

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2 SOBRE OS
PATÓGENOS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 E *CANDIDA GLABRATA*
ATCC 2001

LUCÉLIA ALVES PAIXÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2026

ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2 SOBRE OS
PATÓGENOS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 E *CANDIDA GLABRATA*
ATCC 2001

LUCÉLIA ALVES PAIXÃO

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Orientadora: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins

Coorientadora: Prof^a. Larissa Pacheco Ferreira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2026


ATIVIDADE ANTAGÔNICA DE *BACILLUS LICHENIFORMIS* SMIA-2 SOBRE OS
PATÓGENOS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 E *CANDIDA GLABRATA*
ATCC 2001

LUCÉLIA ALVES PAIXÃO


“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal”

Aprovada em 25 de fevereiro de 2026


Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **JOAO BATISTA BARBOSA**
Data: 11/05/2026 10:22:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. João Batista Barbosa – (D.Sc., Produção Vegetal) - IFS

Documento assinado digitalmente
 **LARISSA LEANDRO DA CRUZ**
Data: 10/05/2026 22:11:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Larissa Leandro da Cruz – (D.Sc., Produção Vegetal) - ACNC/UAMS/USDA-ARS

Documento assinado digitalmente
 **ERICA CRUZ**
Data: 12/05/2026 19:17:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Erica Cruz (Pós-doutoranda em Ciências de Alimentos/USP) – USP

Documento assinado digitalmente
 **MEIRE LELIS LEAL MARTINS**
Data: 09/05/2026 20:26:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Molecular Biology and Biotechnology) - UENF
(Orientadora)

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P149

Paixão, Lucélia Alves.

Atividade antagônica de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 sobre os patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida glabrata* ATCC 2001 / Lucélia Alves Paixão. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2026.

66 f. : il.

Bibliografia: 42 - 66.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2026.
Orientadora: Meire Lelis Leal Martins.

1. *Bacillus licheniformis*. 2. *Candida glabrata*. 3. Antagonismo microbiano. 4. Metabólitos extracelulares. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

DEDICATÓRIA

A Deus,
À minha mãe Célia que foi o meu conforto nos dias de luta,
Ao meu pai Luciano,
À minha fiel companhia de todas as horas de escrita e suporte
emocional e suporte de vida, Stella (*in memoriam*),
Aos meus afilhados e sobrinhos: Keyrrison, Luan, Lara,
Bárbara, Sophia, Noah, Lorenzo e Valentina,
Às minhas amigas Maria Eduarda Sales (*in memoriam*),
Jheissy Kelly, Fernanda Barreto e Yanna Almeida, que foram
incentivo permanente e motivação em cada conquista que me
conduziu até aqui.
Dedico com carinho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, e a Nossa Senhora Aparecida por mostrarme o caminho certo e por serem a verdadeira direção da minha vida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e a CAPES pela concessão de fomento;

À Prof^ª. Meire Lelis Leal Martins e à Prof^ª. Larissa Pacheco Ferreira pela orientação, profissionalismo, incentivo, paciência, confiança e apoio durante o curso;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Larissa Leandro da Cruz, Érica Cruz e João Batista Barbosa por terem aceitado contribuir com este trabalho;

Aos meus Colegas de Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Jéssica Scoton, Maria Geovana, Ariel Gonçalves, Lais Modesto, Pedro Carvalho, Daniel dos Santos, obrigada pela imensa ajuda, e pela amizade, pela parceria e pelas inúmeras gargalhadas.

Sou grata aos meus amigos e familiares que entenderam que para se conquistar sonhos, tive que me afastar das reuniões, das festas, do convívio ativo, das horas vagas e mesmo assim não desistiram de mim!

A todos os funcionários da UENF, CCTA, Hospital Veterinário e do LTA, pela disponibilidade em sempre nos atender bem e pela gentileza;

A Ana Paes (Aninha) e a Valdineia que foram verdadeiras mães que me abraçaram e me acolheram com tanto carinho e afeto, fortalecendo minha fé, minha paz em muitos momentos ouvindo Frei Gilson enquanto fazia os experimentos;

À minha mãe e ao meu pai pelo imenso incentivo, valores éticos, respeito e amor que sempre me foi ensinado e dedicado. Agradeço por acreditarem em mim!

À minha cachorrinha, fiel escudeira nas horas de estresse e ausência, Stella (*in memorian*), obrigada por me acalmar, me amar incondicionalmente e lembrar de me levar para passear após tantas horas de dedicação. Meu Coração será sempre seu filha;

Aos meus afilhados e sobrinhos: Keyrrison, Luan, Lara, Bárbara, Sophia, Valentina, Noah, e Lorenzo, que algum dia vocês possam compreender que toda minha ausência foi em prol de uma busca por um bem maior, uma pesquisa com o intuito de melhorar a sociedade e a vida das pessoas. Tentei fazer de mim exemplo

para conduzi-los através do caminho do Senhor e do estudo! Que a “Dinda”, a “tia Lu doidona” possa ser sempre um exemplo a ser seguido de persistência, luta e resiliência!

Às minhas amigas, Fernanda Barreto, Yanna Almeida e Jheissy Kelly, que foram incentivo permanente e motivação em cada conquista que me conduziu até aqui, vocês foram alicerce mesmo a distância! Obrigada por tudo!

Ao Constantino por entender as muitas angústias e ansiedade neste percurso com sabedoria e paciência!

A Jessica Ferreira e André Borges, pela sensibilidade, acolhimento e apoio nos momentos em que eu buscava apenas uma saída. Aprendi que, para muitos, são necessárias portas abertas; para mim, bastou encontrar um “buraco de fechadura” para seguir em frente e transformar fragilidades em força e resiliência;

A Maria Eduarda (*in memoriam*). A saudade amiga faz morada no meu peito, mas sigo determinada a fazer este trabalho e sempre seguir em frente, pois sei que sempre estará comigo! Será sempre por mim, por você e por nós!

Ao Laboratório de Sanidade Animal - LSA (Setor de Bacteriologia Veterinária), Laboratório de Biologia do Reconhecer – LBR, e a todo o Centro de Ciências e Tecnologias Agrícolas – CCTA, e aos colaboradores Gina, Rita, Fernando, Rivia, muito obrigada pelo auxílio para que este trabalho pudesse ser realizado!

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos! A cada dia vocês eternizaram luz e sopro divino em minha vida!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1. O gênero <i>Bacillus</i> e seu potencial biotecnológico.....	5
3.2. Produção de compostos antimicrobianos por bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	7
3.3. <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA – 2.....	9
3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	10
3.5. <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001.....	11
3.6. Mecanismos da atividade antimicrobiana.....	13
3.7. Atividade antimicrobiana por competição celular direta.....	14
3.8. Atividade antimicrobiana por compostos extracelulares.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Microrganismos.....	17
4.1.1. <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA – 2.....	17
4.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	18
4.1.3. <i>Candida glabrata</i> ATCC 2001.....	18
4.2. Meios de crescimento.....	18
4.2.1. Meio BHI - Caldo Brain Heart Infusion.....	18
4.2.2. Meio TSY.....	19
4.2.3. Meio Baird Parker.....	19
4.2.4. Meio mineral suplementado com subprodutos agroindustriais I.....	19
4.2.5. Meio mineral suplementado com subprodutos agroindustriais II.....	19
4.3. Preparo dos inóculos e condições de crescimento das culturas.....	19

4.4. Determinação do crescimento do <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 e <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.5. Determinação da atividade antagonista do <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 contra <i>Staphylococcus aureus</i> e da <i>Candida glabrata</i>	20
4.6. Influência de diferentes meios de crescimento sobre a atividade antagonista do <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 contra <i>Staphylococcus aureus</i>	21
4.7. Atividade antagonista de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 cultivado em co-culturas de <i>S. aureus</i>	22
4.8. Atividade antagonista de extratos livres de células de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 contra <i>S. aureus</i>	24
4.9. Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. Atividade antagonista de culturas de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 em meio BHI sobre o <i>Staphylococcus aureus</i>	25
5.2. Atividade antagonista de culturas de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 contendo farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho contra o <i>S. aureus</i>	29
5.3. Atividade antagonista de culturas submersas de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 contendo os substratos amido solúvel, proteínas do soro de leite e água de maceração de milho contra <i>S. aureus</i>	33
5.4. Atividade antagonista de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 cultivado em culturas submersas contendo BHI na presença de <i>S. aureus</i>	34
5.5. Atividade antagonista de filtrados de culturas submersas de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 sobre <i>S. aureus</i>	37
5.6. Atividade antagonista de culturas de <i>B. licheniformis</i> SMIA-2 contendo farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho contra <i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)	39
6. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Potenciais biotecnológicos do gênero <i>Bacillus</i>	5
Tabela 2: Cepas de <i>Bacillus</i> e suas enzimas produzidas e aplicações industriais.....	6
Tabela 3. Atividade antimicrobiana ou antagonista do <i>Bacillus</i>	8

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de atividade antimicrobiana em competição celular direta e compostos extracelulares difusíveis	17
Figura 2 – Etapas experimentais de preparo dos inóculos, crescimento microbiano e avaliação da atividade antagonista	18
Figura 3: Determinação da atividade antagonista de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 frente a <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida glabrata</i> por ensaio de difusão em ágar...21	
Figura 4: Influência de diferentes meios de crescimento sobre a atividade antagonista do <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 contra <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 5: Avaliação da atividade antagonista de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 em co-cultura com <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Figura 6: Avaliação da atividade antagonista de extratos livres de células de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 7: Halos de inibição do <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) previamente cultivado em meio TSY (a) e em meio Ágar Sangue (b).	26
Figura 8: Atividade antagonista de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) em culturas submersas em meio BHI, incubadas a 50 °C e 150 rpm. Crescimento (DO ₆₀₀ nm) expresso como média ± desvio padrão e variação do pH ao longo do tempo. Imagens representativas dos halos de inibição observados em placas de Petri após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.....	28
Figura 9: Atividade antagonista de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 cultivado em meio contendo farinha da casca de maracujá (0,3%, p/v) e água de maceração de milho (0,3%, p/v), a 50 °C e 150 rpm. Crescimento (DO ₆₀₀ nm) e variação do pH ao longo de 72 h.....	31
Figura 10: Imagens representativas dos halos de inibição sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) após 6, 24, 36, 48, 54 e 72h de incubação em placas de Petri.....	32
Figura 11: Atividade antagonista de culturas submersas de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 contendo 0,5% (p/v) de amido solúvel, (0,3%, p/v) de água de maceração de milho e 0,1%, (p/v) de proteínas do soro a 50 °C e 150 rpm por 24 horas, 36 horas e 48 horas de incubação.....	34
Figura 12: Crescimento microbiano e dinâmica de co-cultura entre <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 e <i>Staphylococcus aureus</i> . (c) Crescimento de <i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2 em culturas submersas em meio BHI, por 5 horas, a 37 °C e 150 rpm.....	36

Figura 13: Crescimento microbiano e dinâmica de co-cultura entre *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus*. (d) Crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio BHI nas mesmas condições..... 36

Figura 14: Crescimento microbiano e dinâmica de co-cultura entre *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus*. (e) Recuperação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em co-cultura com *Bacillus licheniformis* SMIA-2 após 3,5 horas de incubação. Os dados foram expressos como \log_{10} UFC mL⁻¹ (média \pm desvio padrão, n = 3). 37

Figura 15: Imagens dos halos de inibição do *B. licheniformis* SMIA-2 sobre *S. aureus*: Controle (poço sem caldo do SMIA-2; Poço com adição de culturas do SMIA-2 contendo BHI; Poço com caldo filtrado de culturas do SMIA-2 (Sem células do SMIA-2). 38

Figura 16: Halos de inibição do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 sobre *Candida glabrata* (ATCC 2001) cultivados em meio TSY. 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – American Type Culture Collection
- BDA – Batata Dextrose Ágar
- BHI – Brain Heart Infusion
- CDI – Contact-Dependent Inhibition (Inibição Dependente de Contato)
- CFU – Colony Forming Units
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DO – Densidade Óptica
- DO₆₀₀ – Densidade óptica medida a 600 nm
- DDBJ – DNA Data Bank of Japan
- ENA – European Nucleotide Archive
- FCM – Farinha da Casca de Maracujá
- HPLC – High Performance Liquid Chromatography
- LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
- log₁₀ – Logaritmo decimal
- LTA – Laboratório de Tecnologia de Alimentos
- MRSA – Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus
- NRPs – Peptídeos Não Ribossomais (Non-Ribosomal Peptides)
- OD – Optical Density
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico

p/v – Peso por volume

RNA – Ácido ribonucleico

RiPPs – Peptídeos sintetizados ribossomicamente e modificados pós-tradução
(Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides)

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. aureus ATCC 25923 – *Staphylococcus aureus*, cepa padrão ATCC 25923

SMIA-2 – *Bacillus licheniformis* SMIA-2

TSY – Triptona, NaCl e Extrato de Levedura

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UFC – Unidade Formadora de Colônia

× g – Força centrífuga relativa

RESUMO

PAIXÃO, Lucélia Alves; Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2026. Atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 sobre os patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida glabrata* ATCC 2001. Orientadora: Prof^a: Dra. Meire Lelis Leal Martins. Coorientadora: Prof^a: Dr^a. Larissa Pacheco Ferreira.

A crescente disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos tem impulsionado a busca por novas fontes de compostos bioativos capazes de atuar no controle de patógenos de relevância clínica. Nesse contexto, microrganismos do gênero *Bacillus* têm sido amplamente investigados devido à sua capacidade de produzir metabólitos secundários com propriedades antibacterianas. A cepa *Bacillus licheniformis* SMIA-2, isolada do solo da região de Campos dos Goytacazes (RJ), destaca-se por seu potencial biotecnológico e pela produção de enzimas e metabólitos extracelulares. O presente estudo avaliou a atividade antagonista dessa cepa frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida glabrata* ATCC 2001, utilizando diferentes abordagens experimentais, incluindo ensaios de difusão em ágar, sistemas de co-cultura e testes com filtrados livres de células. Um aspecto relevante deste trabalho foi a avaliação da atividade antagonista em temperatura de cultivo de 37 °C, condição inferior àquela frequentemente utilizada para bactérias termofílicas do gênero *Bacillus*, geralmente estudadas em temperaturas próximas a 50 °C. Mesmo sob essa condição considerada subótima, foram observados halos de inibição consistentes contra *S. aureus*, indicando a produção de metabólitos extracelulares capazes de interferir no crescimento bacteriano. A atividade antagonista também foi confirmada em ensaios de co-cultura e em filtrados livres de células, evidenciando que compostos difusíveis produzidos pelo SMIA-2 estão envolvidos no antagonismo observado. Além disso, foi observada inibição do crescimento de *Candida glabrata*, ampliando o espectro do antagonismo para microrganismos de relevância clínica pertencentes a diferentes grupos taxonômicos. Os resultados obtidos indicam que *Bacillus licheniformis* SMIA-2 representa uma fonte promissora de metabólitos extracelulares bioativos e reforçam seu potencial para estudos de prospecção biotecnológica. Investigações futuras envolvendo processos de concentração, purificação e caracterização química dos compostos produzidos serão fundamentais para elucidar os mecanismos envolvidos no antagonismo observado e ampliar o conhecimento sobre o potencial dessa cepa.

Palavras-chave: *Bacillus licheniformis*; *Candida glabrata*; antagonismo microbiano; metabólitos extracelulares; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

PAIXÃO, Lucélia Alves. Plant Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2026. Antagonistic Activity of *Bacillus licheniformis* SMIA-2 Against the Pathogens *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida glabrata* ATCC 2001. Advisor: Prof. Meire Lelis Leal Martins. Co-advisor: Dr. Larissa Pacheco Ferreira.

The increasing spread of antimicrobial-resistant microorganisms has intensified the search for new sources of bioactive compounds capable of controlling clinically relevant pathogens. In this context, microorganisms of the genus *Bacillus* have been widely investigated due to their ability to produce secondary metabolites with antibacterial properties. The strain *Bacillus licheniformis* SMIA-2, isolated from soil in Campos dos Goytacazes (RJ, Brazil), stands out for its biotechnological potential and production of extracellular enzymes and metabolites. This study evaluated the antagonistic activity of this strain against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Candida glabrata* ATCC 2001 using different experimental approaches, including agar diffusion assays, co-culture systems, and cell-free filtrates. A relevant aspect of this work was the evaluation of antagonistic activity at 37 °C, a temperature lower than that commonly used for thermophilic *Bacillus* species. Even under this suboptimal condition, consistent inhibition halos were observed against *S. aureus*, indicating the production of extracellular metabolites capable of interfering with bacterial growth. The antagonistic activity was also confirmed in co-culture assays and cell-free filtrates, demonstrating that diffusible compounds produced by SMIA-2 are involved in the observed inhibition. In addition, inhibition of *Candida glabrata* growth was observed, expanding the antimicrobial spectrum to clinically relevant microorganisms from different taxonomic groups. These results indicate that *Bacillus licheniformis* SMIA-2 represents a promising source of bioactive extracellular metabolites and reinforce its potential for biotechnological prospecting. Future studies involving concentration, purification, and chemical characterization of the produced compounds will be essential to elucidate the mechanisms underlying the observed antagonism and to expand the knowledge of this strain's biotechnological potential.

Keywords: *Bacillus licheniformis*; microbial antagonism; extracellular metabolites; *Staphylococcus aureus*; *Candida glabrata*.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Bacillus* é amplamente estudado devido ao seu potencial biotecnológico, especialmente em função de sua capacidade de produzir enzimas termoestáveis e diversos compostos bioativos. Entre as espécies desse gênero, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* têm se destacado pela produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e pela aplicação em diferentes setores industriais e biotecnológicos (SONKAR *et al.*, 2019; PIERRO *et al.*, 2024). Espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas por sintetizar uma ampla variedade de metabólitos bioativos, incluindo bacteriocinas, lipopeptídeos cíclicos e outros peptídeos antimicrobianos, os quais podem exercer efeitos inibitórios sobre microrganismos competidores em diferentes ambientes naturais (ABRIOUEL *et al.*, 2011; MARKELOVA; CHUMAK, 2025).

