



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

PEDRO VINÍCIUS BERTULINO DE MENEZES

**EFICIÊNCIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bacillus* NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Colletotrichum gloeosporioides***

São Cristóvão - SE
2024

PEDRO VINÍCIUS BERTULINO DE MENEZES

**EFICIÊNCIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Bacillus* NO CONTROLE BIOLÓGICO
DE *Colletotrichum gloeosporioides***

Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia Agrônômica – Universidade
Federal de Sergipe, como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

APROVADO em: 18/10/2024

ORIENTADOR: PAULO ROBERTO GAGLIARDI

COORIENTADOR: LUÍS DIEGO VIDAL SANTOS

Documento assinado digitalmente
 **PAULO ROBERTO GAGLIARDI**
Data: 31/10/2024 14:46:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi
(Orientador)

Documento assinado digitalmente
 **LUÍZ DIEGO VIDAL SANTOS**
Data: 31/10/2024 11:30:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luís Diego Vidal Santos
(Coorientador)

RENATA SILVA
MANN:06891271894
Assinado de forma digital por
RENATA SILVA
MANN:06891271894
Dados: 2024.10.31 14:40:48 -03'00'

Profa. Dra. Renata Silva-Mann
(Banca examinadora)

Documento assinado digitalmente
 **CRISLAINE COSTA CALAZANS**
Data: 31/10/2024 14:30:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Crislaine Costa Calazans
(Banca examinadora)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus e a São Francisco de Assis, que através dos seus ensinamentos me possibilitam enxergar a vida com sabedoria.

A minha mãe, Elizangela Bertulino, ao meu pai, Clebio Menezes e ao meu irmão Davi Bertulino. As minhas tias, Fátima e Lena, assim como aos meus avós maternos e paternos.

“Ninguém é suficientemente perfeito, que não possa aprender com o outro e, ninguém é totalmente estruído de valores que não possa ensinar algo ao seu irmão.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Escrever este agradecimento me faz voltar ao meu primeiro dia na Universidade, quando eu não sabia exatamente o que me esperava, mas tinha plena certeza de que faria valer cada segundo dessa nova jornada. Hoje, após cinco anos de intensas vivências, percebo que alcancei tudo o que sonhei naquela época. Publiquei artigos, participei de eventos, viajei pelo país, adquiri conhecimento e aprendi a ser cientista. Mas, acima de tudo, as conexões que construí foram a experiência mais profunda e valiosa.

Primeiramente, agradeço a Deus, que me guiou e trouxe sabedoria, especialmente nos momentos de maior dificuldade. Também agradeço a São Francisco de Assis, que me ensinou que a verdadeira prosperidade reside no compartilhar. Aos meus pais, Lana e Clébio, sou imensamente grato. Mesmo enfrentando tantos desafios, vocês me proporcionaram o que há de melhor para a formação do meu caráter. Ao meu irmão Davi, que é a maior joia da minha vida, deixo meu profundo agradecimento. Estendo ainda minha gratidão às minhas tias Fátima e Lena, que desde cedo me incentivaram a sonhar grande e acreditar que eu poderia ir aonde quisesse. Também agradeço aos meus avós, tios e primos.

Agradeço aos meus amigos de infância, Vitória, Devysson e Gustavo (*in memoriam*), que mesmo sem saberem diferenciar uma alface de um coentro, sempre participaram da minha vida e da carreira profissional. Vocês me deram força nos momentos em que nem eu acreditava em mim. Aos amigos que chegaram depois e compartilharam momentos significativos comigo, José Marques, Evinha, Maya, Raquel, Brenda, Emília e Vivi, meu muito obrigado. Também agradeço a Daniel e Diego, que foram as primeiras pessoas a me acolher na universidade.

Ao Departamento de Engenharia Agronômica, deixo meu agradecimento por ter me acolhido e proporcionado um ambiente de aprendizado essencial para a minha formação. Aos professores e cientistas que marcaram essa trajetória, especialmente Renata Silva-Mann, Aparecida Moreira, Pedro Viegas, Crislaine Calazans e, claro, ao meu orientador, Paulo Gagliardi, que tenho a honra de chamar de amigo e inspiração. Minha gratidão também ao Diego Vidal, que me ensinou a ser cientista e que tenho como um grande amigo.

