* de forma que o mecanismo de ação utilizado por ela no antagonismo seja afetado negativamente e, assim, perdeu a eficácia no controle da colônia do patógeno.

A disponibilidade de ferro no substrato é determinante para o desenvolvimento da maioria dos microrganismos. Diante deste contexto, o microrganismo que for capaz de produzir uma substância (sideróforo) que sequestra o ferro do substrato, nas condições de ausência do elemento, terá uma vantagem durante a competição entre eles (Romeiro, 2007). Segundo Botha (2010), a competição pelos íons de ferro mediada pela produção de sideróforos é, comumente, encontrada nas comunidades microbianas do solo. Exemplos de microrganismos são as leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Metschnikowia pulcherrima*, isoladas da rizosfera e que produzem como sideróforos os ácidos rodotorúlico e pulparrimínico, respectivamente, ambos efetivos contra uma variedade de microrganismo (Sansone et al., 2005; Sipiczki, 2006). Esses trabalhos não corroboram com os resultados obtidos neste estudo, onde o isolado de

*S. koalae* ACBL-42 não foi capaz de produzir sideróforos, concluindo-se que esse não foi um mecanismo de ação adotado pela levedura contra *G. citri-aurantii*.

Ao estudarem os possíveis mecanismos de ação do isolado ACBL-42 (*S. koalae*) Ferraz et al., (2016) verificaram que a antibiose e a produção de enzimas hicolíticas não foram mecanismos empregados no antagonismo contra *Geotrichum citri-aurantii*. Por outro lado, Machado em 2018 observou que a levedura combinada com o fungicida guazatine (1%) apresentou 100% de controle da podridão azeda, quando frutos de laranja Pêra foram tratados preventivamente com *S. koalae* e, inoculados artificialmente com *G. citri-aurantii*, o que demonstra que a levedura tem potencial para ser explorado como agente de biocontrole, uma vez que, o fungicida sozinho não foi eficiente no controle do fitopatógeno.

Considerando a possibilidade da confecção de um bioproduto à base da levedura, pesquisas sobre a segurança desse microrganismo foram iniciados no respectivo estudo.

Nesse aspecto, a avaliação da atividade pró inflamatória na membrana cório-alantóide de ovos embrionados demonstrou que a levedura pode ser classificada como levemente irritante (LI) pela metodologia HET-CAM e não irritante pelo teste de CAM-TBS.

De acordo com Lagarto et al. (2006), o teste HET-CAM está sujeito a subjetividade das avaliações em função ao tempo, o que vem sendo criticado por depender muito do julgamento pessoal, impactando diretamente na sua reprodutibilidade. Dessa maneira, a utilização do CAM-TBS agrega valor ao HET-CAM clássico, por meio da incorporação de uma leitura quantitativa. Tal fato justifica as diferentes classificações obtidas pela levedura, nas duas metodologias utilizadas.

García et al. (2004) também utilizaram a metodologia HET-CAM para *Pochonia chlamydosporia*, um fungo eficaz no controle do nematóide *Meloidogyne* spp., classificando o microrganismo como não irritante.

Até o momento, não existem evidências de que a levedura possa estar relacionada com alguma patologia de plantas, animais ou de humanos. No entanto, outros testes devem ser realizados, como por exemplo testes de irritação da pele que, juntamente com os olhos, é uma das primeiras barreiras de proteção do nosso organismo, para assim obtermos a confecção de um bioproduto seguro.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste estudo, foi possível concluir que:

- a) A região ITS é suficiente para caracterizar a espécie do isolado ACBL-42 de *Sporobolomyces koalae*, porém, a utilização de uma análise filogenética *multilocus* permite uma melhor distinção entre isolados da mesma espécie;
- b) O melhor meio de cultura para o crescimento de *S. koalae* foi o Sabouraud com um período de incubação de 48 horas;
- c) O meio Sabouraud suplementado com uma fonte de carbono, sacarose (1%) ou, elemento traço (sulfato de cobre 0,05mM) favoreceu a produção de biofilme e aumentou a atividade antagônica da levedura contra *Geotrichum citri-aurantii*;
- d) A produção de sideróforos não é um mecanismo de ação utilizado pelo isolado ACBL-42 (*S. koalae*);
- e) *Sporobolomyces koalae* não apresentou efeitos pró-inflamatórios em testes de membrana cório-alantóide de ovos embrionados.