Desse modo, o antagonismo microbiano pode ser definido como a capacidade de um microrganismo inibir o crescimento ou a atividade metabólica de outro por meio de diferentes mecanismos, como a produção de metabólitos antimicrobianos, a competição por nutrientes e espaço ou a modificação das condições ambientais. Esse fenômeno representa uma estratégia ecológica utilizada por diversas bactérias para garantir vantagem competitiva em seus nichos ecológicos. Entre os compostos frequentemente associados a esse processo destacam-se os lipopeptídeos cíclicos produzidos por espécies de *Bacillus*, como surfactinas, iturinas e fengicinas, conhecidos por sua capacidade de interferir na integridade das membranas celulares de microrganismos sensíveis e atuar nas interações microbianas em diferentes ambientes (KASPAR; NEUBAUER; GIMPEL, 2019; MARKELOVA; CHUMAK, 2025).

A cepa *Bacillus sp.* SMIA-2, posteriormente identificada como *Bacillus licheniformis* SMIA-2 por Bernardo *et al.* (2020), foi isolada do solo da região Norte Fluminense em Campos dos Goytacazes por Souza e Martins (2001) e tem sido investigada devido ao seu potencial biotecnológico, especialmente na produção de enzimas extracelulares termoestáveis de interesse industrial. Análises genômicas dessa cepa demonstraram a presença de genes associados à biossíntese de diversas enzimas hidrolíticas, incluindo amilases, proteases, celulasas e xilanasas, além de clusters gênicos relacionados à produção de compostos bioativos com potencial atividade antimicrobiana, como fengicinas, liquenicidina, liquenicina e diferentes bacteriocinas (BERNARDO *et al.*, 2020; CRUZ *et al.*, 2021). Esses metabólitos

secundários estão frequentemente associados às interações antagonistas entre microrganismos e podem desempenhar papel relevante na competição microbiana e na colonização de ambientes naturais (ABRIOUEL *et al.*, 2011).

Paralelamente, a crescente disseminação de patógenos resistentes a múltiplos antimicrobianos tem representado um desafio significativo para a saúde pública global. Entre esses patógenos destaca-se *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva frequentemente associada a infecções hospitalares e comunitárias, capaz de colonizar diferentes tecidos humanos e apresentar elevada adaptabilidade fisiológica e genética (MISSIAKAS; SCHNEEWIND, 2013). A emergência de cepas resistentes à meticilina (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA), aliada à capacidade desse microrganismo de formar biofilmes e apresentar resistência a múltiplas classes de antibióticos, dificulta o tratamento de infecções e reforça a necessidade de novas estratégias terapêuticas (AL-KHAMIS *et al.*, 2025).

Além das infecções bacterianas, as infecções fúngicas invasivas também constituem um problema crescente em ambientes clínicos. Nesse cenário, *Candida glabrata* tem emergido como um importante agente etiológico de candidíase sistêmica e mucosa, particularmente em pacientes imunocomprometidos ou submetidos a tratamentos prolongados com antimicrobianos. Essa espécie apresenta elevada capacidade adaptativa e resistência intrínseca ou adquirida a diferentes classes de antifúngicos, incluindo azóis e equinocandinas, o que limita as opções terapêuticas disponíveis e está associado a desfechos clínicos desfavoráveis (FRÍAS-DE-LEÓN *et al.*, 2021).

Diante desse cenário, microrganismos produtores de metabólitos antimicrobianos naturais têm despertado interesse crescente como fonte potencial de novos agentes terapêuticos. Espécies do gênero *Bacillus* são particularmente relevantes nesse contexto, pois produzem diversos metabólitos secundários com atividade biológica, capazes de atuar como moléculas antimicrobianas ou moduladoras de interações microbianas (ABRIOUEL *et al.*, 2011; KASPAR; NEUBAUER; GIMPEL, 2019).

Apesar do potencial biotecnológico já descrito para *Bacillus licheniformis* SMIA-2, a maioria dos estudos relacionados a essa cepa tem sido direcionada principalmente à produção de enzimas termoestáveis e aplicações industriais. Embora alguns trabalhos tenham demonstrado atividade antimicrobiana dessa bactéria contra determinados microrganismos indicadores, ainda são limitadas as investigações que

exploram de forma sistemática seu potencial antagonista frente a patógenos de relevância clínica, como *Staphylococcus aureus* e *Candida glabrata*. Dessa forma, permanece uma lacuna no conhecimento acerca dos mecanismos e da extensão da atividade antimicrobiana dessa cepa, o que reforça a necessidade de estudos adicionais sobre seu potencial como fonte de compostos bioativos.

Nesse contexto, a avaliação experimental da atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 pode contribuir para a compreensão de seus mecanismos de interação microbiana e para a identificação de metabólitos com potencial aplicação biotecnológica e farmacêutica. Para isso, diferentes abordagens experimentais podem ser utilizadas, incluindo ensaios de antagonismo por difusão em ágar, experimentos de co-cultura entre microrganismos e testes utilizando sobrenadantes livres de células, permitindo avaliar tanto interações dependentes de contato quanto a ação de compostos difusíveis produzidos pela bactéria.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 frente aos patógenos *Staphylococcus aureus* e *Candida glabrata*, utilizando diferentes abordagens experimentais para investigar a capacidade dessa cepa de produzir compostos antimicrobianos e inibir o crescimento desses microrganismos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida glabrata* ATCC 2001, por meio de diferentes abordagens experimentais, demonstrando a capacidade da cepa de inibir o crescimento desses microrganismos e de produzir metabólitos extracelulares com atividade antimicrobiana.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar a influência de diferentes meios de cultivo, incluindo meios convencionais e meios alternativos contendo subprodutos agroindustriais, sobre a atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, por meio de ensaios de difusão em ágar e observação da formação de halos de inibição;
- b) Investigar o antagonismo em sistemas de co-cultura, analisando a interação entre *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 durante o crescimento simultâneo das culturas e a possível ocorrência de competição ecológica e produção de metabólitos inibitórios;
- c) Avaliar a atividade antagonista de filtrados livres de células provenientes da cultura de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a fim de verificar a presença de metabólitos extracelulares difusíveis responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano;
- d) Determinar a capacidade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 frente a levedura *Candida glabrata* ATCC 2001, ampliando a avaliação do espectro de antagonismo da cepa para microrganismos de relevância clínica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O gênero *Bacillus* e seu potencial biotecnológico

O gênero *Bacillus* são notavelmente diversos e, de acordo com fontes científicas e a literatura atual, existem mais de 200 espécies que foram descritas até o momento, porém, a classificação e número exato de espécies podem variar devido à constante evolução dos métodos de análise molecular e genômica, que frequentemente resultam na revisão e reclassificação de espécies dentro do gênero BERGEY, D. H. & HOLT, J. G. (2000).

Os *Bacillus* apresentam um vasto potencial biotecnológico devido à sua capacidade de produzir compostos bioativos, sua adaptabilidade a condições extremas, e suas aplicações em agricultura e biocontrole. A exploração contínua de suas capacidades genéticas e metabólicas pode levar a inovações significativas em biotecnologia industrial e ambiental, YIN, YING E ZHOU (2023).

Tabela 1: Potenciais biotecnológicos do gênero *Bacillus*

Composto Biotecnológico	Espécies Produtoras	Função	Aplicações Industriais	Referências Atualizadas
Peptídeos Antimicrobianos (AMPs)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Inibição de Patógenos	Alimentos, Saúde	Oliveira Júnior et al., 2025; Wei et al., 2024 (Nature)
Lipopeptídeos (fengicina, surfactina, etc.)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Ação Antibacteriana/Antifúngica	Indústria de Alimentos e Farmacêutica	Chen et al., 2025; Ghanipour et al., 2023; Hosseini Bafghi et al., 2024 (PubMed)
Bacteriocinas	<i>Bacillus licheniformis</i>	Inibição de bactérias Gram-positivas	Biocontrole, conservantes	Shleeva et al., 2023 (MDPI)
Proteases	<i>Bacillus</i> spp.	Degradação de proteínas	Detergentes, alimentos	Tikhomirova et al., 2026; Kumar et al., 2024
Amilases	<i>Bacillus</i> spp.	Hidrólise de amido	Alimentos, têxteis	Tikhomirova et al., 2026; Wang et al., 2024 (PubMed)
Xilanases	<i>Bacillus</i> spp.	Hidrólise de xilana	Indústria de alimentos	Singh et al., 2024; Aguiar et al., 2023 (MDPI)
Celulases	<i>Bacillus</i> spp.	Hidrólise de celulose	Biocombustíveis, papel	Singh et al., 2024 (MDPI)
Pectinases	<i>Bacillus</i> spp.	Degradação de pectina	Sucos e vinhos	Singh et al., 2024 (MDPI)

Tabela 2: Cepas de *Bacillus* e suas enzimas produzidas e aplicações industriais

Estirpe de <i>Bacillus</i>	Enzimas produzidas	Principais aplicações	Referências atualizadas
<i>Bacillus subtilis</i>	Amilase, protease (subtilisina), celulase, pectinase, lipase	Detergentes, alimentos, têxteis, indústria farmacêutica, probióticos	Caulier et al., 2019; Fan et al., 2022; Zhang et al., 2023
<i>Bacillus licheniformis</i>	Amilase, protease alcalina, lipase, celulase	Detergentes, laticínios, indústrias alimentícia e de tratamento de resíduos	Rey et al., 2021; Madigan et al., 2021; Li et al., 2024
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amilase, protease, celulase, xilanase	Fermentação, panificação, biorremediação	Chen et al., 2022; Liu et al., 2023
<i>Bacillus pumilus</i>	Protease, amilase, celulase	Indústrias de couro, alimentos e papel	Singh et al., 2021; Kumar et al., 2022
<i>Bacillus cereus</i>	Amilase, protease, lipase, lecitinase	Uso restrito devido ao potencial patogênico	Stenfors Arnesen et al., 2020; Madigan et al., 2021
<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	Amilase, protease, celulase, xilanase, pectinase	Produção de enzimas termoestáveis, detergentes, degradação de resíduos	Bernardo et al., 2020; Nery et al., 2023
<i>Bacillus caldoxylolyticus</i>	Celulase, amilase, xilanase	Aplicações industriais em altas temperaturas (termofílicas)	Srivastava et al., 2021; Patel et al., 2022

Os *Bacillus* são reconhecidos por sua versatilidade metabólica, o que permite a utilização de diversos substratos como fonte de carbono, consolidando seu papel estratégico em setores como alimentação, farmacêutico, biocombustíveis e controle biológico (MURRAY *et al.*, 2015; PIERRO *et al.*, 2024).

Dentre as espécies mais relevantes, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* destacam-se pela produção de enzimas e metabólitos, como proteases, amilases e compostos antimicrobianos, essenciais para processos industriais (PIERRO *et al.*, 2024; MURAS *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2013).

Bacillus subtilis, por exemplo, possui uma adaptação evolutiva notável: a capacidade de formar esporos. Essas estruturas, protegidas por uma camada proteica resistente, entram em estado de dormência em condições ambientais adversas, como escassez de nutrientes, temperaturas extremas ou exposição a solventes químicos. A estabilidade dos esporos facilita seu armazenamento e transporte, tornando-os ferramentas ideais para aplicações biotecnológicas, como probióticos, bioinsumos agrícolas e sistemas de entrega de enzimas (DE SOUZA *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2018; CRUZ, 2021).

O *Bacillus licheniformis* destaca-se pela capacidade de secreção extracelular de enzimas, crescimento rápido, esporulação e estabilidade em processos industriais, bem como pela produção de enzimas termoestáveis, como proteases e amilases, que mantêm atividade mesmo sob temperaturas elevadas e variações de pH. Essas características são críticas para processos industriais que demandam eficiência

enzimática, como a produção de xaropes de glicose, biocombustíveis e detergentes (DANILOVA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2023; ALI *et al.*, 2024). Estudos recentes demonstram que a otimização das condições de cultivo, como pH, temperatura e fontes de carbono, pode aumentar significativamente a produção dessas enzimas, além de estimular a síntese de compostos bioativos com potencial farmacêutico (LIU *et al.*, 2025; ZHANG *et al.*, 2023).

3.2. Produção de compostos antimicrobianos por bactérias do gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* se destaca pela sua capacidade de produção de compostos antimicrobianos, como a bacitracina, amplamente utilizada na medicina e na agroindústria para interferir na síntese da parede celular bacteriana (XIE *et al.*, 2024; BERNARDO *et al.*, 2020). Além da bacitracina, *Bacillus* também produz lipopeptídeos, poliquetídeos e peptídeos antimicrobianos, que demonstram eficácia contra uma ampla variedade de patógenos, sendo especialmente relevantes frente a microrganismos resistentes a antibióticos (MURAS *et al.*, 2021; GIRI *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2025; BERNARDO *et al.*, 2020).

Dentre os lipopeptídeos, destacam-se as fengicinas, iturinas e surfactinas, conhecidas por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antiadesivas (LIN *et al.*, 2020). A produção desses compostos é regulada por mecanismos genéticos e metabólicos que permitem que as espécies de *Bacillus* se adaptem a diferentes condições ambientais e compitam eficientemente com outros microrganismos (CHEUNG *et al.*, 2021).

O potencial de *Bacillus* na agricultura e na indústria de alimentos tem sido amplamente explorado, especialmente em sistemas de biocontrole, nos quais seus compostos antimicrobianos inibem o crescimento de patógenos de plantas e microrganismos deteriorantes, promovendo a segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola (GONZÁLEZ-LEÓN *et al.*, 2024; PIERRO *et al.*, 2024). Além dos antimicrobianos, *Bacillus* também é uma importante fonte de enzimas industriais.

A protease de *Bacillus subtilis*, por exemplo, destaca-se na indústria de detergentes devido à sua resistência a condições extremas de pH e temperatura (SILVA *et al.*, 2024; RIGO *et al.*, 2021; FERREIRA *et al.*, 2021). Já a alfa-amilase dessa

espécie tem ampla aplicação na produção de xarope de glicose, etanol e na panificação (CRUZ *et al.*, 2025; PIERRO *et al.*, 2024). Um estudo de Romo-Barrera *et al.* (2021) comparou as propriedades probióticas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, evidenciando seu potencial na saúde intestinal e em estratégias terapêuticas. Além disso, diversas cepas de *Bacillus* produzem enzimas com atividade antimicrobiana, como proteases e celulases, que não apenas favorecem processos industriais, mas também ampliam o espectro de atuação dos compostos antimicrobianos naturais. Isso se torna útil para aplicações em bioprocessos industriais, bem como no desenvolvimento de produtos alimentícios e farmacêuticos (PIERRO *et al.*, 2024).

A atividade antagonista observada neste estudo para *Bacillus licheniformis* SMIA-2 está de acordo com resultados reportados na literatura, nos quais espécies do gênero *Bacillus* apresentam capacidade de inibir patógenos bacterianos e fúngicos por meio da produção de metabólitos antimicrobianos extracelulares (MURAS *et al.*, 2021; BERNARDO *et al.*, 2020). Ensaio utilizando sobrenadantes livres de células demonstram que a inibição pode ocorrer mesmo na ausência de células viáveis, indicando que compostos como bacteriocinas e lipopeptídeos estão envolvidos no processo de antagonismo (LIN *et al.*, 2020). Além disso, estudos demonstram que esses metabólitos podem atuar na desestabilização da membrana celular de microrganismos sensíveis, resultando na inibição do crescimento microbiano (KASPAR; NEUBAUER; GIMPEL, 2019).

Tabela 3: Atividade antimicrobiana ou antagonista do *Bacillus*

Espécie / Cepa de <i>Bacillus</i>	Patógeno testado	Método utilizado	Resultado observado	Possível mecanismo	Referência
<i>Bacillus licheniformis</i> SMIA-2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Difusão em ágar por poço	Formação de halo de inibição e redução do crescimento bacteriano	Metabólitos extracelulares e bacteriocinas	Estudo do trabalho avaliado
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sobrenadante livre de células	Inibição significativa do crescimento	Compostos antimicrobianos secretados	Ghanipour <i>et al.</i> , 2023
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bactérias Gram-positivas	Difusão em em ágar	Halo de inibição associado a lipopeptídeos	Lichenisina e bacteriocinas	Muras <i>et al.</i> , 2021
<i>Bacillus subtilis</i>	Bactérias patogênicas	Difusão em em ágar	Inibição microbiana com halos evidentes	Surfactina e outros lipopeptídeos	Caulier <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Fungos patogênicos	Ensaio de antagonismo <i>in vitro</i>	Forte atividade antifúngica	Iturina e fengicina	Fan <i>et al.</i> , 2023
<i>Bacillus</i> spp.	<i>Candida glabrata</i> e outras <i>Candida</i>	Difusão em ágar / metabólitos purificados	Inibição do crescimento fúngico	Lipopeptídeos antifúngicos	Ongena & Jacques, 2023

3.3. *Bacillus licheniformis* SMIA – 2

A cepa *Bacillus licheniformis* SMIA-2, isolada no solo do município de Campos dos Goytacazes (RJ), destaca-se por características genéticas e metabólicas únicas que a diferenciam de outras espécies do gênero *Bacillus*. Seu isolamento foi realizado por meio de técnicas microbiológicas clássicas, incluindo cultivo seletivo e análises morfológicas e bioquímicas preliminares, conforme descrito por Cruz *et al.* (2024) e Bernardo *et al.* (2020). Essa cepa termofílica é reconhecida pela produção de enzimas termoestáveis, que ampliam seu potencial para aplicações industriais e farmacêuticas.

A resistência ambiental do SMIA-2 está diretamente ligada à sua morfologia bacilar e à capacidade de formar esporos, características que garantem tolerância a condições extremas, como altas temperaturas, dessecação e salinidade elevada ($\geq 10\%$ NaCl) (CRUZ *et al.*, 2024; EFSA, 2021). Estudos genômicos revelaram que a cepa pertence ao grupo de *Bacillus* termofílicos, com 94% de similaridade genética com *Bacillus caldoolyolyticus* e 100% de identidade com a cepa-tipo *B. licheniformis*. Bernardo *et al.* (2020) resequenciaram o gene 16S rRNA (GenBank, no número de acesso MN645931) e, posteriormente o genoma completo do SMIA-2, visando à identificação da sua espécie e de possíveis genes relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários. Todo o projeto do genoma do SMIA-2 foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso JAACZZ000000000.

O genoma do SMIA-2 revelou um repertório metabólico expressivo, com genes codificadores de enzimas hidrolíticas de interesse industrial, incluindo amilases, proteases, celulasas, lipases e xilanases, muitas das quais apresentam estabilidade em condições de temperatura elevada e variações de pH (CRUZ *et al.*, 2021). As proteases alcalinas produzidas por essa cepa demonstram elevada atividade em ambientes alcalinos, enquanto suas celulasas exibem eficiência na degradação de celulose sob condições termofílicas, características que ampliam sua aplicabilidade em processos industriais, como formulações de detergentes e biotransformações em larga escala (CRUZ *et al.*, 2021).