Não poderia deixar de mencionar os amigos que o DEA me trouxe: Ramon Ramos, Felipe Mota, Pedro Dourado e Jeferson Maurício, por quem tenho profunda admiração. Por fim, agradeço a Gabriel Costa e Pedro Neto, os presentes mais valiosos destes últimos anos, que tantas vezes me deram forças para seguir em frente e que admiro profundamente, não apenas como profissionais, mas como seres humanos extraordinários.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	10
2.1 Biologia e características do fitopatógeno <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10
2.2 importância do controle biológico.....	12
2.3 Bioprospecção de novos agentes de biocontrole.....	13
2.4 Aplicações dos metabólitos secundários no controle biológico.....	15
2.5 Potencial biotecnológico do gênero <i>Bacillus</i> spp. no controle biológico.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Obtenção do fitopatógeno.....	17
3.2 Obtenção dos agentes de biocontrole:.....	18
3.3 Antagonismo por pareamento direto:.....	18
3.4 Antagonismo por metabólitos voláteis:.....	20
3.5 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Análise da interação entre os fatores:.....	21
4.2 Análise de eficiência entre as bactérias.....	24
4.3 Análise da taxa de inibição ao decorrer do tempo.....	28
4.3.1 Metabólitos voláteis.....	28
4.3.2 Confronto por pareamento direto.....	31
5. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS.....	31

RESUMO

A antracnose, causada pelo fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma das doenças de maior relevância econômica na agricultura, impactando negativamente a eficiência produtiva. Embora o controle químico seja amplamente utilizado devido à sua ação rápida e eficácia, ele está associado a problemas como o desenvolvimento de cepas resistentes e impactos ambientais e sociais adversos. Nesse contexto, o controle biológico surge como uma alternativa promissora, oferecendo eficiência alinhada à sustentabilidade. As bactérias do gênero *Bacillus* spp. têm sido extensivamente estudadas por sua capacidade de suprimir fitopatógenos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus velezensis* no controle biológico de *C. gloeosporioides*. Foram realizados testes de antagonismo por pareamento direto e ação de metabólitos voláteis, com confrontos em dois tempos: na fase 0, as bactérias e o fitopatógeno foram inoculados simultaneamente, enquanto na fase 24, as bactérias foram inoculadas 24 horas antes do fitopatógeno. Os diâmetros e raios das colônias foram medidos para calcular as taxas de inibição. Os resultados revelaram uma interação significativa entre as espécies bacterianas e o momento de aplicação, inibição de até 86,78% no pareamento direto e 26,38% para os metabólitos voláteis. Esses dados permitem corroborar o elevado potencial biotecnológico das bactérias do gênero *Bacillus* spp. no controle de *C. gloeosporioides* e resalta a importância de uma escolha criteriosa da cepa bacteriana e do momento adequado de aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Antracnose; *Bacillus* spp.; controle biológico; metabólitos voláteis.

ABSTRACT

Anthrachnose, caused by the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, is one of the most economically significant diseases in agriculture, negatively impacting productive efficiency. Although chemical control is widely used due to its rapid efficacy, it is associated with issues such as the development of resistant strains and adverse environmental and social impacts. In this context, biological control emerges as a promising alternative, offering efficiency aligned with sustainability. Bacteria of the genus *Bacillus* spp. have been extensively studied for their ability to suppress phytopathogens. The present study aimed to evaluate the efficiency of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus velezensis* in the biological control of *C. gloeosporioides*. Antagonism tests were conducted using direct pairing and volatile metabolite action, with confrontations at two time points: at phase 0, the bacteria and the pathogen were inoculated simultaneously, while at phase 24, the bacteria were inoculated 24 hours prior to the pathogen. Colony diameters and radii were measured to calculate inhibition rates. The results revealed a significant interaction between bacterial species and the application timing, with inhibition rates of up to 86.78% in direct pairing and 26.38% for volatile metabolites. These findings highlight the high biotechnological potential of *Bacillus* spp. in controlling *C. gloeosporioides*, emphasizing the importance of carefully selecting the bacterial strain and the appropriate application timing to maximize biological control efficiency.