Considerando a escassez de literatura a respeito de *S. koalae*, mais estudos devem ser realizados não só para garantir a sua segurança, quando da confecção de um bioproduto, mas, também, em termos de conhecimento da levedura e, do microrganismo como um agente de controle biológico.

## 7. REFERÊNCIAS

Agrios, G.N. (2005) **Plant Pathology**, 5 ed. 952p.

Ajello L, Georg LK, Georg WK, Kaufman L (1963) **CDC laboratory manual for medical mycology**. PHS Publication No. 994, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Almeida, LFV (2016) **Estudo diagnóstico e taxonômico de cochonilhas (Hemiptera: Coccoidea) associadas às plantas cítricas no estado de São Paulo, Brasil**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UNESP, Jaboticabal.

Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm Phylogeny. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 82: 247-277.

Batista, PP (2007) **Caracterização de linhagens do grupo *Aspergillus flavus* baseada em marcadores de DNA**. 57 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A, Visconti A (2006) Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 204-209.

Boer, VM; Amini, S; Botstein, D (2008) Influence of genotype and nutrition on survival and metabolism of starving yeast. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 105, n. 19, p.6930-6935. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802601105>.

Borges MF, Castilho ARF, Pereira, CV (2008) Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *Streptococcus mutans*: estudo *in situ* e *in vitro*. **Revista Odonto Ciência** 23: 360-364.

Botha A (2011) The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology**. Biochem. 43:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.001>

Broach, JR (2012) Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. **Genetics Society of America**. v. 192, n. 1, p.73-105. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.135731>.

Broetto L, Coltro-Roncato S, Meinerz CC, Dildey ODF, Pazdiora PC, Gonçalves EDV, Moraes AJ, Henkemeier NP, Kuhn OJ, Stangarlin JR (2014) Crescimento micelial e produção de 52 microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. **Scientia Agraria Paranaensis** 13:310-317.

Brown GE, Eckert JW (2000) **Sour rot**. In: Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH (Ed.) Compendium of citrus diseases. St. Paul: APS Press, p. 43-43.

Cattelan AJ (1999) Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja**. Documentos, 139, 36p.

Diniz-Filho JAF, Terribile LC, Oliveira G, Rangel TFLVB (2009) Padrões e processos ecológicos e evolutivos em escala regional. **Megadiversidade** 5:5–16.

Droby S, Wisniewski M, Macarasin D, Wilson C (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? **Postharvest Biology and Technology** 52:137–145.

EFSA (2012) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Candida oleophila* strain O. **European Food Safety Authority Journal** 10:2944.

Ferraz LP, Cunha T, da Silva AC, Kupper KC (2016) Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. **Microbiology Research**. 188–189:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>

Feng L, Wu F, Li J, Jiang Y, Duan X (2011) Antifungal activities of Polyhexamethylene biguanide and Polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Postharvest Biology and Technology** 61:160–164.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ (2005) Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cirurgica Brasileira** 20:28-34. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502005000800008>.

Freire, TB, (2017). **Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia da nanoemulsão com cafeína com ação na HDLG**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fischer, IH, Lourenço, SA, Amorim, L (2008). Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, 33(3), 219-226. <https://dx.doi.org/10.1590/S1982-56762008000300007>

Fundecitrus (Ed.) (2018) **Levantamento da incidência das doenças dos citros: Greening, CVC e cancro cítrico**. Araraquara: Fundecitrus, 57 p.

Fungaro, MHP, (2000). PCR na Micologia. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.14, p. 12-16.

Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira GM, Duarte RM, Rehder VL, Duarte MC, Höfling JF (2011) Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine** 2011:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/985832>.

García L, Gleiby M, Oca N, Hidalgo L (2004) Estudio de la irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. **Toxicological Reviews** 21:103–107.

Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinooor A (2001) Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Biological Control** 91:621-627.

Hall T (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. **Gerf Bulletin of Biosciences** 1:60-61.