Estudos aplicados também indicam o potencial do SMIA-2 em contextos agroindustriais. A suplementação de enzimas derivadas dessa cepa em rações para

tilápias-do-nilo resultou em melhorias no desempenho zootécnico e na saúde intestinal dos animais (PIERRO *et al.*, 2024).

Do ponto de vista da biossegurança, análises genômicas confirmaram a ausência de genes associados à patogenicidade na cepa SMIA-2, indicando seu uso seguro em aplicações industriais e ambientais (BERNARDO *et al.*, 2020). Essa característica, aliada à elevada eficiência metabólica e à capacidade de produção de enzimas e metabólitos bioativos, reforça a viabilidade do SMIA-2 para aplicações biotecnológicas em escala comercial, incluindo a indústria de detergentes, alimentos e biocombustíveis (CRUZ *et al.*, 2024).

3.4. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A cepa ATCC 25923 é amplamente utilizada como referência em estudos microbiológicos, clínicos e laboratoriais, sendo frequentemente empregada como cepa controle em testes de suscetibilidade antimicrobiana e na padronização de métodos de diagnóstico microbiológico. O *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresenta morfologia cocoide com diâmetro celular aproximado entre 0,5 e 1,5 µm e coloração Gram-positiva, característica atribuída à presença de uma espessa camada de peptidoglicano em sua parede celular (MISSIAKAS; SCHNEEWIND, 2013; MADIGAN *et al.*, 2018).

Trata-se de uma bactéria não esporulante e não flagelada, frequentemente encontrada como parte da microbiota normal da pele e das mucosas de seres humanos e outros animais. Entretanto, em condições favoráveis, esse microrganismo pode atuar como patógeno oportunista, sendo responsável por uma ampla variedade de infecções cutâneas e sistêmicas (LOWY, 1998; TURNER *et al.*, 2019).

Do ponto de vista metabólico, *S. aureus* é considerado um microrganismo aeróbio facultativo, capaz de realizar tanto respiração aeróbia quanto processos fermentativos. Essa flexibilidade metabólica contribui para sua adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes, incluindo tecidos do hospedeiro, superfícies inanimadas e ambientes hospitalares (MADIGAN *et al.*, 2018; MISSIAKAS; SCHNEEWIND, 2013).

Além disso, *S. aureus* apresenta um amplo repertório de fatores de virulência que favorecem sua capacidade de colonização e patogenicidade. Entre esses fatores destacam-se toxinas hemolíticas, como as hemolisinas alfa e beta, capazes de

promover lise celular, além da formação de biofilmes, que permitem a adesão a superfícies biológicas e abióticas e aumentam a resistência a agentes antimicrobianos. A produção de enzimas extracelulares também contribui para a evasão do sistema imunológico e para a disseminação da bactéria nos tecidos infectados (CHEUNG; BAE; OTTO, 2021; LOWY, 1998).

A cepa *S. aureus* ATCC 25923 é sensível a antibióticos β -lactâmicos, como a oxacilina, e é amplamente utilizada como controle positivo em testes de difusão em disco e outros métodos de avaliação da suscetibilidade antimicrobiana. Por não possuir o gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina, essa cepa é empregada como referência para validação de protocolos de identificação de cepas resistentes em laboratórios clínicos e de pesquisa (CLSI, 2023).

Dessa forma, o uso de *S. aureus* ATCC 25923 em estudos microbiológicos e farmacológicos é fundamental para o desenvolvimento e avaliação de novos agentes antimicrobianos, além de contribuir para a padronização e confiabilidade de métodos laboratoriais utilizados no diagnóstico microbiológico e na pesquisa experimental (TURNER *et al.*, 2019; CLSI, 2023).

3.5. *Candida glabrata* ATCC 2001

Candida glabrata é uma levedura oportunista de crescente importância clínica, reconhecida como uma das principais causas de candidemia em ambientes hospitalares, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Diferentemente de outras espécies do gênero *Candida*, como *Candida albicans*, *C. glabrata* apresenta características fisiológicas e estruturais específicas que contribuem para sua elevada adaptabilidade e tolerância a estresses ambientais, incluindo a exposição a agentes antifúngicos (PFALLER; DIEKEMA, 2007; PAPPAS *et al.*, 2016).

Do ponto de vista taxonômico, *Candida glabrata* pertence ao clado *Nakaseomyces* e apresenta maior proximidade filogenética com leveduras do gênero *Saccharomyces* do que com *Candida albicans*, o que se reflete em diferenças marcantes em sua biologia celular e em seus mecanismos de virulência (KURTZMAN; ROBNETT, 2003).

A cepa *Candida glabrata* ATCC 2001 é amplamente utilizada como referência em estudos microbiológicos e farmacológicos, sendo empregada em ensaios de

crescimento de suscetibilidade antifúngica e formação de biofilmes (PFALLER *et al.*, 2012). Diferentemente de *C. albicans*, *C. glabrata* apresenta morfologia exclusivamente leveduriforme, sem a formação de hifas ou pseudo-hifas. Apesar disso, a espécie exibe elevada capacidade de adesão a superfícies biológicas e abióticas, bem como habilidade para formar biofilmes estruturados, características diretamente associadas à persistência da infecção e à redução da eficácia terapêutica (RODRIGUES *et al.*, 2017; TIMMERMANS *et al.*, 2018).

A parede celular de *Candida glabrata* constitui um dos principais determinantes de sua virulência e resistência. Estudos demonstram que essa levedura apresenta uma parede celular espessa, rica em β -1,3-glucanos, quitina e manoproteínas, cuja organização confere maior rigidez estrutural e reduz a permeabilidade celular (KAPTEYN *et al.*, 1997; GOW *et al.*, 2017). Além disso, proteínas adesinas da família EPA (*Epithelial Adhesin*) desempenham papel fundamental na adesão às células do hospedeiro e na colonização de tecidos, contribuindo para o estabelecimento da infecção (TIMMERMANS *et al.*, 2018).

Outro aspecto de grande relevância clínica é a resistência intrínseca ou adquirida de *C. glabrata* aos antifúngicos da classe dos azóis, especialmente ao fluconazol. Essa característica está associada à superexpressão de bombas de efluxo da família ABC, à modulação de vias metabólicas e à elevada plasticidade genômica da espécie, fatores que limitam as opções terapêuticas disponíveis (SANGUINETTI *et al.*, 2005; CANNON *et al.*, 2009). Como consequência, infecções por *C. glabrata* frequentemente requerem o uso de equinocandinas, reforçando a necessidade de estratégias alternativas de controle.

Nesse contexto, a prospecção de microrganismos produtores de metabólitos antimicrobianos, como espécies do gênero *Bacillus*, tem sido considerada uma abordagem promissora para o controle de leveduras oportunistas. Compostos produzidos por *Bacillus*, incluindo lipopeptídeos e bacteriocinas, têm demonstrado atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*, atuando principalmente por desorganização da membrana plasmática e interferência na integridade da parede celular (CAULIER *et al.*, 2019; VIECO-SAIZ *et al.*, 2025).

Assim, a inclusão de *Candida glabrata* ATCC 2001 como microrganismo-alvo neste estudo amplia o espectro de avaliação da atividade antimicrobiana do *Bacillus licheniformis* SMIA-2, permitindo investigar seu potencial antagonista não apenas frente a bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, mas também frente a leveduras

cl clinicamente relevantes e reconhecidamente resistentes. Essa abordagem contribui para uma compreensão mais abrangente do potencial biotecnológico do SMIA-2 como fonte de compostos antimicrobianos alternativos.

3.6. Mecanismos da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de bactérias, como espécies do gênero *Bacillus*, pode ocorrer por dois mecanismos principais: (i) produção de compostos extracelulares difusíveis e (ii) competição celular direta dependente da presença de células viáveis. A distinção entre esses mecanismos é essencial para a correta interpretação de ensaios de antagonismo, especialmente em modelos envolvendo patógenos como *Staphylococcus aureus*.

Em estudos envolvendo bactérias do gênero *Bacillus*, foi relatado que a inibição de patógenos pode resultar de um mecanismo combinado. Em interações entre *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo, foi demonstrado que metabólitos secretados contribuem para a exclusão do patógeno, mas a dinâmica espacial e a competição local também desempenharam papel determinante (GONZÁLEZ *et al.*, 2011). Além disso, em ambientes naturais e em biofilmes, a proximidade celular favoreceu tanto a entrega eficiente de toxinas quanto a competição por recursos limitantes, tornando difícil dissociar completamente os dois mecanismos (HIBBING *et al.*, 2010).

3.7. Atividade antimicrobiana por competição celular direta

A inibição do crescimento dependente de contato (*contact-dependent growth inhibition* – CDI) é um mecanismo de interação bacteriana no qual uma célula inibe diretamente o crescimento de outra por meio de contato físico célula–célula, distinguindo-se de sistemas baseados na secreção de metabólitos difusíveis, como antibióticos ou bacteriocinas ((AOKI *et al.*, 2005; HAYES *et al.*, 2014; HALVORSEN *et al.*, 2024; WHITNEY; HOWELL; HAYES, 2021)). Esse processo foi inicialmente descrito em *Escherichia coli*, sendo posteriormente identificado em diversas bactérias Gram-negativas.

Nos sistemas clássicos de CDI, o mecanismo é mediado pelas proteínas CdiB e CdiA. O sistema CDI é geralmente codificado por um operon *cdiBAI*, no qual CdiB (contact-dependent inhibition B) atua como uma proteína de membrana externa pertencente à família das proteínas de secreção dependentes de duas etapas (*two-partner secretion system – TPS*), sendo responsável pela secreção e ancoragem da proteína efetora CdiA na superfície celular. CdiA (contact-dependent inhibition A) é uma grande exoproteína filamentosa que se projeta para o meio extracelular e atua no reconhecimento da célula-alvo, permitindo o contato físico entre as bactérias e a entrega de um domínio tóxico localizado em sua região C-terminal (AOKI *et al.*, 2005; HAYES *et al.*, 2010; RUHE *et al.*, 2015; HALVORSEN *et al.*, 2024).

Após o reconhecimento de receptores específicos na superfície da bactéria sensível, o domínio tóxico de CdiA é translocado para o interior da célula-alvo, onde pode exercer atividades como DNase, RNase ou formação de poros, resultando na inibição do crescimento ou morte celular (RUHE *et al.*, 2015; WILLETT *et al.*, 2015; WHITNEY; HOWELL; HAYES, 2021). As células produtoras expressam proteínas de imunidade específicas, denominadas CdiI, que neutralizam a toxina correspondente e impedem que a bactéria produtora seja afetada pelo próprio sistema de inibição (AOKI *et al.*, 2005; HAYES *et al.*, 2014; HALVORSEN *et al.*, 2024).

Além do sistema CDI clássico, outros mecanismos de antagonismo dependente de contato foram descritos, como o sistema de secreção do tipo VI (T6SS), amplamente distribuído em bactérias Gram-negativas e capaz de injetar efetores tóxicos diretamente em células competidoras (BASLER *et al.*, 2013; COULTHURST, 2019; NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 2019). Esses sistemas reforçam a importância da competição direta como estratégia ecológica em ambientes microbianos complexos.

Em bactérias Gram-positivas, embora os sistemas CdiA/CdiB não sejam predominantes, mecanismos funcionalmente análogos têm sido descritos. Em *Bacillus* spp., por exemplo, sistemas de secreção associados à parede celular podem mediar antagonismo célula–célula por meio da entrega de toxinas proteicas a bactérias competidoras (SMITH *et al.*, 2024). Esses mecanismos contribuem para a competição intra e interespecífica, especialmente em biofilmes e comunidades estruturadas.

Do ponto de vista ecológico, a CDI desempenha papel central na estruturação de comunidades bacterianas, favorecendo a exclusão competitiva e promovendo reconhecimento de parentesco (kin discrimination), uma vez que apenas células que compartilham genes de imunidade são resistentes à toxina produzida (HAYES *et al.*,

2014; RUHE *et al.*, 2015; HALVORSEN *et al.*, 2024). Em biofilmes, a proximidade celular favorece a eficácia desses sistemas, conferindo vantagem adaptativa a linhagens produtoras (NADELL *et al.*, 2016; NADELL; FOSTER; XAVIER, 2010).

Em estudos envolvendo o antagonismo de *Bacillus* contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, a observação de inibição apenas na presença de células viáveis e não em sobrenadantes livres de células sugere a possível participação de mecanismos dependentes de contato, além da produção de metabólitos difusíveis (SMITH *et al.*, 2024). Essa distinção é particularmente relevante em ensaios de co-cultura, nos quais a interação física pode ser determinante para a atividade antimicrobiana observada.

3.8. Atividade antimicrobiana por compostos extracelulares

A inibição do crescimento por compostos extracelulares constitui um dos principais mecanismos de competição microbiana, ocorrendo quando microrganismos produzem e liberam substâncias difusíveis capazes de interferir na viabilidade, multiplicação ou metabolismo de outras células no mesmo ambiente (HIBBING *et al.*, 2010; RILEY & WERTZ, 2002). Diferentemente dos sistemas dependentes de contato, esse tipo de antagonismo não requer interação física direta entre as células, sendo mediado por metabólitos que se difundem no meio.

Entre os principais compostos extracelulares envolvidos destacam-se antibióticos, bacteriocinas, lipopeptídeos, enzimas hidrolíticas, ácidos orgânicos e espécies reativas, que atuam por diferentes mecanismos, como inibição da síntese da parede celular, formação de poros na membrana citoplasmática, degradação de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) ou interferência em vias metabólicas essenciais (COTTER *et al.*, 2005; Stein, 2005). Esses metabólitos são frequentemente classificados como metabólitos secundários, cuja produção está associada à fase estacionária de crescimento ou a condições de estresse ambiental.

Nas espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens* se destacam no gênero *Bacillus* com a produção de compostos extracelulares com atividade antimicrobiana, eles sintetizam lipopeptídeos cíclicos como surfactina, iturina e fengicina que interagem com membranas celulares de microrganismos-alvo, promovendo aumento da permeabilidade e lise celular (ONGENA & JACQUES, 2008;

STEIN, 2005). Além disso, essas bactérias produzem enzimas extracelulares, incluindo proteases e quitinases, que podem degradar componentes estruturais de patógenos bacterianos e fúngicos, contribuindo para a inibição do crescimento (CHEN *et al.*, 2009).

Outro grupo relevante são as bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos ribossomalmente sintetizados que apresentam, em geral, espectro de ação relativamente restrito e atuam por formação de poros ou inibição da síntese de parede celular (COTTER *et al.*, 2005; RILEY & WERTZ, 2002). A atividade dessas moléculas pode ser detectada em sobrenadantes livres de células, característica frequentemente utilizada para distinguir antagonismo mediado por compostos extracelulares daquele dependente de contato.

Do ponto de vista ecológico, a secreção de compostos antimicrobianos difusíveis confere vantagem competitiva em ambientes com recursos limitados, como solo, rizosfera, alimentos e microbiotas associadas a hospedeiros (HIBBING *et al.*, 2010). Em biofilmes, esses metabólitos podem influenciar a estrutura da comunidade microbiana e contribuir para a exclusão competitiva de espécies sensíveis, modulando a dinâmica populacional.

Experimentalmente, a inibição por compostos extracelulares é frequentemente evidenciada por halos de inibição em ensaios de difusão em ágar ou pela atividade antimicrobiana detectada em sobrenadantes filtrados. A manutenção da atividade após remoção das células indica que o efeito é mediado por substâncias secretadas; por outro lado, a ausência de atividade no sobrenadante pode sugerir mecanismos dependentes de contato ou compostos instáveis.

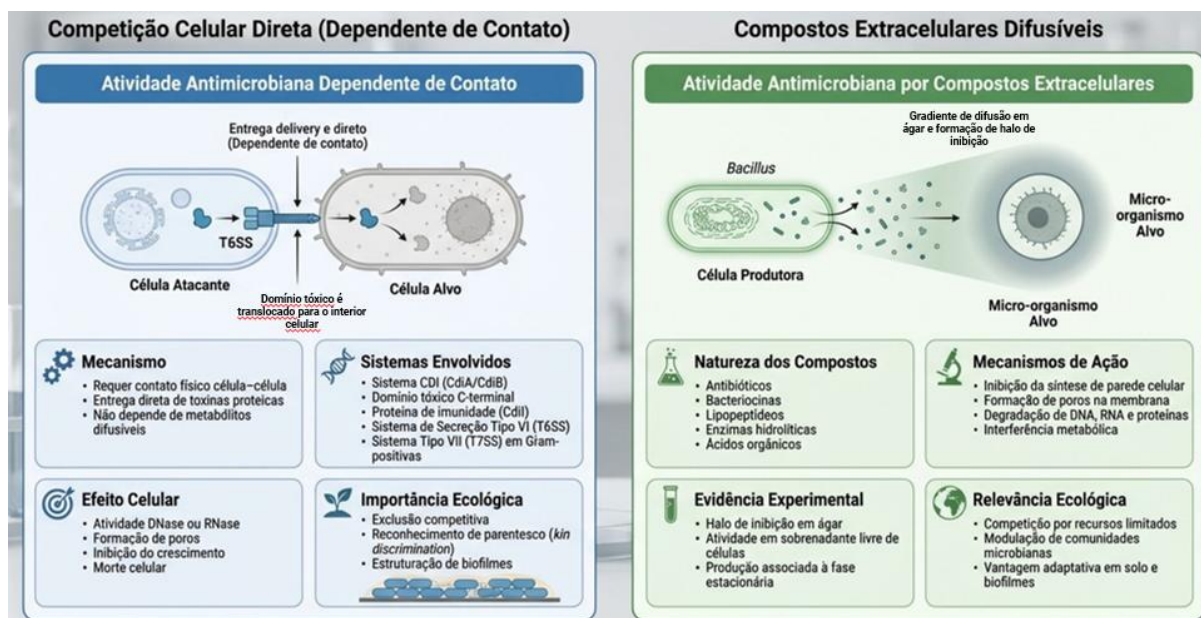


Figura 1: Mecanismos de atividade antimicrobiana em competição celular direta e compostos extracelulares difusíveis.