Keywords: Anthracnose; *Bacillus* spp.; biological control; volatile metabolites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação do antagonismo por pareamento direto. A lista cinza se refere aos isolados bacterianos e o círculo preto ao fitopatógeno.

Figura 2- Representação do antagonismo por volatilidade dos metabólitos secundários. A lista cinza se refere aos isolados bacterianos e o círculo preto ao fitopatógeno.

Figura 3- Confrontos por pareamento direto e por metabólitos voláteis, respectivamente. a1- *B. subtilis* (Tempo 0), a2- *B. subtilis* (Tempo 24), b1- *B. pumilus* (Tempo 0), b2- *B. pumilus* (Tempo 24), c1- *B. velezensis* (Tempo 0), c2- *B. velezensis* (Tempo 24), d1- Controle (Tempo), d2- Controle (Tempo 24).

Figura 4- Regressão linear ao longo do tempo do experimento por metabólitos voláteis na fase de 0 horas (a) e na fase de 24 horas (b).

Figura 5- Regressão linear ao longo do tempo do experimento por pareamento direto na fase de 0 horas (a) e na fase de 24 horas (b).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise de variância da eficiência dos *Bacillus* spp, para o controle do fungo *C. gloeosporioides* via duas fases de aplicação no antagonismo por pareamento direto

Tabela 2- Análise de variância da eficiência dos *Bacillus* spp. para o controle do fungo *C. gloeosporioides* nas duas fases de aplicação no antagonismo por metabólitos voláteis.

Tabela 3- Teste posthoc da eficiência dos *Bacillus* spp. para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* via pareamento direto em duas fases de aplicação

Tabela 4- Teste posthoc da eficiência dos *Bacillus* spp. para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* via metabólitos voláteis em duas fases de aplicação

Tabela 5- Resultados dos parâmetros de regressão da eficiência da aplicação dos *Bacillus*, associados às duas fases de aplicação, do para o controle do fungo *C. gloeosporioides*

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional, juntamente com a diminuição das áreas agricultáveis, tem exigido cada vez mais uma agricultura com alta eficiência em termos de produtividade. Para isso, diversas variáveis devem ser levadas em consideração, como as condições edafoclimáticas, adubação, tratos culturais, variedades do cultivo, além do manejo das pragas e doenças. Entre essas variáveis, as doenças vêm ocasionando sérios prejuízos às produções agrícolas e, conseqüentemente, resultando em perdas econômicas significativas, estimando-se que cerca de 30% da produção agrícola mundial sofre com problemas fitossanitários. Reconhecendo a urgência dessa problemática, surge a necessidade de desenvolver estratégias que mitiguem os efeitos dos problemas fitopatológicos, visando alcançar a melhor eficiência produtiva.

Entre as diversas doenças, a antracnose é considerada uma das mais relevantes, ocasionando danos desde a floração até a fase de pós-colheita. Causada por um complexo de espécies do gênero *Colletotrichum*, como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *C. fructicola*, *C. truncatum* e *C. siamensis*. Essa doença é típica de regiões tropicais, sendo favorecida em condições de elevada temperatura e alta umidade. Ela atinge diversas culturas agrícolas, como mamão, maracujá, citros, manga, soja, feijão, dentre outras. Nas plantas infectadas, com o auxílio de estruturas especializadas e a ação de enzimas, *Colletotrichum* spp. invade o tecido vegetal dos hospedeiros, comprometendo os processos fisiológicos. Os sintomas incluem manchas necróticas nos tecidos, queda prematura de flores, folhas e frutos, além do apodrecimento dos frutos na fase de pós-colheita.

Visando mitigar os efeitos do *Colletotrichum* spp., o controle químico comumente é empregado, através da aplicação de fungicidas sistêmicos ou de contato, atuando na interrupção do ciclo de vida do fitopatógeno e na prevenção de novas infecções. A aplicação desses produtos proporciona uma proteção rápida e eficaz, quando aplicados corretamente. No entanto, a utilização excessiva ocasiona implicações significativas, principalmente no desenvolvimento de resistência do fitopatógeno, limitando a eficácia do controle químico e, conseqüentemente, no manejo da doença. Os aspectos ambientais também devem ser considerados, uma vez que as contaminações desses produtos podem prejudicar a homeostase do agroecossistema. Além disso, os aspectos sociais também são relevantes, já que os trabalhadores que manuseiam esses produtos podem sofrer consequências severas em sua saúde.