Hershenhorn J, Dori S, Barash I (1992) Association of *Geotrichum citri-aurantii* with citrus groves in Israel. **Phytoparasitica** 20:31-36.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola** (2018). Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>> Acessos em 07/01/2019.

Ismail M, Zhang J (2004) Postharvest citrus diseases and their control. **Outlooks on pest management** 15:29-35.

Jijakli, MH, Lepoivre, P (1998) Characterization of an Exo- $\beta$ -1,3-Glucanase Produced by *Pichia anomala* Strain K, Antagonist of *Botrytis cinerea* on Apples. **Phytopathology** 88:335-343. <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.1998.88.4.335>.

Kellerman M, Liebenberget E, Njombolwana N, Erasmus A, Fourie PH (2018) Postharvest dip, drench and wax coating application of pyrimethanil on citrus fruit: Residue loading and green mould control. **Crop Protection** 103:115-129.

Kitagawa H, Kawada K (1984) Effect of sorbic acid and potassium sorbate on the control of sour rot of citrus fruits. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society** 97:133-135.

Klein MN, Kupper KC (2018) Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. **Food Microbiol** 69:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.008>.

Kupper KC, Cervantes ALL, Klein MN, Silva AC (2013) Avaliação de microrganismos antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o controle de *Penicillium digitatum*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 35:425–436.

LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob Agents Chemother**. 50:3839– 3846. <https://doi.org/10.1128/AAC.00684-06>.

Lagarto A, Vega R, Guerra I, González R (2006) *In vitro* quantitative determination of ophthalmic irritancy by the chorioallantoic membrane test with trypan blue staining as alternative to eye irritation test. **Toxicology in Vitro** 20:699-702.

Landell MF, Mautone JN, Valente P (2006) Biodiversity of yeasts associated to bromeliads in Itapuã park. **Biociências** 14:144-149.

Li X, Yan Z, Xu J (2003) Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology Research** 149:353-362. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.25932-0>.

Liu J, Sui Y, Wisniewski M, Xie Z, Liu Y, You Y, Zhang X, Sun Z, Li W, Li Y, Wang Q (2017) The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 58:1681-1687 <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1279122>.

Liu P, Luo L, Long CA (2013) Characterization of competition for nutrients in the biocontrol of *Penicillium italicum* by *Kloeckera apiculata*. **Biological Control**, 67:157-162.

Liu X, Wang LP, Li YC, Li HY, Yu T, Zheng XD (2009) Antifungal activity of thyme oil against *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. **Journal Applied of Microbiology** 107:1450–1456.

Machado, BI (2018). **Controle da podridão azeda em frutos cítricos através de métodos alternativos**. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, Araras.

McKay AH, Foster H, Adaskaveg J (2012) Efficacy and application strategies for propiconazole as a new postharvest fungicide for managing sour rot and green mold of citrus fruit. **Plant Disease** 96:235-242.

Madigan, MT. et al. (2016) **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 1032p

Masih EI, Slezack-Deschaumes S, Marmaras I, Barka EA, Vernet G, Charpentier C, Adholeya A, Paul B (2001) Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. **FEMS Microbiology Letters** 202:227-232.

Michereff SJ, Andrade DEGT, Menezes M (Ed.) (2005) **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 399p.

Morandi MAB, Bettiol W (2009) **Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil**. In: Bettiol W, Morandi MAB. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas (2009) Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente 1:7-14.

Neves MF, Trombin VG, Milan P, Lopes FF, Pereira FC, Kalaki RB (2010) **O retrato da citricultura brasileira**. Editora Marcos Fava Neves. 137p.

Oliveira AGL, Silva RS, Alves EN, Presgrave RF, França OA, Delgado IF (2012) Ensaio da membrana córneo-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** 71:153–159.

Oliveira RP, Ueno B, Cantillano RFF, Mattos MLT, Moreno MB (2013) **Podridão Azeda em Citros**. Pelotas: Embrapa-CNPAP: (Documentos, 418) 32 p.

Pederneiras, LC (2011) **Conceitos básicos de filogenia**. Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo (Curso teórico/prático de atualização em biodiversidade vegetal e meio ambiente) 12p.

Pimenta RS, Silva FL, Silva JFM, Morais PB, Braga DT, Rosa CA, Corrêa A (2008) Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* and *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomyces schoenii* on oranges. **Brazilian Journal of Microbiology**. 39:85–90. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000100020>.