Fonte: Elaborado pela autora com auxílio de inteligência artificial (Veo 3) (2026), com base em Hibbing *et al.* (2010), Aoki *et al.* (2005), Ruhe *et al.* (2013), Cotter *et al.* (2005), Stein (2005) e Nadell *et al.* (2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

4.1.1. *Bacillus licheniformis* SMIA-2

Bacillus licheniformis SMIA2 foi isolado de uma amostra de solo coletada na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil (NUNES E MARTINS, 2001). O genoma da bactéria foi ressequenciado na Unidade de Serviço de Biologia Molecular do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade de Alberta, Canadá. Todo o projeto do genoma do SMIA-2 foi depositado no DDBJ/ENA/GenBank sob o número de acesso JAACZZ000000000 (BERNARDO *et al.*, 2020). O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (Tryptona 20 g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1 L), sob temperatura de refrigeração (7°C).

4.1.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

A cepa foi obtida do Laboratório de Sanidade Animal - LSA (Setor de Bacteriologia Veterinária), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy

Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e foi mantida a 4°C em ágar sangue.

4.1.3. *Cândida glabrata* ATCC 2001

A cepa foi obtida do Laboratório de Sanidade Animal - LSA (Setor de Bacteriologia Veterinária), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e foi mantida a 4°C em Ágar Batata Dextrose (PDA).

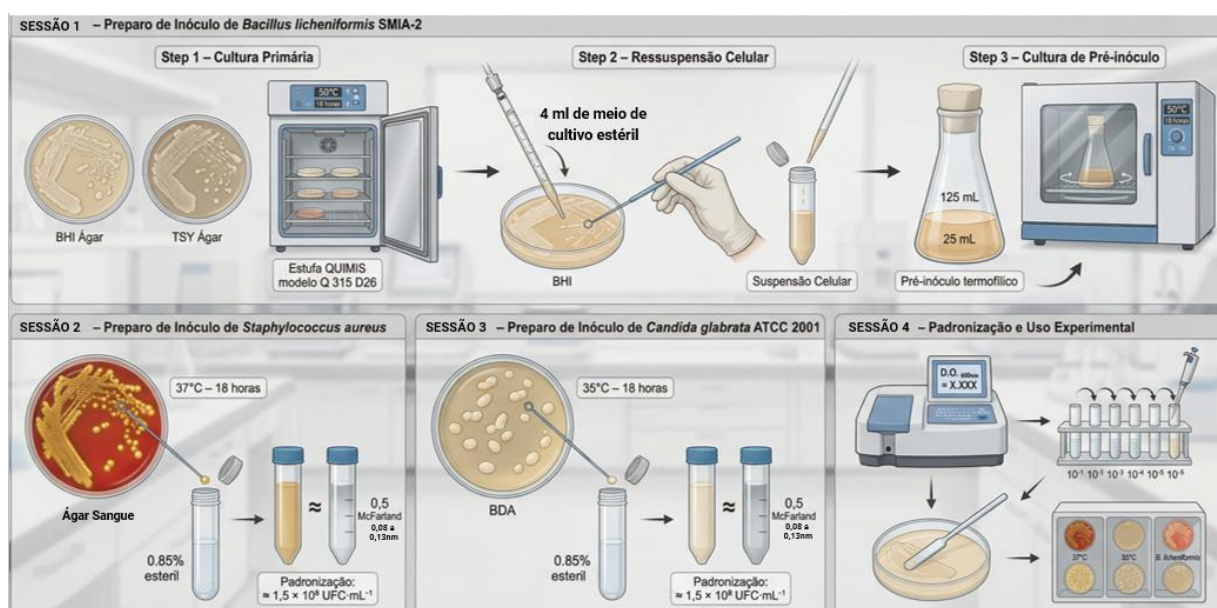


Figura 2: Etapas experimentais de preparo dos inóculos, crescimento microbiano e avaliação da atividade antagonista.

Fonte: Elaborado pela autora com auxílio de inteligência artificial (Veo 3, 2026), com base em Missiakas e Schneewind (2013), CLSI (2023), Balouiri *et al.* (2016) e Nicolas (2025).

4.2. Meios de crescimento

Os seguintes meios de crescimento foram utilizados:

4.2.1 Meio BHI - Caldo Brain Heart Infusion (Kasvi®): Coração de boi, infusão a partir de 250 g - 9,8g/L; Proteose Peptona – 10g/L; Dextrose – 2g; Cloreto de Sódio – 5g; Fosfato dissódico – 2,5g; Água deionizada – 1000mL. O valor do pH final do meio foi pH 7,4;

4.2.2 Meio TSY: (g/L): Triptona - 20; NaCl - 10; extrato de levedura 10. O valor do pH final do meio foi pH 7,5;

4.2.3 Meio Baird Parker (g/L de água destilada): Digesto pancreático de caseína - 10,0; extrato de Carne - 5,0; extrato de levedura - 1,0; glicina - 12,0; piruvato de sódio - 10,0; cloreto de lítio - 5,0; ágar - 20,0; uma suspensão de telurito 0,01% (p/v);

4.2.4 Meio mineral suplementado com subprodutos agroindustriais I: (g/L de água destilada): KCl-0,3, MgSO₄-0.5, K₂HPO₄-0.87, CaCl₂-0.29, ZnO-2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1.0x10⁻², CuCl₂.2H₂O-8.5x10⁻⁴, CoCl₂.6H₂O-2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2.5x10⁻⁴, H₃BO₃-3.0x10⁻⁴, farinha da casca de maracujá (obtida do comércio local) - 0,3 e água de maceração de milho (Sigma Aldrich) - 0,1;

4.2.5 Meio mineral suplementado com subprodutos agroindustriais II (g/L de água destilada): KCl-0,3, MgSO₄-0.5, K₂HPO₄-0.87, CaCl₂-0.29, ZnO-2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1.0x10⁻², CuCl₂.2H₂O-8.5x10⁻⁴, CoCl₂.6H₂O-2.4x10⁻³, NiCl₂.6H₂O-2.5x10⁻⁴, H₃BO₃-3.0x10⁻⁴, amido solúvel - 0,3, água de maceração de milho (Sigma Aldrich) - 0,1 e proteínas do soro de leite - 0,1%.

4.3. Preparo dos inóculos e condições de crescimento das culturas

O inóculo do *B. licheniformis* SMIA-2 foi preparado semeando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio BHI ou o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50 °C por 18 horas. Após este período, 4 mL de cada um dos meios de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 18 horas a 50 °C e, posteriormente utilizadas para inocular os meios de crescimento.

S. aureus foi recuperada a partir da placa de ágar sangue cultivada a 37°C por 18 horas. Em seguida, foram preparados inóculos pela diluição da cultura em solução salina 0,85% utilizando a Escala de McFarland 0,5 até a obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹.

Candida glabrata ATCC 2001 foi inicialmente cultivada em placas contendo meio PDA (Ágar Batata Dextrose), incubadas a 35 °C por 18 horas. Após o crescimento, as células leveduriformes foram ressuspensas com auxílio de solução salina estéril a 0,85%, obtendo-se uma suspensão homogênea. O inóculo foi padronizado utilizando a escala 0,5 de McFarland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹.

4.4. Determinação do crescimento do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus*

O crescimento dos microrganismos foi determinado pela medida da turbidez do meio de crescimento, medindo-se a DO 600 nm com a utilização de um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

O crescimento também foi monitorado pela contagem de células viáveis. Após diluição seriada, 100 µl das amostras das culturas de *B. licheniformis* SMIA-2 e *S. aureus* foram espalhados em placas de Petri contendo o meio TSY e incubadas a 37°C e 50 °C por 18 h, respectivamente. As colônias formadas foram contadas e expressas como unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos como valores médios.

4.5. Determinação da atividade antagonista do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 contra *Staphylococcus aureus* e da *Candida glabrata*.

A avaliação da atividade antagonista foi realizada pela metodologia de difusão em ágar por poço, conforme Gaspar *et al.* (2017), com adaptações. As culturas do *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e de *Candida glabrata* ATCC 2001 foram inoculadas individualmente na superfície do meio de cultura sólido TSY, com auxílio de um swab estéril, para uma cobertura uniforme do inóculo. Posteriormente, seis orifícios de 6 mm de diâmetro foram feitos nos meios de cultura com o auxílio de um molde, formando os poços, que foram preenchidos com 10 µL, 20 µL, 30µL, 40µL, 50µL e 60µL da suspensão de células do SMIA-2 ($\approx 10^8$ – 10^9 UFC/mL).

Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. A atividade antagonista foi avaliada de forma qualitativa, considerando-se a presença ou ausência de halos de inibição ao redor dos poços. Os halos observados foram registrados por meio de imagens, utilizadas apenas para fins ilustrativos e comprovação visual da atividade antagonista. Os testes foram realizados em triplicata.

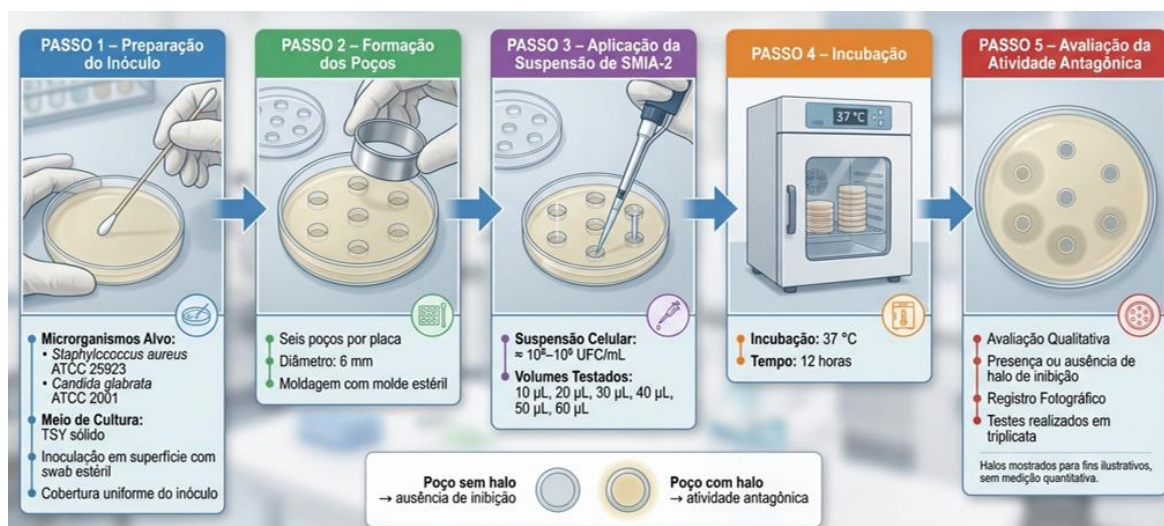


Figura 3: Determinação da atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 frente a *Staphylococcus aureus* e *Candida glabrata* por ensaio de difusão em ágar.

Fonte: Elaborado pela autora com auxílio de inteligência artificial (Veo 3, 2026), com base em Gaspar *et al.* (2017), Balouiri *et al.* (2016), Missiakas e Schneewind (2013), CLSI (2023) e Nicolas (2025).

4.6. Influência de diferentes meios de crescimento sobre a atividade antagonista do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 contra *Staphylococcus aureus*

Frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL dos meios BHI, meio mineral contendo subprodutos agroindustriais I e meio mineral contendo subprodutos agroindustriais II foram inoculados com 2,0 mL do inóculo do *B. licheniformis* SMIA-2 preparado como descrito no item 4.3. Posteriormente, os frascos foram incubados a 50 °C em um “Shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. A intervalos de tempo predeterminados foram retiradas amostras para determinação do crescimento pela medida da densidade ótica a 600 nm, pH e atividade antagônica do SMIA-2 contra *Staphylococcus aureus*. Todos os experimentos foram realizados com três repetições.

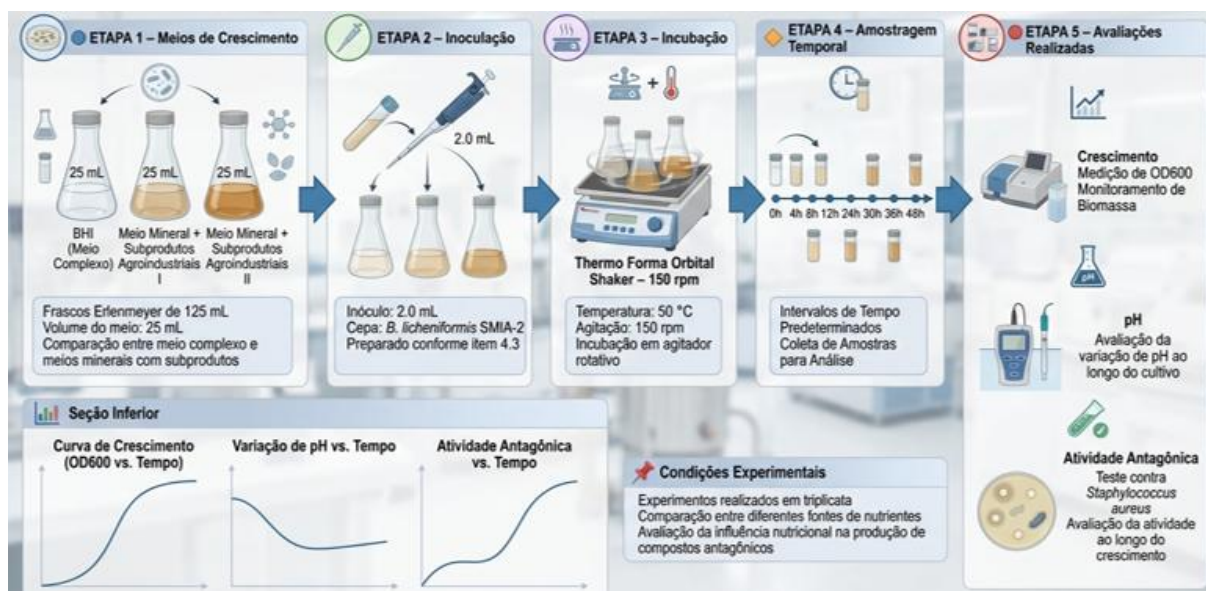


Figura 4: Influência de diferentes meios de crescimento sobre a atividade antagonista do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 contra *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Elaborado pela autora com auxílio de inteligência artificial (Veio 3, 2026), com base em Balouiri *et al.* (2016), CLSI (2023), Missiakas e Schneewind (2013) e Nicolas (2025).

4.7. Atividade antagonista de *B. licheniformis* SMIA-2 cultivado em co-culturas de *S. aureus*

Para os experimentos de co-culturas de *S. aureus* e *B. licheniformis* SMIA-2, o meio de cultura BHI foi utilizado.

Frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio BHI foram inoculados com 2,0 mL do inóculo do *B. licheniformis* SMIA-2, preparado como descrito no item 4.3. Posteriormente, os frascos foram incubados a 37°C em um “Shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. A intervalos de tempo predeterminados (4, 8 e 12 horas) foram adicionados inóculos do *S. aureus* (10^7 UFC/mL) aos frascos contendo as culturas do *B. licheniformis* SMIA-2, que foram incubadas por mais 24 horas.

O crescimento individual do *B. licheniformis* SMIA-2 e do *S. aureus* foi determinado pela medida da densidade ótica a 600 nm, com a utilização de um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000. O crescimento também foi monitorado pela contagem de células viáveis. Após diluição seriada, 100 µl das amostras das culturas de *B. licheniformis* SMIA-2 e *S. aureus* foram espalhados em placas de Petri contendo o meio TSY e incubadas a 50 °C e 37°C por 18 h, respectivamente. As colônias

formadas foram contadas e expressas como unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

A recuperação do *S. aureus* após co-cultura com *B. licheniformis* SMIA-2 por 24 h a 37°C foi determinada pela contagem de células viáveis. Após diluição seriada, 100 µl das amostras das culturas de *B. licheniformis* SMIA-2 e *S. aureus* foram espalhados em placas de Petri contendo o meio Ágar Baird Parker (meio seletivo para bactérias do gênero *Staphylococcus*) e incubadas a 37 °C por 18 h. As colônias formadas foram contadas e expressas como unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram expressos como valores médios.

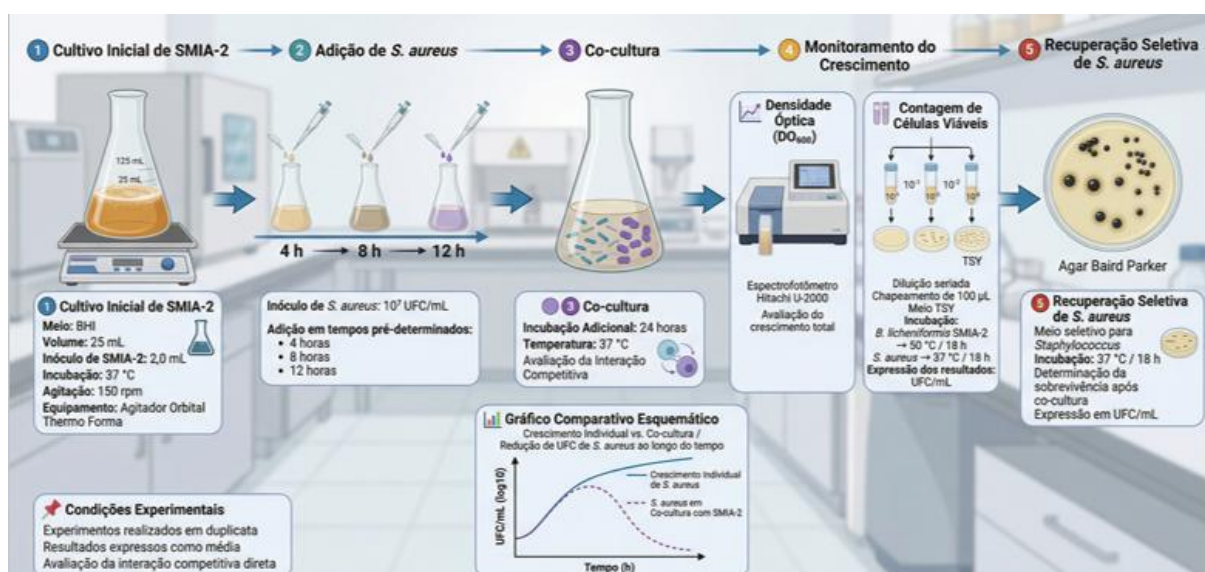


Figura 5: Avaliação da atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 em co-cultura com *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Elaborado pela autora com auxílio de inteligência artificial (Veo 3, 2026), com base em Missiakas e Schneewind (2013), Balouiri *et al.* (2016), CLSI (2023) e Nicolas (2025).