Nesse contexto, o controle biológico vem ganhando protagonismo no manejo de doenças, unindo eficiência na supressão do fitopatógeno e sustentabilidade. Essa abordagem utiliza agentes de biocontrole, como fungos, bactérias e leveduras, que atuam por meio de diversos mecanismos para inibir a atividade do fitopatógeno. Entre esses mecanismos, destacam-se a competição por nutrientes e espaço, parasitismo, indução de resistência sistêmica e a ação dos metabólitos secundários. A identificação de microrganismos com potencial para o controle biológico começa com o processo de bioprospecção, que envolve testes de antagonismos entre fitopatógenos e cepas isoladas de diferentes ambientes, como partes das plantas e da rizosfera. Diante dos seus benefícios, a aceitação do controle biológico tem aumentado, motivando investimentos em pesquisas que buscam entender os mecanismos de ação dos agentes de biocontrole em condições adversas.

Existem inúmeros microrganismos consolidados como agentes de biocontrole, em decorrência da sua eficiência na supressão dos fitopatógenos. Dentre esses, as bactérias do gênero *Bacillus* merecem destaque, principalmente pela sua capacidade em produzir diferentes metabólitos secundários que inibem agentes fitopatogênicos, como fungos do gênero *Colletotrichum*. Além dos metabólitos secundários, essas bactérias possuem outros mecanismos que aumentam a sua versatilidade no controle biológico, como produção eficiente de biofilme, alta capacidade em competir por nutrientes e indução de resistência sistêmica. Junto desses benefícios, *Bacillus* spp. possuem crescimento rápido e são resilientes a condições adversas, facilitando na formulação de produtos comerciais.

Com base nesses aspectos, o desenvolvimento de pesquisas científicas torna-se essencial na consolidação do controle biológico, contribuindo para o aumento na eficiência da produção agrícola atrelada à sustentabilidade. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência das bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus velezensis* no controle biológico *in vitro* do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, por meio de métodos de pareamento direto e pela ação dos metabólitos secundários voláteis.

2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 Biologia e características do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos maiores desafios na agricultura, ocupando a oitava posição no grupo de fungos fitopatogênicos mais importantes do mundo (Wang *et al.*, 2020). O fungo pode ocasionar podridões em centenas de hospedeiros de importância econômica, principalmente em culturas tropicais e subtropicais (Rajaofera *et al.*,

2019). De acordo com Dowling *et al.* (2020), apesar da sua importância como fitopatógeno, o gênero *Colletotrichum*. apresenta aspectos que aumentam a complexidade e dificuldade na sua compreensão, como diferenciações morfológicas limitadas entre as espécies e variações na patogenicidade.

As espécies pertencentes ao gênero possuem a capacidade de serem hemibiotróficas, envolvendo processos biomoleculares que regulam esse estilo de vida e que são estudados há muito tempo pela comunidade científica (Talhinhas; Baroncelli, 2021). Segundo Li *et al.* (2024), os apressórios formados a partir dos conídios germinativos iniciam o processo de infecção, através da penetração das células epidérmicas. Nessa fase, também são formadas hifas primárias e produzidos metabólitos secundários que auxiliam na estabilização da fase biotrófica. Por fim, surgem as hifas necrotróficas que levam a destruição dos tecidos dos hospedeiros por meio de enzimas e toxinas, sendo essa fase conhecida como necrotrófica.

A antracnose e as podridões na fase de pós-colheita são as doenças típicas do *Colletotrichum* spp., levando à perda no rendimento de diversas culturas de alto valor agregado em vários lugares do mundo (Bhunjun *et al.*, 2021). Essa habilidade em infectar diferentes culturas é reflexo da alta plasticidade genética do fitopatógeno, que possui a capacidade de se adaptar em diferentes condições ambientais e fisiológicas dos hospedeiros. Em decorrência desse aspecto, os avanços nos métodos moleculares para caracterização e identificação de espécies de fungos contribuíram significativamente na compreensão da diversidade de *Colletotrichum* spp. (Zapata *et al.*, 2024).