Ravella SR, Quiñones TS, Retter A, Heiermann M, Amon T, Hobbs PJ (2010) Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymeres** 82:728-732.

Romeiro RS (2007) **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV. 269p.

Sampaio FG, Boijink CL, Rantin FT (2013) **O Uso do Sulfato de Cobre em Ecossistemas Aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce**. Jaguariúna: Embrapa: CNPAP (Documentos, 91) 102 p.

Sansone G, Rezza I, Calvente, V, Benuzzi D, Tosetti MIS (2005) Control of *Botrytis cinerea* strains resistente to iprodione in apple with rhodotorulic acid and yeasts. **Phostharvest Biology and Technology** 35:245-251.

Sato K, Makimura K (2008) *Sporobolomyces koalae* sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from nasal smears of Queensland koalas kept in a Japanese zoological park. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 58:2983-2986. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.2008/000307-0>

Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal assay for the detection and determination of siderophores. **Analitycal Biochemistry** 160:47-56.

Scorza Junior RP, Névola FA, Ayelo VS (2010) **Avaliação da Contaminação Hídrica por Agrotóxico**. Dourados: Embrapa: ACHA - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (Documentos, 58) 33 p.

Sipiczki M (2006) *Metschnikowia* Strains Isolated from Botrytized Grapes Antagonize Fungal and Bacterial Growth by Iron Depletion. **Applied and Environmental Microbiology** 72:6716-6724. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01275-06>.

Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, Silva O (1999) The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicology in Vitro**. 13:375–384. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(98\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(98)00091-5).

Sugita C, Makimura K, Murakami A, Murai Y, Yamaguchi H, Nagai A (2003) A case of pulmonary aspergilloma molecular biological identification and typing of the isolates from antemortem sputa and autopsy fungus ball. **Mycoses** 46:149–152.

Talibi I, Karim H, Askarne L, Boubaker H, Boudyach EH (2013) Antifungal activity of aqueous and organic extracts of eight aromatic and medicinal plants against *Geotrichum candidum*, causal agent of citrus sour rot. **International Journal of Agronomy and Plant Production** 4:3510–3521.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL (2017) **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed 964p.

Tuset JJ (2000) Enfermedades durante la conservación. In: Duran-Vila N, Moreno P (Eds.) **Enfermedades de los cítricos**. Madrid: Mundi-Prensa 1:99-104.

Usall J, Teixidó N, Abadias M, Torres R, Cañamas T, Viñas I (2009) Improving formulation of biocontrol agents manipulating production process. In: Prusky D, Gullino ML (Eds) **Postharvest Pathology. Plant Pathology in the 21st century** 2:149-170.

Vinardell M, Mitjans M (2008) Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 97:46-59. <https://doi.org/10.1002/jps.21088>.

Wagner A, Hetman B, Kopacki M, Jamiólkowska A, Krawiec P, Lipa T (2013) Laboratory effect of Boni Protect containing *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnoud in the control of some fungal diseases of apple fruit. **Acta Agrobotanica** 66:77–88.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In **PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications**. Edited by New York: Academic Press 1:315–322.

Wiyono S, Schulz DF, Wolf GA (2008) Improvement of the formulation and antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* B5 through selective additives in the pelleting process. **Biological Control** 46:348-357.

Yang Y et al. (1991) **Procedure for Application of Eye Irritation Alternative Methods on Cosmetic Ingredients**, ALTEX 139–143.

Yurlova NA, Mokrousov IV, De Hoog GS (1995) Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. **Antonie van Leeuwenhoek** 68:57–63.

Zhou H, Tao N, Jia L (2014) Antifungal activity of citral, octanal and  $\alpha$ -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control** 37:277-283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.057>.

Zimmer GF, Müller MVG, Corbellini VA (2013) Avaliação de fontes de carbono para a produção de inibidor de crescimento de *Aspergillus fumigatus* USP2 por *Corynebacterium* sp. **Revista Jovens Pesquisadores**, 3:144-155.

Zucchi TD, Melo IS (2009) **Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos**. In: Bettiol W, Morandi MAB (Ed.). Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa, Cap. 5:63-78.