4.8. Atividade antagonista de extratos livres de células de *B. licheniformis* SMIA-2 contra *S. aureus*

Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de crescimento Meio Mineral contendo subprodutos agroindustriais I foram inoculados com 2,0 mL de inóculo do *B. licheniformis* SMIA-2, preparado como descrito no item 4.3. Posteriormente, os frascos foram incubados a 50 °C em um “Shaker” rotatório (Thermo

forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. Após 48 horas de incubação, o caldo resultante da fermentação foi centrifugado a $20.800 \times g$ por 20 minutos, em centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5430, equipada com rotor de ângulo fixo FA-45-24-11, para a obtenção do sobrenadante livre de células, o qual foi utilizado para a determinação da atividade antagonista conforme descrito neste item. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

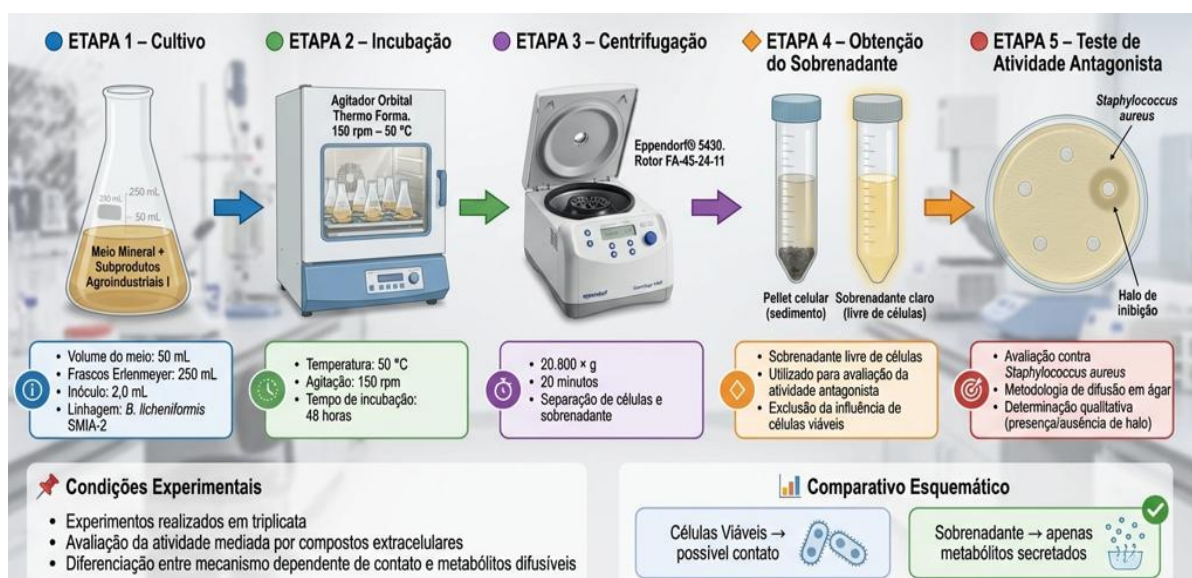


Figura 6: Avaliação da atividade antagonista de extratos livres de células de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 frente a *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Elaborado pela autora com auxílio de inteligência artificial (Veo 3, 2026), com base em Balouri *et al.* (2016), Missiakas e Schneewind (2013), CLSI (2023) e Nicolas (2025).

4.9. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata, conforme descrito em cada ensaio. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises foram realizadas utilizando-se o software OriginPro® versão 2025.

Os dados foram avaliados de forma descritiva, sendo apresentados graficamente ao longo do tempo, permitindo a análise do comportamento de crescimento microbiano, variação de pH e atividade antagonista.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade antagonista de culturas de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 em meio BHI sobre o *Staphylococcus aureus*

O antagonismo do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 cultivado em meio sólido contendo BHI sobre *Staphylococcus aureus* é observado na Figura 7. A escolha do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 como microrganismo indicador, foi devido à sua grande relevância clínica, capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos, como no caso do MRSA e de seu forte impacto na saúde pública. Além disso, é um importante agente de intoxicação alimentar e um modelo bem-estabelecido em testes microbiológicos, o que torna sua utilização estratégica para o desenvolvimento e avaliação de novos compostos antimicrobianos (TOUAITIA *et al.*, 2025; PHAN *et al.*, 2025).

Todos os ensaios do antagonismo do *B. licheniformis* SMIA-2 sobre o *S. aureus* foram realizados utilizando o meio BHI. O meio BHI (Brain Heart Infusion) é rico em aminoácidos, peptídeos e nutrientes complexos e é amplamente utilizado para o crescimento de uma variedade de microrganismos, incluindo até mesmo aqueles mais exigentes nutricionalmente (HIRA *et al.*, 2025). Assim, para uma avaliação correta da interação entre o SMIA-2 e o *S. aureus*, ambos os microrganismos foram cultivados no mesmo meio de cultura.

O aparecimento do halo de inibição foi observado somente quando as células do *S. aureus* foram previamente recuperadas do meio de cultura Ágar-sangue. Esse resultado indicou que a suscetibilidade do *S. aureus* ao antagonismo foi condicionada pelo seu estado fisiológico e/ou por resíduos derivados do meio sanguíneo. O ágar-sangue contém heme, ferro e proteínas séricas, que podem modular a composição da membrana, a expressão de fatores de virulência e mecanismos de proteção celular (MISSIAKAS & SCHNEEWIND., 2013), tornando o microrganismo mais vulnerável a peptídeos/lipopeptídeos produzidos por espécies de *Bacillus* (MARKÉLOVA; CHUMAK, 2025). Alternativamente, componentes do sangue podem induzir em bactérias do gênero *Bacillus* a produção ou ativação de metabolitos antimicrobianos ou facilitar interações químicas entre metabolitos e alvos bacterianos (ELAZZAZY *et al.*, 2024; HYATT *et al.*, 2025).

Portanto, a atividade antagonista do *B. licheniformis* SMIA-2 foi condicionada ao meio de cultura de origem do *S. aureus*, indicando que o antagonismo dependeu fortemente das condições prévias de cultivo do patógeno, ou seja, quando o mesmo foi exposto a produtos hemáticos.

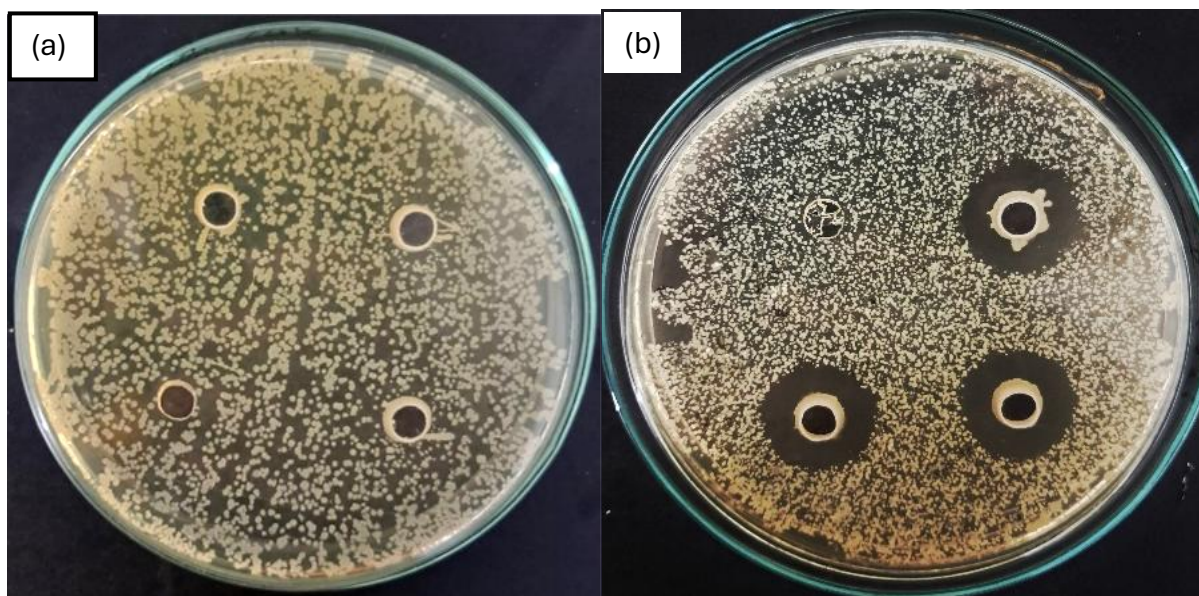


Figura 7: Halos de inibição do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) previamente cultivado em meio TSY (a) e em meio Ágar Sangue (b).

A competição celular direta entre bactérias do gênero *Bacillus* e *S. aureus* pode envolver antagonismo dependente de contato, produção de compostos antimicrobianos associados às células, competição por nutrientes e interferência na comunicação intercelular (*quorum sensing*) (HIBBING *et al.*, 2010; KASPAR *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2022). Essas interações frequentemente resultam em uma inibição mais forte de *S. aureus* em sistemas de co-cultura do que em ensaios baseados apenas em metabólitos extracelulares.

Segundo To *et al.* (2011), em ensaios de difusão em ágar, a suspensão celular da cultura de *Bacillus subtilis* P5-6 apresentou efeito inibitório contra *S. aureus*, enquanto nenhuma inibição foi observada quando o sobrenadante livre de células foi utilizado.

O antagonismo de microrganismos do gênero *Bacillus* contra patógenos como o *S. aureus*, envolve vários mecanismos tais como a produção de uma ampla gama de antimicrobianos, incluindo lipopeptídeos (surfactina, iturina, fengicina), bacteriocinas e peptídeos semelhantes a bacteriocinas, peptídeos sintetizados ribossomicamente (RiPPs), polipeptídeos e peptídeos não ribossômicos (KASPAR *et*

al., 2019; TRAN *et al.*, 2022; NICOLAS, 2025, CAULIER *et al.*, 2019; ALZAIN *et al.*, 2025). Esses compostos podem romper membranas citoplasmáticas, inibir a síntese da parede celular, causar extravasamento do conteúdo intracelular (KASPAR *et al.*, 2019; TRAN *et al.*, 2022; NICOLAS, 2025; ALZAIN *et al.*, 2025).

Bernardo *et al.* (2020) relataram que a análise do genoma do *B. licheniformis* SMIA-2 mostrou 5 grupos de genes envolvidos na biossíntese de metabólitos secundários: 3 clusters de genes pertencentes à síntese de peptídeos não ribossômicos (NRPs) (Liquenisina, Fengicina, Bacilobactina) e dois clusters de genes pertencentes à síntese de peptídeos ribossômicos (liquenissidina e lassopeptídeo).

A atividade antagonista de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo o Meio BHI e incubadas a 50 °C durante 24 horas sobre *S. aureus* é *observada* na Figura 2. O crescimento exponencial do *B. licheniformis* SMIA-2 iniciou após 2 horas de incubação do meio de cultura. Após esse tempo foi observado que a velocidade de crescimento reduziu marcando assim, a fase estacionária da cultura. O perfil do pH também é observado na Figura 8. Observa-se uma queda no valor do pH da cultura de 7,50 para 6,42 durante as primeiras 3 horas de incubação. Posteriormente, o pH do meio de cultura aumentou gradativamente para 9,50 após 24 horas de fermentação. A formação do halo de inibição do *B. licheniformis* SMIA-2 contra o *S. aureus* foi observada logo após a incubação da cultura, sendo retirado da incubadora após 12 horas, quando a cultura se encontrava na fase estacionária de crescimento (STEIN, 2005; ONGENA; JACQUES, 2008).

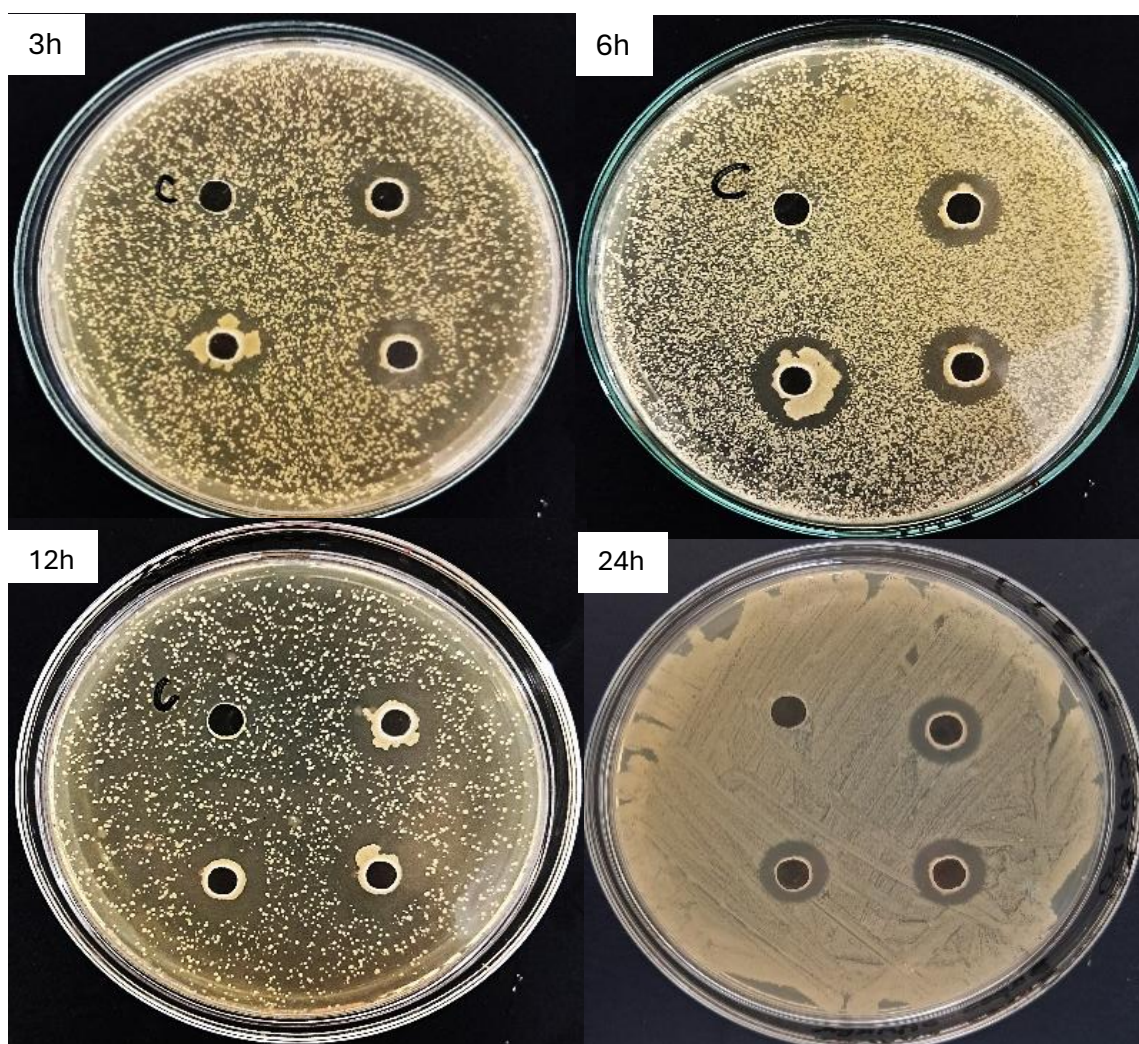
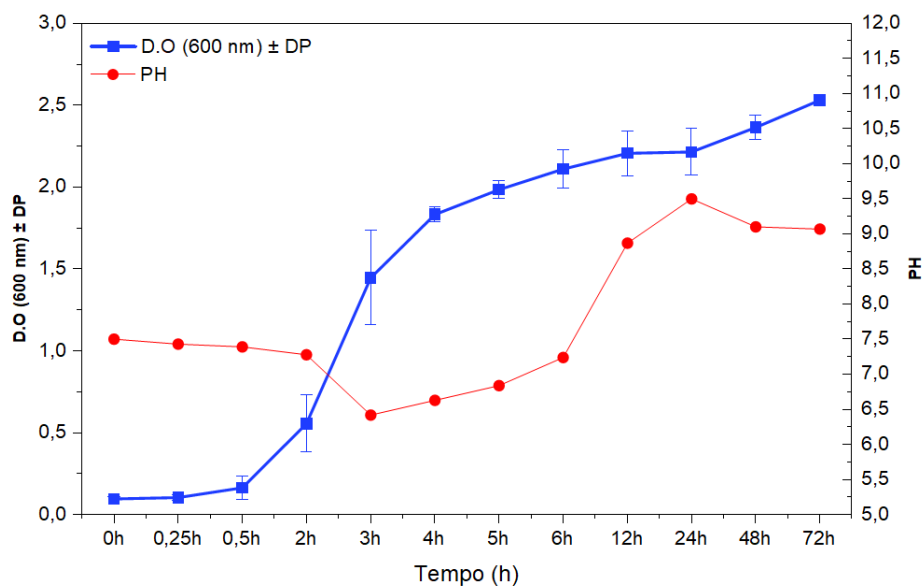


Figura 8: Atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em culturas submersas em meio BHI, incubadas a 50 °C e 150 rpm. Crescimento (DO_{600} nm) expresso como média \pm desvio padrão e variação do pH ao longo do tempo. Imagens representativas dos halos de inibição observados em placas de Petri após 3, 6, 12 e 24 horas de incubação.

Usualmente, bactérias do gênero *Bacillus* produzem substâncias antimicrobianas predominantemente na fase estacionária de crescimento. Isso ocorre porque, nessa fase, a limitação de nutrientes e o aumento da densidade celular ativam mecanismos regulatórios que direcionam o metabolismo para a produção de metabólitos secundários, muitos deles com atividade antimicrobiana, como bacteriocinas, lipopeptídeos (surfactina, iturina, fengicina) e outros peptídeos bioativos (NICOLAS, 2025; TRAN *et al.*, 2022; KASPAR *et al.*, 2019; HARWOOD *et al.*, 2018).

Shleeva *et al.* (2023) relataram que a produção de compostos antimicrobianos por *Bacillus licheniformis* foi dependente das condições de crescimento e da fase do cultivo da bactéria. A produção de peptídeo semelhante à bacteriocina por *B. amyloliquefaciens* B10 foi detectada no final da fase logarítmica de crescimento (KARAOGLU *et al.*, 2003) e foi descrito que a produção de bacteriocina da cepa *Bacillus* 8A iniciou-se na fase exponencial inicial e continuou até a fase estacionária de crescimento (SALEM *et al.*, 2009).