Os sintomas característicos do fitopatógeno podem apresentar variações de acordo com os hospedeiros e as condições climáticas impostas, mas, em geral, os sintomas mais visíveis são lesões afundadas que variam entre marrom e preto, contendo massas conidiais na superfície do tecido vegetal (Zakaria, 2021). Em casos severos, pode ocorrer a queda prematura das flores e folhas, ocasionando perdas econômicas significativas. Além disso, no caso dos frutos, essas lesões na superfície impactam tanto as características organolépticas quanto as estéticas, resultando em redução na valoração dos produtos.

Diante dos impactos negativos que *Colletotrichum* spp. causam na produtividade das culturas, torna-se necessária a implantação de métodos de controle eficazes. Historicamente, os fungicidas têm sido amplamente utilizados para combater as doenças e garantir a qualidade das lavouras. No entanto, o uso indiscriminado desses produtos levou ao surgimento de problemas, como o desenvolvimento de cepas resistentes, diminuindo sua eficiência. De acordo com Brauer *et al.* (2019), a pressão seletiva exercida sobre os fungos pela exposição excessiva aos fungicidas resulta na seleção de uma ou mais cepas resistentes,

permitindo que sobrevivam na presença desses produtos. Além disso, os autores enfatizam que essas cepas, visando garantir sua sobrevivência, tendem a apresentar ciclo de vida curto e esporulação abundante.

Com o objetivo de desenvolver métodos de controle que sejam eficazes contra o fitopatógeno e, ao mesmo tempo, promovam a sustentabilidade e a saúde humana, diversos métodos vêm ganhando protagonismo. Os estudos de Obianom e Romanazzi (2019), destacam que a utilização da quitosana reduziu significativamente a incidência de antracnose em abacates inoculados com o *Colletotrichum gloeosporioides*. Já Antonioli *et al.* (2020), demonstrou a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial do capim-limão no controle *in vitro* do *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Por fim, a utilização de controle biológico também vem ganhando protagonismo no controle do *Colletotrichum* spp. através de diversos agentes de controle, como *Bacillus velezensis*, *Trichoderma asperellum* e *Staphylococcus sciuri* (Alijani *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2020; Loc *et al.*, 2020)..

2.2 importância do controle biológico

A ação dos fitopatógenos na agricultura se constitui como uma ameaça significativa na produtividade agrícola, em decorrência dos distúrbios fisiológicos que ocasionam nas plantas, resultando em importantes impactos econômicos e ambientais negativos (Bonaterra *et al.*, 2022). Além disso, a alta velocidade das mudanças climáticas podem agravar ainda mais as consequências dessa realidade. De acordo com Silva *et al.* (2019), a alteração de fatores abióticos, como temperatura, umidade, precipitação e radiação, influenciam de maneira significativa no ciclo de vida do patógeno e, conseqüentemente, em sua virulência.

Visando controlar essas doenças, os fungicidas são frequentemente utilizados, apresentando rápida ação e alta eficiência no controle dos fitopatógenos. No entanto, não são consideradas alternativas sustentáveis em virtude dos elevados custos econômicos e ambientais (Morales-Cedeño *et al.*, 2021). Zin e Badaluddin (2020), demonstraram que o gerenciamento inadequado dos fungicidas ocasionam diversas consequências negativas, como a exposição e eliminação de organismos benéficos devido à alta toxicidade, bem como a contaminação do solo e de corpos d'água. Entre essas consequências, destaca-se a indução de resistência dos fitopatógenos às moléculas dos fungicidas, consequência da aplicação contínua, o que torna ainda mais desafiador o controle das doenças (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2023).

Em decorrência desse cenário, o controle biológico vem ganhando protagonismo no manejo das doenças, sendo utilizadas diversas espécies de bactérias, fungos, leveduras, vírus

e nematoides como agentes de biocontrole das doenças das culturas agrícolas (Nu *et al.*, 2020). Bortoloti e Sampaio (2024) demonstraram que o Brasil, um dos maiores produtores e consumidores de bioinsumos no mundo, durante a safra de 2022/2023 movimentou U\$827 milhões no país, o que representa um aumento de 52% quando comparado ao ciclo de produção anterior. Em virtude dos seus inúmeros benefícios, a utilização do controle biológico na produção agrícola tende a ser maximizado, exigindo esforços adicionais no seu aprimoramento, principalmente através do investimento no desenvolvimento de novos conhecimentos científicos.