A composição do meio de cultura influencia de forma direta e significativa a produção de compostos antimicrobianos por espécies do gênero *Bacillus*. Tabbene *et al.* (2009) demonstraram que os nutrientes do meio de cultura afetaram quantitativa e qualitativamente a produção de compostos antibacterianos por *B. subtilis* B38. Akpa *et al.* (2001) mostraram que o perfil de lipopeptídeos produzidos por *Bacillus subtilis* difere conforme as condições do meio de cultura e de acordo com Mezghanni *et al.* (2012), a peptona, sacarose e o extrato de levedura influenciaram significativamente a produção da atividade antifúngica de *Bacillus amyloliquefaciens*, sendo suas concentrações ótimas, respectivamente, 20 g/L, 25 g/L e 4,5 g/L. Estes pesquisadores ainda relataram que a deficiência de minerais não foi crucial para a produção dos biofungicidas.

5.2. Atividade antagonista de culturas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho contra o *S. aureus*

A atividade antagonista de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo substratos de baixo custo como a farinha da casca de maracujá, contra *S. aureus* foi estudada. Considerando que a farinha da casca do maracujá não é capaz de fornecer todas as fontes adequadas de nutrientes para o crescimento do

microrganismo, o meio de cultura foi enriquecido com a água de maceração de milho. A água de maceração de milho é uma fonte de aminoácidos, vitaminas e íons metálicos e, portanto, foi adicionado ao meio de cultura em substituição aos extratos de carne e levedura, que são fontes de nitrogênio de alto custo (LADEIRA *et al.* 2015).

A turbidez da cultura (medida através da densidade ótica a 600 nm) aumentou imediatamente após a incubação do meio de cultura por até 24 horas, caracterizando a fase exponencial de crescimento. Posteriormente, a densidade da cultura permaneceu constante, marcando o início da fase estacionária da mesma (Figura 9). Comparado ao meio BHI, o crescimento do *B. licheniformis* SMIA-2 foi mais lento. Estes resultados eram esperados devido à maior disponibilidade de nutrientes prontamente assimiláveis no meio BHI. Apesar da maior complexidade nutricional do meio constituído de farinha da casca do maracujá e água de maceração de milho, que resultou em menores taxas de crescimento, comparado ao meio BHI, este meio foi capaz de suprimir a necessidade do *B. licheniformis* SMIA-2 para seu crescimento. Estes resultados mostraram que *B. licheniformis* SMIA-2 secretou exoenzimas capazes de hidrolisar as macromoléculas presentes nos substratos até atingir a forma e a solubilidade necessária, para que sejam transportadas pela membrana celular (FERREIRA, 2023).

O aparecimento do halo de inibição foi observado desde as primeiras horas de incubação (6 h), quando a cultura se encontrava na fase exponencial, até o final da fase estacionária, quando o crescimento do microrganismo já havia sido cessado. O perfil do pH também é observado na Figura 9. Observa-se uma queda no pH da cultura durante as primeiras 6 horas de incubação. Posteriormente, o pH do meio de cultura aumentou gradativamente até 24 horas, permanecendo praticamente sem alterações até 72 horas de fermentação. A queda inicial do pH do meio indica que houve a produção de ácidos durante a fase inicial do crescimento bacteriano, enquanto o aumento do pH pode ser atribuído à presença de proteínas exocelulares, pois sabe-se que o pH do meio tende a aumentar se os compostos amino-orgânicos forem desaminados (LADEIRA *et al.*, 2015).

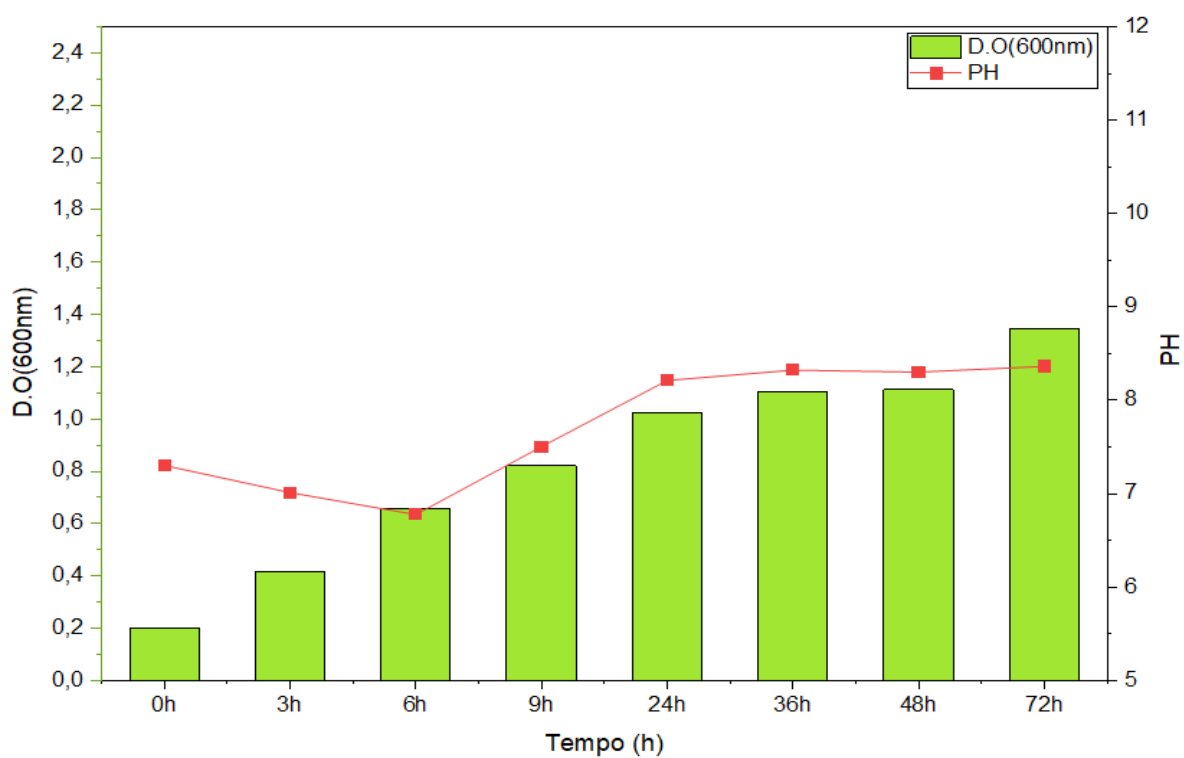


Figura 9: Atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 cultivado em meio contendo farinha da casca de maracujá (0,3%, p/v) e água de maceração de milho (0,3%, p/v), a 50 °C e 150 rpm. Crescimento (DO₆₀₀ nm) e variação do pH ao longo de 72 h.

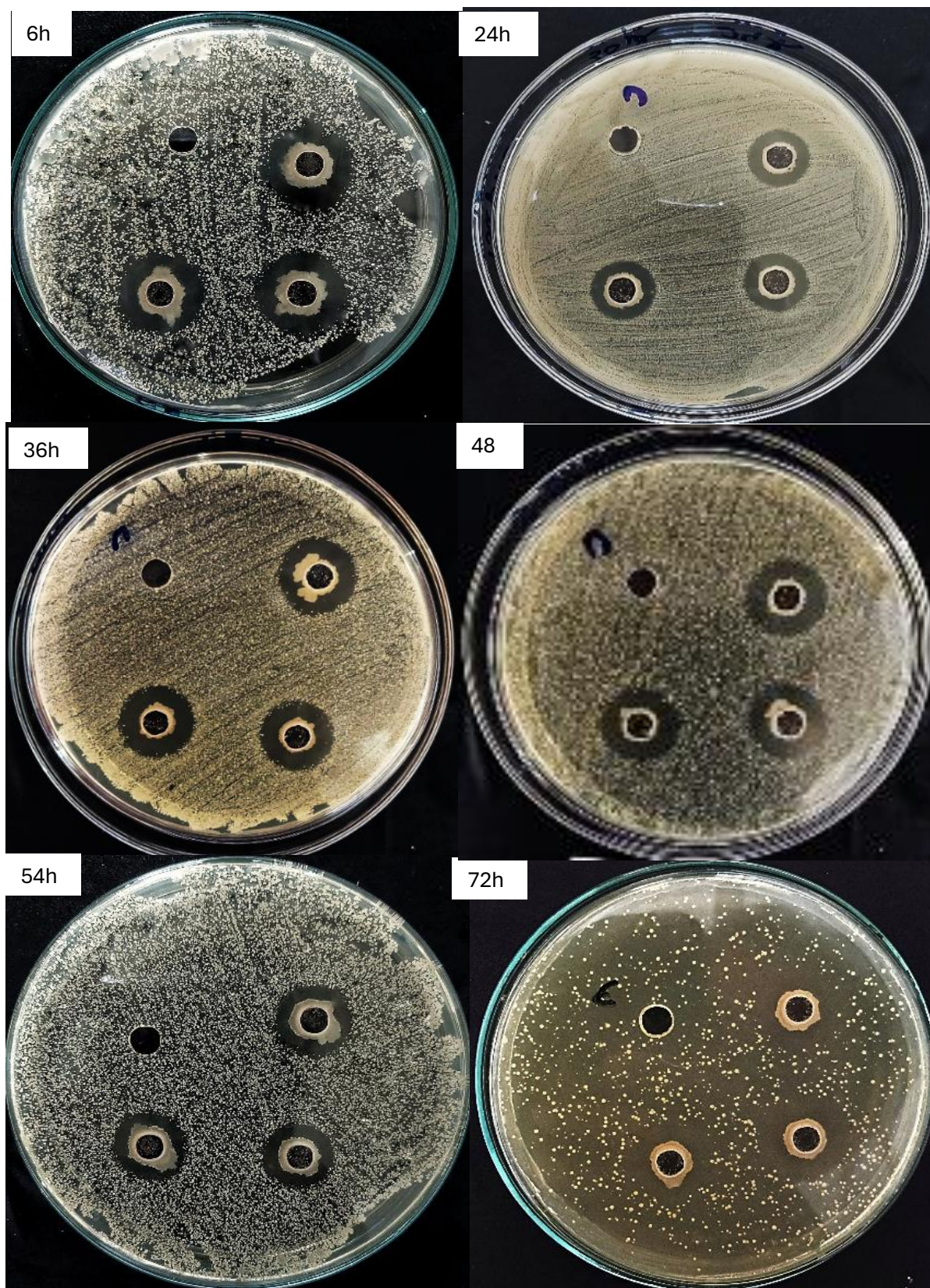


Figura 10: Atividade antagonista de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 cultivado em meio contendo farinha da casca de maracujá (0,3%, p/v) e água de maceração de milho (0,3%, p/v), a 50 °C e 150 rpm. Imagens representativas dos halos de inibição sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) após 6, 24, 36, 48, 54 e 72 h de incubação em placas de Petri.

5.3. Atividade antagonista de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo os substratos amido solúvel, proteínas do soro de leite e água de maceração de milho contra *S. aureus*

A atividade antagonista de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo amido solúvel, proteínas do soro de leite e a água de maceração de milho sobre o *S. aureus* está mostrada na Figura 11. Em todos os três períodos de incubação da cultura (24, 36 e 48 horas) foram observados a formação do halo de inibição. Este meio de cultura foi desenvolvido por Corrêa *et al.* (2011) para a produção simultânea de proteases e amilases por *B. licheniformis* SMIA-2. Ladeira *et al.* (2015) e mais recentemente Ferreira *et al.* (2021) também utilizaram esse meio para a produção de proteases e relataram que os maiores níveis de atividade da enzima foram encontrados quando a cultura se encontrava na fase estacionária de crescimento.

Portanto, a atividade antagonista observada coincide com a elevada capacidade proteolítica do *B. licheniformis* SMIA-2, sugerindo que essas enzimas podem potencializar o efeito antagonista dos metabólitos difusíveis acumulados no meio de cultivo contra *S. aureus*.

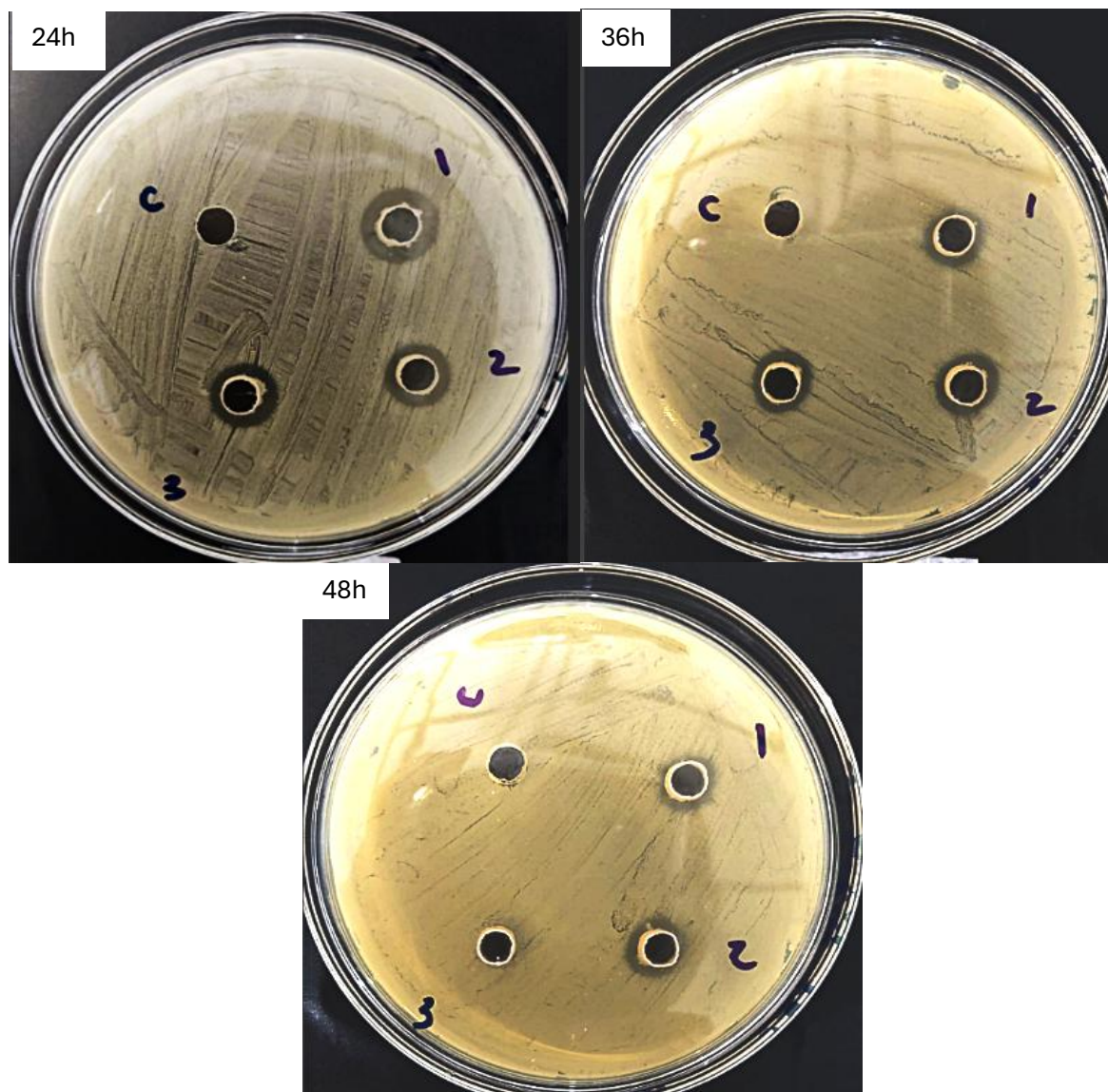


Figura 11: Atividade antagonista de culturas submersas de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 contendo 0,5% (p/v) de amido solúvel, (0,3%, p/v) de água de maceração de milho e 0,1%, p/v) de proteínas do soro a 50 °C e 150 rpm por 24 horas, 36 horas e 48 horas de incubação.

5.4. Atividade antagonista de *B. licheniformis* SMIA-2 cultivado em culturas submersas contendo BHI na presença de *S. aureus*

O crescimento isolado e em co-culturas de *B. licheniformis* SMIA-2 e *S. aureus* está apresentado na Figura 12. *S. aureus* apresentou taxas de crescimento maiores que o *B. licheniformis* SMIA-2. Como pode ser observado na Figura 12, após 1 hora de incubação a cultura do *B. licheniformis* SMIA-2 ainda se encontrava na fase estacionária de crescimento, enquanto a do *S. aureus* já tinha iniciado a fase exponencial de crescimento (Figura 13). Após 5 horas de incubação das culturas, o

Log_{10} UFC/mL do número de células do *S. aureus* e do *B. licheniformis* SMIA-2 foi de 8 UFC/mL e 6 UFC/mL, respectivamente. O crescimento mais lento do *B. licheniformis* SMIA-2 comparado ao *S. aureus* foi, provavelmente, devido à temperatura de incubação das culturas que foi de 37°C. Esta é a temperatura ótima de crescimento do *S. aureus*, mas não do *B. licheniformis* SMIA-2, que é de 50 °C (SOUZA E MARTINS, 2001). Portanto, o crescimento do *B. licheniformis* SMIA-2 abaixo da sua temperatura ótima, pode ter ocasionado alterações fisiológicas e metabólicas, que provocaram uma redução da sua taxa de crescimento.

A mistura das duas culturas em quantidades iguais de células após 3 horas de incubação de cada cultura, promoveu uma redução do Log_{10} UFC/mL do número de células do *S. aureus* de aproximadamente 2 unidades logarítmicas, como pode ser observado na Figura 14. Apesar dessa redução acentuada que ocorreu após 3,5 horas de incubação das culturas, o Log_{10} UFC/mL do *S. aureus* reduziu ligeiramente após esse período. O cultivo conjunto de cepas microbianas é uma estratégia eficaz para intensificar a produção de compostos antimicrobianos, uma vez que a interação competitiva estimula a expressão de vias metabólicas secundárias, frequentemente pouco ativas em monoculturas (TRAN *et al.*, 2025; KWOJI *et al.*, 2021; NICAULT *et al.*, 2021; KAZEMI *et al.*, 2019).

Bactérias formadoras de esporos, como as do gênero *Bacillus*, demonstraram ser candidatos promissores para sistemas de co-cultura, devido à sua capacidade de produzir uma vasta gama de metabólitos antimicrobianos e à sua estabilidade em condições ambientais e de armazenamento adversas (HENRIKSSON *et al.*, 2021).

No entanto, segundo Yu *et al.* (2022), sem a otimização das condições de fermentação, o antagonismo entre os microrganismos frequentemente interfere na produção de metabólitos secundários. Dentre as condições que precisam ser consideradas para definir a melhor condição para indução metabólica em co-cultura incluem a idade do pré-inóculo, ou seja, o período de incubação de cada cepa antes do co-cultivo, a quantidade de inóculo de cada cepa, considerando a taxa de crescimento dos micróbios selecionados, tempo de incubação, fatores abióticos, como temperatura, pH, fontes de nitrogênio/carbono/fosfato, velocidade de agitação, tipo de meio (líquido ou sólido), aeração e disponibilidade de água. Portanto, embora desfavorecido em taxa de crescimento, *B. licheniformis* SMIA-2 ainda foi competitivo na inibição do *S. aureus*.

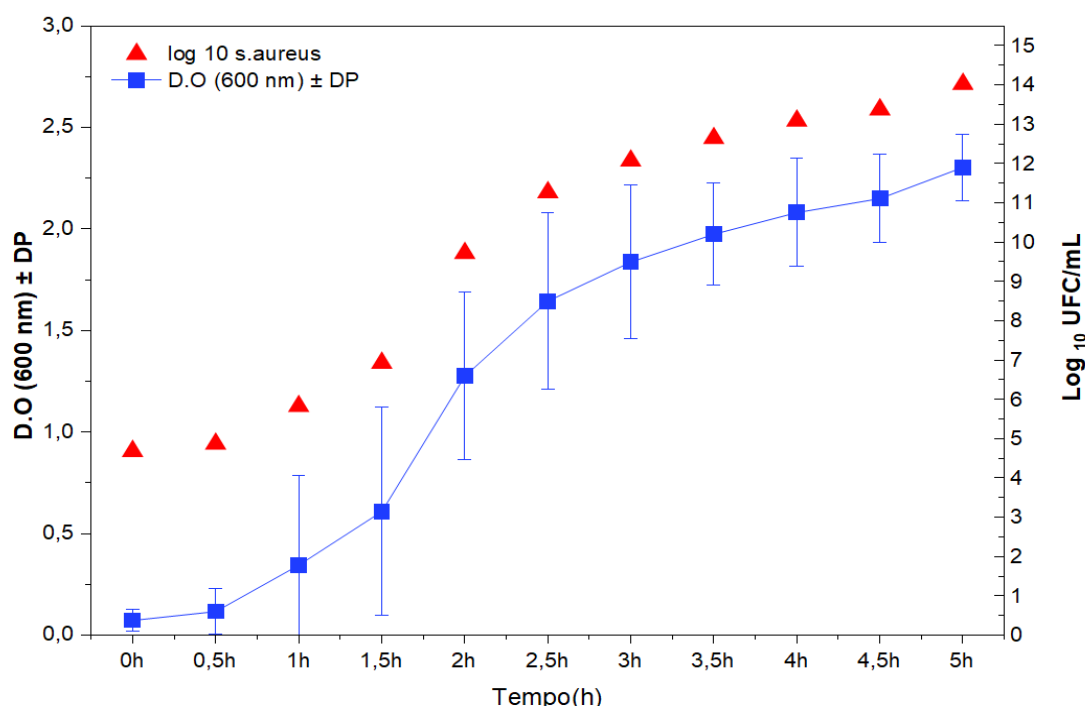


Figura 12: Crescimento microbiano e dinâmica de co-cultura entre *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus*. Crescimento de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 em culturas submersas em meio BHI, por 5 horas, a 37 °C e 150 rpm.

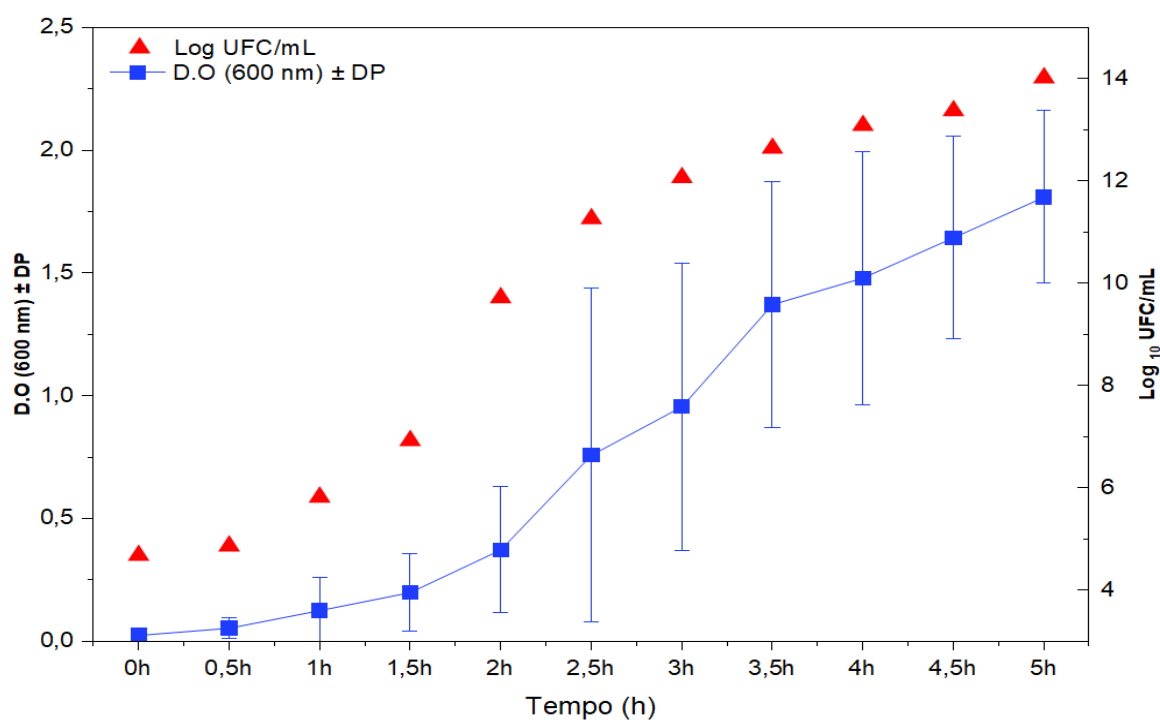


Figura 13: Crescimento microbiano e dinâmica de co-cultura entre *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus*. Crescimento de *Staphylococcus aureus* em meio BHI nas mesmas condições.

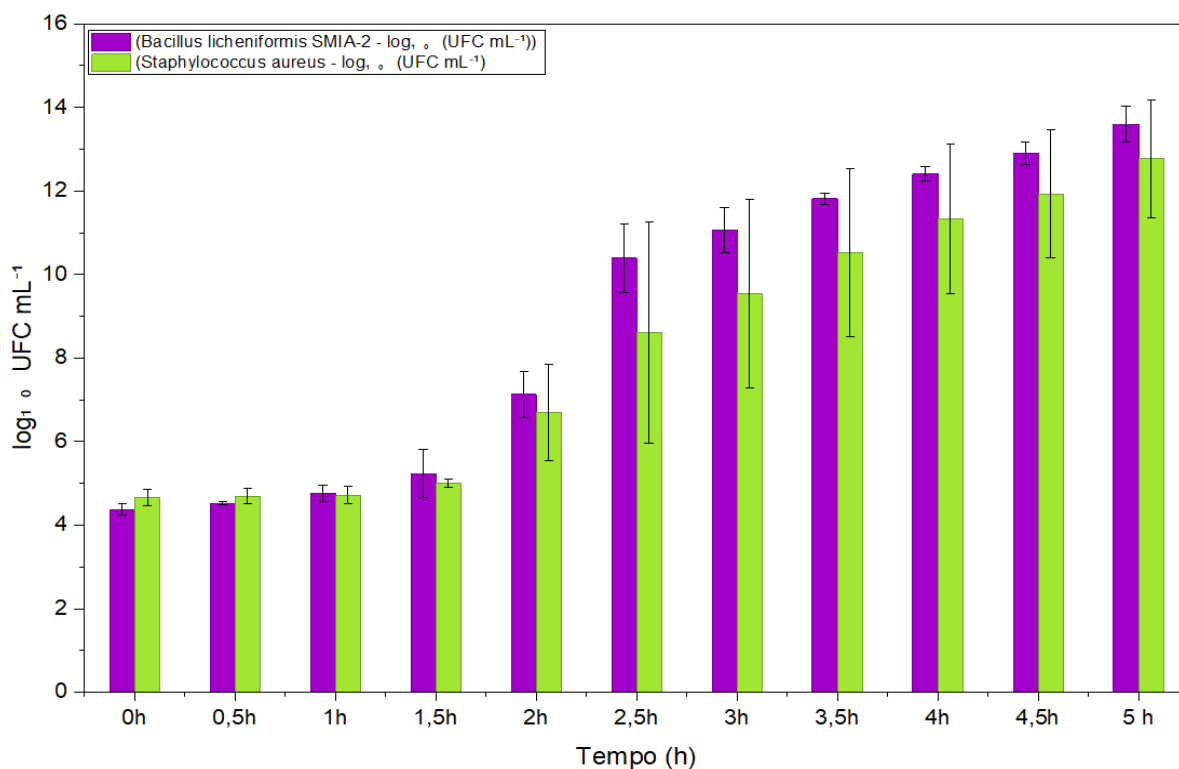


Figura 14: Crescimento microbiano e dinâmica de co-cultura entre *Bacillus licheniformis* SMIA-2 e *Staphylococcus aureus*. Recuperação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) em co-cultura com *Bacillus licheniformis* SMIA-2 após 3,5 horas de incubação. Os dados foram expressos como log₁₀ UFC mL⁻¹ (média ± desvio padrão, n = 3).

5.5. Atividade antagonista de filtrados de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 sobre *S. aureus*

A atividade antagonista de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo meio BHI sobre *S. aureus* foi avaliada comparando-se a cultura integral (células viáveis + metabólitos extracelulares) e o filtrado livre de células. De acordo com as imagens dos halos de inibição mostrados na Figura 15, a cultura integral apresentou halos de inibição mais expressivos contra o *S. aureus* que o filtrado livre de células. Estes resultados sugerem que o efeito antimicrobiano pode ser devido tanto à produção de metabólitos bioativos, quanto a mecanismos associados à presença celular.

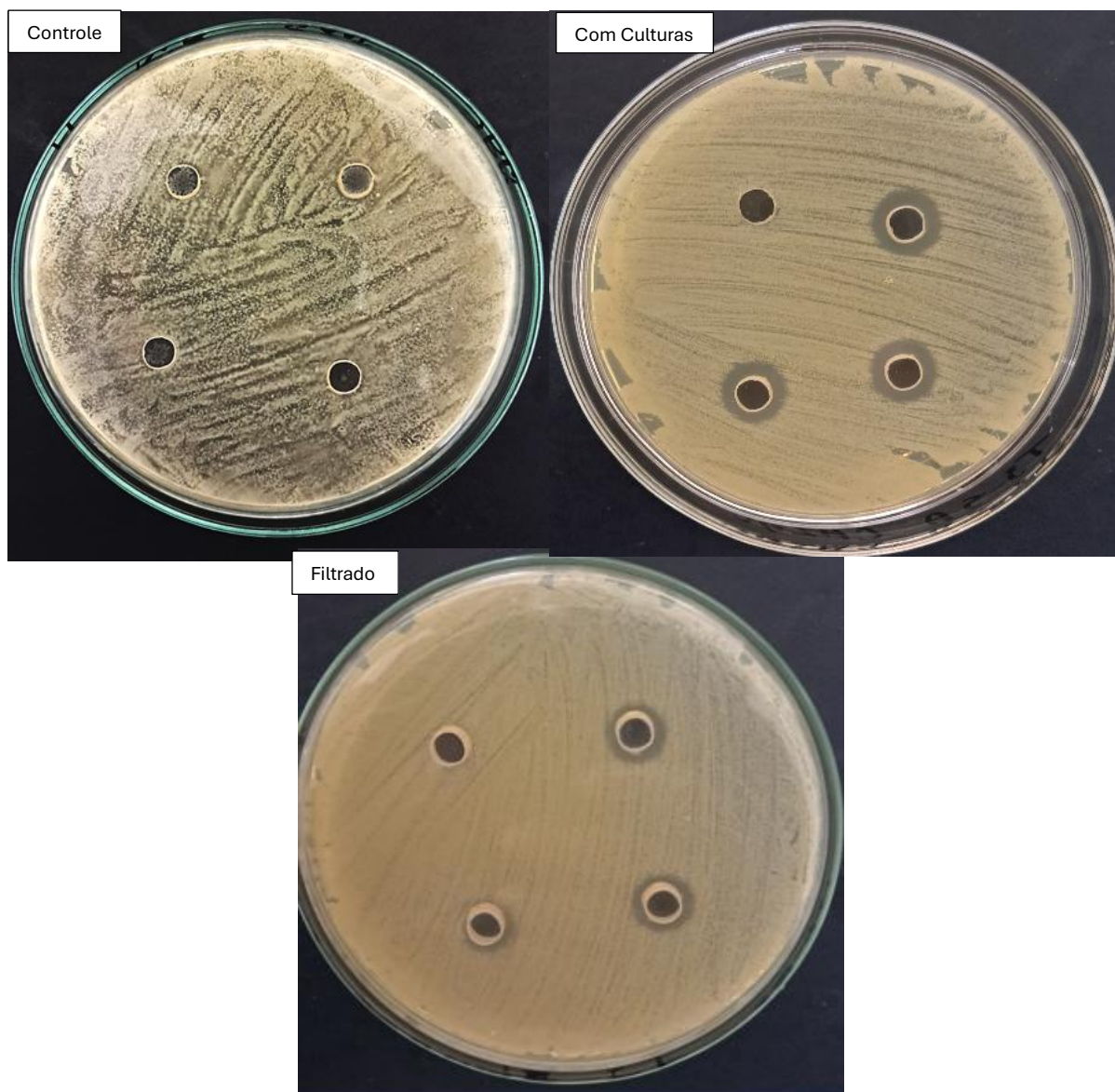


Figura 15: Imagens dos halos de inibição do *B. licheniformis* SMIA-2 sobre *S. aureus*: Controle (poço sem caldo do SMIA-2; Poço com adição de culturas do SMIA-2 contendo BHI; Poço com caldo filtrado de culturas do SMIA-2 (Sem células do SMIA-2).

Do ponto de vista aplicado, os resultados indicam duas estratégias tecnológicas distintas. Quando a cultura integral apresenta maior atividade, sua aplicação é mais indicada em formulações probióticas, aditivos zootécnicos ou agentes de biocontrole agrícola, nos quais a presença de células viáveis e esporos contribuem para colonização e produção contínua de metabólitos (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017). Por outro lado, a confirmação de atividade no sobrenadante reforça o potencial para desenvolvimento de pós-bióticos ou extratos antimicrobianos padronizados, voltados à conservação de alimentos ou formulações bioativas livres de células (ABRIOUEL *et al.*, 2011).

5.6. Atividade antagonista de culturas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo farinha da casca de maracujá e água de maceração de milho contra *Candida glabrata* (ATCC 2001)

A atividade antagônica de culturas submersas de *B. licheniformis* SMIA-2 contendo farinha da casca do maracujá e a água de maceração de milho sobre *Candida glabrata* (ATCC 2001) foi estudada. *Candida glabrata* é um dos patógenos oportunistas mais relevantes, ocupando posição de destaque como uma das principais causas de infecções invasivas, especialmente em ambientes hospitalares. Como pode ser observada na Figura 16, houve a formação de um halo de inibição bem-definido ao redor do poço contendo o *B. licheniformis* SMIA-2 frente a *Candida glabrata* (ATCC 2001), indicando a ocorrência de atividade antifúngica mediada por compostos difusíveis no meio de cultura.

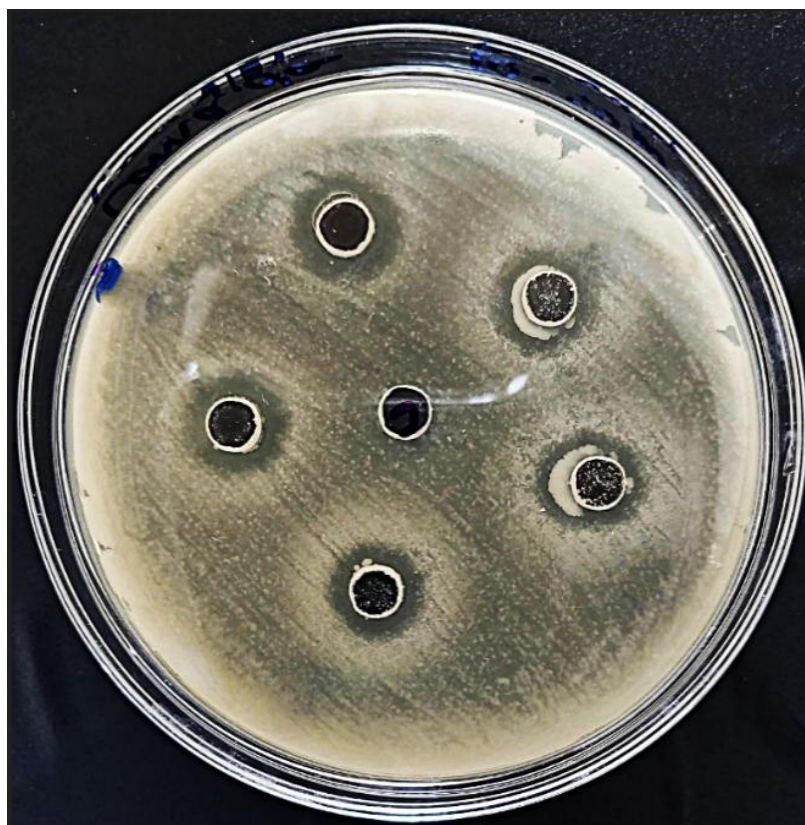


Figura 16: Halos de inibição do *Bacillus licheniformis* SMIA-2 sobre *Candida glabrata* (ATCC 2001) cultivados em meio TSY.

A presença de um halo bem-definido sugere que o efeito antagonista não dependeu exclusivamente do contato direto entre as células, mas que está associado à produção e liberação de metabólitos antifúngicos capazes de se difundir através do ágar em concentrações biologicamente ativas. Entre esses metabólitos, destacam-se os lipopeptídeos produzidos por espécies de *Bacillus*, como iturinas, fengicinas e surfactinas, amplamente descritos por sua ação antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos (BERNARDO, 2020).