Os benefícios atribuídos ao controle biológico são diversos, demonstrando ser uma solução econômica, ecológica e de longo prazo na proteção das culturas contra a ação dos fitopatógenos (Jaiswal *et al.*, 2022). A adoção do controle biológico em um agroecossistema viabiliza a redução das populações de fitopatógenos sem o uso de fungicidas, promovendo, assim, a homeostase e o aumento da biodiversidade. Nessa perspectiva, He *et al.* (2021) ressaltam que o sucesso do controle biológico no agroecossistema promove a resiliência, sendo esse um fator essencial para garantir a estabilidade da produção agrícola.

Além dos benefícios já mencionados, um dos principais aspectos do controle biológico está relacionado com a versatilidade dos agentes de biocontrole, que utilizam de uma série de mecanismos para controlar eficientemente o fitopatógeno. Entre esses, os mais conhecidos são o parasitismo, competição por nutrientes e espaço, antibiose e indução de resistência da planta contra as doenças (Tyagi *et al.*, 2024). Essa versatilidade é fundamental para o sucesso do controle biológico a longo prazo, uma vez que reduz as chances de um fitopatógeno se tornar resistente aos agentes biocontroladores. Isso ocorre porque, caso o fitopatógeno adquira resistência a um determinado mecanismo, o agente biocontrolador é capaz de ativar outros mecanismos para efetuar o controle.

Atualmente, existem microrganismos consolidados no controle biológico das doenças, sendo aplicados mundialmente nas produções agrícolas. Espécies de fungos do gênero *Trichoderma* destacam-se como um dos mais reconhecidos, apresentando multifuncionalidades contra os fitopatógenos, como parasitismos, produção de metabólitos secundários, indução de resistência nas plantas e alto desempenho na competição por recursos naturais (Limdolthamand *et al.*, 2023). Outro gênero bem consolidado no controle biológico é o *Bacillus*, que possui a capacidade de produzir metabólitos secundários antimicrobianos e induz ao aumento da resistência nas plantas contra os fitopatógenos (Tyagi *et al.*, 2024).

2.3 Bioprospecção de novos agentes de biocontrole

O controle biológico de doenças de plantas baseia-se na utilização de microrganismos que inibam de maneira eficaz os fitopatógenos. Nesse contexto, a exploração da diversidade microbiana proporciona uma visão abrangente do potencial biotecnológico dos microrganismos, sendo uma etapa essencial para atingir o êxito na implantação do controle biológico (Fonseca *et al.*, 2024). Esse processo é conhecido como bioprospecção, sendo definido como a busca por microrganismos que possuam habilidades biotecnológicas novas ou aprimoradas de interesse, como o controle de doenças e a solubilização de minerais (Tatau-núñez *et al.*, 2024). Esse processo pode ser realizado a partir de diversos materiais, como partes das plantas, rochas e amostras de solo.

Nesse contexto, os microrganismos endofíticos vêm ganhando destaque no processo de bioprospecção destinada ao controle biológico de doenças. De acordo com Fontana *et al.* (2021), os microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar prejuízos aos hospedeiros, como também não desenvolvem estruturas externas que sejam visíveis. Além disso, Ribeiro *et al.* (2018) abordam em seus estudos que a maioria das plantas estão associadas a microrganismos endofíticos específicos, que desempenham um papel importante na proteção e manutenção das plantas. Destacando que nessa estreita associação, os endofíticos desenvolveram diversos mecanismos específicos, como a produção de enzimas para penetrar os tecidos dos hospedeiros sem ocasionar danos.

Na seleção desses microrganismos, é fundamental compreender as suas exigências edafoclimáticas. Nesse sentido, compreende-se que a utilização de microrganismos nativos atende na melhor na inibição do fitopatógeno, além de reduzir as perturbações no microbiana nativo (Akoijam; Joshi, 2023). Com base nisso, a realização de bioprospecção personalizada é essencial, uma vez que busca identificar os microrganismos que sejam nativos dos agroecossistemas afetados. Dessa maneira, o agente biocontrolador já será adaptado às condições edafoclimáticas existentes, minimizando os riscos de interferências durante a sua atuação no controle biológico da doença.

Os métodos tradicionalmente utilizados para realizar a bioprospecção são limitados, já que não conseguem expressar uma quantidade significativa de microrganismos quando comparada a diversidade microbiana existente. Diante disso, o campo da genética surge como um forte aliado nesse processo, ampliando as buscas por microrganismos com habilidades biotecnológicas. Nos estudos de Lauritsen *et al.* (2021), é possível observar a utilização da

metagenômica como uma ferramenta promissora no processo de bioprospecção de diversas espécies do gênero *Pseudomonas*. a partir de amostras de solo.

2.4 Aplicações dos metabólitos secundários no controle biológico

O controle biológico exercido pelos agentes de biocontrole podem ser exercidos por diversos mecanismos, sendo a ação dos metabólitos secundários um dos mais relevantes. Os metabólitos secundários proporcionam vantagens competitivas às cepas produtoras, servindo como armas biológicas contra os fitopatógenos (Kiesewalter *et al.*, 2021). Além disso, os metabólitos secundários sintetizados pelos microrganismos, especialmente os endofíticos, também podem contribuir no melhor desenvolvimento das plantas (García-latorre *et al.*, 2024). Destacando que além dos agentes de biocontrole, os microrganismos fitopatogênicos também têm a capacidade de sintetizar essas substâncias, garantindo assim a sua sobrevivência. Dessa maneira, durante o processo de bioprospecção, é fundamental identificar agentes de biocontrole que sintetizem compostos com efeitos inibitórios superiores aos do fitopatógeno.

Entre os principais microrganismos sintetizadores de metabólitos secundários estão as bactérias *Bacillus* spp. e os fungos *Trichoderma* spp., ambos com capacidade de inibir uma ampla gama de fitopatógenos. No estudo de Su *et al.* (2024), foi demonstrado que os *Bacillus* spp. produzem metabólitos secundários que possuem papéis decisivos no antagonismo contra bactérias e fungos fitopatogênicos, além de destacar que o sequenciamento do genoma proporciona a identificação dos genes responsáveis pela síntese. Já Oliveira *et al.* (2023) evidenciou em seus experimentos o efeito antagônico do *Trichoderma* spp. contra o nematoide *Pratylenchus brachyurus*, por meio da ação dos metabólitos secundários, como terpenóides, pironas e esteroides.

O campo da genética, especialmente na identificação dos grupos responsáveis pela síntese dos metabólitos secundários, tem um papel essencial no rastreamento e análise de microrganismos com atividade antimicrobiana contra os fitopatógenos (Le Han *et al.*, 2022). Junto a isso, as ferramentas de metagenômica também contribuem neste aspecto, permitindo explorar a diversidade microbiana de diferentes ambientes e possibilitando a construção de um reservatório de genes que estejam responsáveis pela codificação de metabólitos secundários com atividades antimicrobianas. As ferramentas genéticas são fortes aliadas na consolidação do controle biológico, possibilitando uma compreensão mais profunda dos mecanismos de antagonismo.

Assim como a genética, a metabolômica também é uma ferramenta essencial na compreensão dos metabólitos secundários, permitindo a identificação e quantificação dos compostos bioativos de interesse (Witte *et al.*, 2021). De acordo com Nimbeshaho *et al.* (2024), a combinação entre a genômica e a metabolômica propicia a compreensão da atividade antimicrobiana dos compostos com maior consistência, propiciando a identificação precisa de microrganismos com potencial para serem considerados agentes de biocontrole. O êxito dessa combinação pode ser observado através dos estudos de Tsalgatiidou *et al.* (2022), pelo qual observou no *Bacillus haloterans* o rico arsenal de grupo de genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários, bem como a capacidade de secretar diversos compostos contra o *Botrytis cinerea*, considerado um fitopatógeno de pós-colheita.