6. CONCLUSÃO

A cepa *Bacillus licheniformis* SMIA-2 demonstrou atividade antagonista frente a *Staphylococcus aureus* em diferentes condições de cultivo, incluindo meios convencionais e meios alternativos contendo subprodutos agroindustriais. Em todas as condições avaliadas foi observada a formação de halos de inibição, indicando a produção de metabólitos capazes de interferir no crescimento bacteriano. A manutenção do antagonismo em meios com menor custo de produção e com alto teor nutricional evidencia a versatilidade metabólica do SMIA-2 e reforça seu potencial para aplicações biotecnológicas utilizando substratos alternativos.

Um aspecto relevante observado neste estudo foi que a formação de halos de inibição esteve diretamente associada à condição fisiológica do inóculo de *Staphylococcus aureus*. Verificou-se que a recuperação do microrganismo a partir de placas de ágar sangue foi determinante para a visualização da atividade antagonista, sendo que células provenientes desse meio apresentaram formação de halo de inibição. Em contraste, quando *S. aureus* foi obtido a partir de meio TSY ou de repicagens sucessivas, não houve formação de halo, evidenciando que o estado fisiológico e as condições prévias de cultivo do patógeno influenciam diretamente a expressão do efeito antagonista.

Outro aspecto inovador deste estudo foi a redução da temperatura de cultivo para 37 °C, inferior àquela frequentemente relatada na literatura para microrganismos termofílicos do gênero *Bacillus*, geralmente investigados em torno de 50 °C. Mesmo sob essa condição considerada subótima para o crescimento da cepa, foram observados resultados consistentes de antagonismo frente a *Staphylococcus aureus*,

indicando que a produção de metabólitos bioativos pelo SMIA-2 pode ocorrer em condições próximas às encontradas em microrganismos de relevância clínica.

A atividade antagonista também foi confirmada em ensaios de co-cultura submersa de *Bacillus licheniformis* SMIA-2 com *S. aureus* e por meio da utilização de filtrados livres de células, demonstrando que os compostos responsáveis pela inibição correspondem a metabólitos extracelulares difusíveis. Além disso, foi observada inibição do crescimento de *Candida glabrata* ATCC 2001, sugerindo que os metabólitos produzidos pela cepa podem apresentar amplo espectro de antagonismo, atuando tanto contra bactérias quanto contra leveduras de relevância clínica.

De forma geral, os resultados obtidos indicam que *Bacillus licheniformis* SMIA-2 representa uma fonte promissora de metabólitos extracelulares, configurando um estudo de prospecção biotecnológica de compostos antagonistas frente a microrganismos de interesse clínico. No entanto, a identificação dos compostos responsáveis pela atividade observada requer etapas adicionais de concentração, purificação e caracterização química, incluindo procedimentos de liofilização, análises cromatográficas por HPLC e identificação estrutural dos metabólitos produzidos, a fim de elucidar os mecanismos envolvidos no antagonismo e o potencial de aplicação desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriouel, H., Franz, C. M., Ben Omar, N., Gálvez, A. (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35:201-232. DOI doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- Adrio, J. L., Demain, A. L. (2014) Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4:117-139. DOI doi.org/10.3390/biom4010117.
- Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P. (2001) Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93:551-561. DOI doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:551.
- Alam, J., Olofintila, O. E., Moen, F. S., Noel, Z. A., Liles, M. R., Goodwin, D. C. (2025) Broad antibiosis activity of *Bacillus velezensis* and *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology*, 16:1636481. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2025.1636481.
- Ali, Z., Abdullah, M., Yasin, M. T., Amanat, K., Sultan, M., Rahim, A., Sarwar, F. (2025) Recent trends in production and potential applications of microbial amylases. *Protein Expression and Purification*, 227:106640. DOI doi.org/10.1016/j.pep.2024.106640.
- Al-Khamis, A., Abed, J., Sameer, H., Hassan, M. (2025) Biofilm formation and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates. *Academia Open*, 10. DOI doi.org/10.21070/acopen.10.2025.10792.
- Alzain, M., Daghistani, H., Shamrani, T., Almoghrabi, Y., Daghistani, Y., Alharbi, O. S., Sait, A. M., Mufrrih, M., Alhazmi, W., Alqarni, M. A., Saleh, B. H., Zubair, M. A., Juma, N. A., Niyazi, H. A., Halabi, W. S., Altalhi, R., Kazmi, I., Altayb, H. N., Ibrahem, K., Alfadil, A. (2025) Antimicrobial peptides: mechanisms and therapeutic potential. *Infection and Drug Resistance*, 18:4385-4426. DOI doi.org/10.2147/IDR.S514825.
- Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA. (2005) Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, 309:1245-1248. DOI doi.org/10.1126/science.1115109.

Bai X, Yi L, Zhao S, Xiu J, Li P, Shi R, Liang X, Zhang Y. (2025) Identification of *Bacillus subtilis* producing antifungal lipopeptides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 213:106470. DOI doi.org/10.1016/j.pestbp.2025.106470.

Basler, M., Ho, B. T., Mekalanos, J. J. (2013) Type VI secretion system. *Cell*, 152:884-894. DOI doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.042.

Bergey, D. H., Holt, J. G. (2000) *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins.

Bernardo S.P.C, Rosana A.R.R, de Souza A.N, Chiorean S, Martins M.L.L, Vederas J.C. (2020) Draft genome sequence of *Bacillus licheniformis* SMIA-2. *Microbiology Resource Announcements*, 9: e00173-20. DOI doi.org/10.1128/MRA.00173-20.

Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A., Monk, B. C. (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 22:291-321. DOI doi.org/10.1128/CMR.00051-08.

Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., Mahillon, J. (2019) Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10:302. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302.

Chen, M., Wang, H., Zhang, C., Zhang, Y., Sun, H., Yu, L., Zhang, Q., Chen, X., Xiao, H. (2025) Recent advances in antimicrobial lipopeptide fengycin secreted by *Bacillus*: structure, biosynthesis, antifungal mechanisms, and potential application in food preservation. *Food Chemistry*, 489:144937. DOI doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144937.

Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., Otto, M. (2021) Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12:547-569. DOI doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688.

Cletus P Kurtzman, Christie J Robnett, Relações filogenéticas entre leveduras do ' complexo *Saccharomyces* ' determinadas a partir de análises de sequências multigênicas, *FEMS Yeast Research* , Volume 3, Edição 4, junho de 2003, Páginas 417–432, DOI: [10.1016/S1567-1356\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00012-6).

Clinical And Laboratory Standards Institute (2023) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33. ed. Wayne: CLSI.

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3:777-788. DOI doi.org/10.1038/nrmicro1273.

COULTHURST, S. J. (2019) The type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology*, 165:503-515. DOI doi.org/10.1099/mic.0.000789.

Cruz, E., Ferreira, L., Costa, E., Ladeira, S., Moraes, L., Carvalho, R., Martins, M. (2025) Production of carboxymethyl cellulase by thermophilic *Bacillus licheniformis* SMIA-2 using pretreated sugarcane bagasse and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 12: e475. DOI doi.org/10.21472/bjbs.v12n26-020.

Cruz, E., Moraes, L. P., Costa, E. A., Barbosa, J. B., Martins, M. L. L. (2019) Optimization of food-waste based culture medium for cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and effect of divalent metal ions on activity and stability of the enzyme at higher temperatures. *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*, 6:331-337. DOI doi.org/10.22161/ijaers.6741.

Danilova, I., Sharipova, M. (2020) *Bacillus* enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11:1782. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782.

Elazzazy, AM, Mobarki, MO, Baghdadi, AM, Bataweel, NM, & Al-Hejin, AM (2024). Otimização das condições de cultivo e controle do processo em batelada para a produção aumentada de bacteriocina por espécies de *Bacillus*. *Microorganisms*, 12 (4), 651. DOI: 10.3390/microorganisms12040651

Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C and Panwar H (2017) *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 8:1490. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01490

Ferreira, L. P., Cruz, E., Martins, M. L. L. (2021) Protease production by *Bacillus licheniformis* SMIA-2. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 43: e55871. DOI doi.org/10.4025/actascibiols. v43i1.55871.

Frías-De-León MG, Hernández-Castro R, Conde-Cuevas E, García-Coronel IH, Vázquez-Aceituno VA, Soriano-Ursúa MA, Farfán-García ED, Ocharán-Hernández E, Rodríguez-Cerdeira C, Arenas R, Robledo-Cayetano M, Ramírez-Lozada T, Meza-Meneses P, Pinto-Almazán R, Martínez-Herrera E. (2021) *Candida glabrata* resistance and virulence. *Pharmaceutics*, 13:1529. DOI doi.org/10.3390/pharmaceutics13101529.

Ghanipour F, Nazari R, Aghaei SS, Jafari P. Effect of lipopeptide extracted from *Bacillus licheniformis* on the expression of *bap* and *luxI* genes in multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Amino Acids*. 2023 Dec;55(12):1891-1907. doi: 10.1007/s00726-023-03346-6.

Ghanipour F, Nazari R, Aghaei SS, Jafari P. (2023) Expression of lipopeptide genes in *Bacillus licheniformis* and evaluation of antimicrobial activity. *Amino Acids*, 55:1891-1907. DOI doi.org/10.1007/s00726-023-03346-6.

Gonzalez DJ, Haste NM, Hollands A, Fleming TC, Hamby M, Pogliano K, Nizet V, Dorrestein PC. Microbial competition between *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* monitored by imaging mass spectrometry. *Microbiology (Reading)*. 2011 Sep;157(Pt 9):2485-2492. doi: 10.1099/mic.0.048736-0.

Gow NAR, Latge JP, Munro CA. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*. 2017 May;5(3): 10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016.

Halvorsen TM, Schroeder KA, Jones AM, Hammarlöf D, Low DA, Koskiniemi S, Hayes CS. Contact-dependent growth inhibition (CDI) systems deploy a large family of polymorphic ionophoric toxins for inter-bacterial competition. *PLoS Genet*. 2024 Nov 26;20(11): e1011494. doi: 10.1371/journal.pgen.1011494. Erratum in: *PLoS Genet*. 2025 Oct 24;21(10): e1011922. doi: 10.1371/journal.pgen.1011922.

Hayes, C. S., Aoki, S. K., Low, D. A. (2010) Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annual Review of Genetics*, 44:71-90. DOI doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091449.

Hayes, C. S., Koskiniemi, S., Ruhe, Z. C., Poole, S. J., Low, D. A. (2014) Mechanisms and biological roles of contact-dependent growth inhibition systems. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4: a010025. DOI doi.org/10.1101/cshperspect.a010025.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., Peterson, S. B. (2010) Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8:15-25. DOI doi.org/10.1038/nrmicro2259.

Hira, J., Mahbub, N. B., Ali, J., Ahmad, R. (2025) Low-cost in-house reformulated brain heart infusion medium for effective planktonic growth and detection of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 16:1680006. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2025.1680006.

Hyatt, B. L., Rodrigo, M. K. D., Barnett, T. C. (2025) Impact of host and bacterial metabolism on antibiotic susceptibility. *Biochemistry*, 64:4555-4564. DOI doi.org/10.1021/acs.biochem.5c00436.

Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, Müller WH, Andel A, Verkleij AJ, Makarow M, Van Den Ende H, Klis FM. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol*. 2000 Feb;35(3):601-11. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01729.x

Karaoğlu, Ş. A.; Aydın, F.; Kiliç, S. S.; Kiliç, A. O. Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 33, n. 1, p. 7–13, 2003. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/medical/vol33/iss1/2/>. Acesso em: 29 abr. 2026.

Kaspar, F., Neubauer, P., Gimpel, M. (2019) Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a review. *Journal of Natural Products*, 82:2038-2052. DOI doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00210.

Kumar H, Guleria S, Kuča K, Peter L, Mohammed A, Malik T, Sethi N, Dhanjal DS, Kumar D, Harun HBC. Emerging prospects of *Bacillus* species in attaining the sustainable development goals. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2025 Nov 1;109(1):242. doi: 10.1007/s00253-025-13634-8.

Ladeira, S. A.; Cruz, E.; Delatorre, A. B.; Barbosa, J. B.; Leal Martins, M. L. Cellulase production by thermophilic *Bacillus* sp. SMIA-2 and its detergent compatibility. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, n. 2, 2015. Disponível em: <https://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/2014.12.008>.

Acesso em: 29 abr. 2026.

Liu, X., Gu, H., Wang, H., Tang, Z., Chen, S., Li, H., Quan, W. (2025) Optimization of fermentation conditions for the production of 2,3,5-trimethylpyrazine by recombinant *Bacillus licheniformis*. *Microorganisms*, 13 :1477. DOI doi.org/10.3390/microorganisms13071477.

Lowy, F. D. (1998) Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339:520-532. DOI doi.org/10.1056/NEJM199808203390806.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., Stahl, D. A. (2018) Brock biology of microorganisms. 15 ed. New York: Pearson.

Markélova, N., Chumak, A. (2025) Antimicrobial activity of *Bacillus* cyclic lipopeptides and their role in environmental adaptation. *International Journal of Molecular Sciences*, 26:336. DOI doi.org/10.3390/ijms26010336.

Mezghanni, H., Khedher, S. B., Tounsi, S., Zouari, N. (2012) Medium optimization of antifungal activity production by *Bacillus amyloliquefaciens* using statistical experimental design. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42:267-278. DOI doi.org/10.1080/10826068.2011.614989.

Missiakas, D. M., Schneewind, O. (2013) Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Current Protocols in Microbiology*, 28:9C.1.

Muras, A., Romero, M., Mayer, C., Otero, A. (2021) Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41:609-627. DOI doi.org/10.1080/07388551.2021.1873239.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. (2015) Medical microbiology. 8 ed. Philadelphia: Elsevier.

Nadell, C. D., Drescher, K., Foster, K. R. (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14:589-600. DOI doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84.

Nadell, C. D., Foster, K. R., Xavier, J. B. (2010) Emergence of spatial structure in cell groups and the evolution of cooperation. *PLoS Computational Biology*, 6:e1000716. DOI doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000716.

Navarro-García, F., Ruiz-Pérez, F., Cataldi, Á., Larzábal, M. (2019) Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: structure, role in virulence, and acquisition. *Frontiers in Microbiology*, 10:1965. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2019.01965.

Nicolas, G. M. (2025) Secondary metabolites from *Bacillus* spp. probiotics as potential treatments for multidrug-resistant pathogens. *Current Research in Microbial Sciences*, 8:100392. DOI doi.org/10.1016/j.crmicr.2025.100392.

Oliveira, L., Santos, M., Antón, A. (2025) Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus*. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 24:911-918. DOI doi.org/10.9771/cmbio.v24i3.70895.

Ongena, M., Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16:115-125. DOI doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016 Feb 15;62(4):e1-50. doi: 10.1093/cid/civ933.

Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Canton E, Castanheira M, Cuenca-Estrella M, Diekema DJ, Fothergill A, Fuller J, Ghannoum M, Jones RN, Lockhart SR, Martin-Mazuelos E, Melhem MS, Ostrosky-Zeichner L, Pappas P, Pelaez T, Peman J, Rex J, Szeszs MW. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2040-6. doi: 10.1128/JCM.00248-12.

Pfaller, M. A., Diekema, D. J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 20:133-163. DOI doi.org/10.1128/CMR.00029-06.

Phan, A.; Mijar, S.; Harvey, C.; Biswas, D. Staphylococcus aureus in Foodborne Diseases and Alternative Intervention Strategies to Overcome Antibiotic Resistance by Using Natural Antimicrobials. *Microorganisms* 2025, 13, 1732. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13081732>

Pierro, M. Del., Russo, P., Capozzi, V., Spano, G., Fiore, A. (2024) Bacillus species as a promising tool for sustainable biotechnology. *Microbiological Research*, 284:127381. DOI doi.org/10.1016/j.micres.2024.127381.

Riley, M. A., Wertz, J. E. (2002) Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56:117-137. DOI doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024.

Romo-Barrera, C. M., Castrillón-Rivera, L. E., Palma-Ramos, A., Castañeda-Sánchez, J. I., Luna-Herrera, J. (2021) Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis as probiotics inducing extracellular traps. *Microorganisms*, 9:2027. DOI doi.org/10.3390/microorganisms9102027.

Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of Candida glabrata collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Feb;49(2):668-79. doi: 10.1128/AAC.49.2.668-679.2005

Smith, D. R., Kearns, D. B., Burton, B. M. (2024) ComI inhibits transformation in Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 206: e00413-23. DOI doi.org/10.1128/jb.00413-23.

Stein, T. (2005) Bacillus subtilis antibiotics: structures and functions. *Molecular Microbiology*, 56:845-857. DOI doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.

Timmermans, B., De Las Peñas, A., Castaño, I., Van Dijck, P. (2018) Adhesins in Candida glabrata. *Journal of Fungi*, 4:60. DOI doi.org/10.3390/jof4020060.

To, H. T. A., Prakitchaiwattana, C. (2011) Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* P5-6 against *Staphylococcus aureus* on different states of medium. Food Agricultural Sciences and Technology, 7:47-57. Disponível em: <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/stej/article/view/244579>

Touaitia R, Mairi A, Ibrahim NA, Basher NS, Idres T, Touati A. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. Antibiotics (Basel). 2025 May 6;14(5):470. doi: 10.3390/antibiotics14050470.

Tran, C., Cock, I. E., Chen, X., Feng, Y. (2022) Antimicrobial Bacillus: metabolites and their mode of action. Antibiotics, 11:88. DOI doi.org/10.3390/antibiotics11010088.

Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, Holland TL, Fowler VG Jr. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nat Rev Microbiol. 2019 Apr;17(4):203-218. doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.

Vieco-Saiz, N., Lemâle, O., Evans, N. P., Quinteiro-Filho, W. M., Mellouk, A., Consuegra, J., Yakout, H., Goossens, T. (2025) Winning the battle of intestinal peace with *Bacillus*—a multifaceted approach to animal health, immunity, and future applications in monogastric livestock production. Frontiers in Microbiology, 16:1711747. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2025.1711747.

Willett, J. L., Gucinski, G. C., Fatherree, J. P., Low, D. A., Hayes, C. S. (2015) Contact-dependent growth inhibition toxins exploit multiple entry pathways. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 112:11341-11346. DOI doi.org/10.1073/pnas.1512124112.

Yin, Q.-J., Ying, H., Zhou, J. (2023) Species-specificity of the secondary biosynthetic potential in *Bacillus*. Frontiers in Microbiology, 14:1271418. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2023.1271418.

Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Wang, Q., Zhang, H., Liu, X. (2022) Co-culture strategies for the induction of microbial secondary metabolites: recent advances and perspectives. Frontiers in Microbiology, 13:905726. DOI doi.org/10.3389/fmicb.2022.905726.