2.5 Potencial biotecnológico do gênero *Bacillus* spp. no controle biológico

O êxito do controle biológico surge a partir da seleção criteriosa de agentes biocontroladores eficientes. Dentre esses, destacam-se as espécies do gênero *Bacillus* spp por sua capacidade de controlar diversas doenças na produção agrícola (Rong *et al.*, 2020). De acordo com Ngalimat *et al.* (2021), o gênero *Bacillus* spp. é composto por bactérias gram-positivas, com motilidade garantida por flagelos e formadoras de endósporos. A formação dos endósporos está diretamente relacionada com a capacidade dessas bactérias sobreviverem em ambientes com diferentes condições, como solo, ambientes aquáticos e até fezes de animais. Além disso, a eficiência na formação de biofilmes também desempenha um papel essencial na sobrevivência das espécies em condições adversas (Ayla *et al.*, 2020).

Em decorrência da ampla diversidade de espécies e do seu grande potencial de aumentar a produtividade agrícola e controlar diversas doenças, o gênero *Bacillus* spp. tem ganhado protagonismo em várias bioformulações comerciais (Zaid *et al.*, 2022; Jamali *et al.*, 2020). Essas habilidades são atribuídas na capacidade das bactérias produzirem diversos metabólitos secundários, incluindo policetídeos, terpenos, sideróforos e peptídeos, os quais são codificados por grandes grupos de genes biossintéticos (Kiesewalter *et al.*, 2021). Além da ação dos metabólitos secundários, o *Bacillus* spp. atua no controle biológico por meio de outros mecanismos, como competição por nutrientes e indução de resistência sistêmica, podendo ser exercidas isoladamente ou em conjunto (Balderas-ruíz *et al.*, 2020).

Diversos estudos comprovam a eficiência das diversas espécies de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças. Rong *et al.* (2020) demonstraram a forte eficiência inibitória do *B. safensis* contra o *Magnaporthe oryzae*, agente causador da brusone do arroz. Da mesma forma, Wang *et al.* (2021) comprovaram a capacidade do *B. halotolerans* no controle do

Botrytis cinerea, responsável pelo mofo cinzento na pós-colheita do morango. Além disso, Elsayed *et al.* (2020) evidenciaram que o *B. velezensis* conseguiu realizar o controle da *Ralstonia solanacearum*, agente causador da murcha do tomateiro. Por fim, Zhang *et al.* (2020) demonstraram a eficiência do *B. subtilis* no controle da *Alternaria solani*, fitopatógeno responsável pela requeima da batata.

Além do seu potencial no controle dos fitopatógenos, diversos estudos comprovam que as espécies do gênero *Bacillus* spp. também contribuem significativamente para o crescimento das plantas. El-gendi *et al.* (2022) demonstraram que o *B. subtilis* auxiliou plantas de tabaco na promoção da aquisição de nutrientes, mediado através da ação de biomoléculas. De maneira semelhante, Mosela *et al.* (2022) mostraram que o *B. velezensis* contribuiu tanto na promoção do crescimento na cultura da soja e do milho, como também na maior eficiência de absorção do fósforo. Além desses, Witkowicz *et al.* (2021) evidenciaram que o *B. subtilis* contribuiu na eficiência fotossintética e, consequentemente, no maior rendimento na cultura do trigo.

Com base nesses aspectos, é fundamental ressaltar a necessidade de compreender com profundidade os diversos mecanismos diretos e indiretos do gênero *Bacillus* spp., além de aprofundar os conhecimentos acerca das interações entre as bactérias e as plantas, principalmente sob estresses bióticos e abióticos (Mohamad *et al.*, 2020). Além de possibilitar o aumento no rendimento das culturas agrícolas, os aprofundamentos nos conhecimentos acerca desse gênero também contribuem para o estabelecimento de um sistema agrícola que integra abordagens ecologicamente corretas (Kumar *et al.*, 2020).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e Bioinsumos (LAFiBiO), localizado na Universidade Federal de Sergipe, *campus* São Cristóvão. Foram utilizados 2 métodos *in vitro*, visando avaliar a eficiência no controle biológico do *C. gloeosporioides*, sendo por meio de pareamento direto e pela volatilidade dos metabólitos secundários.

Em conformidade com a Lei da biodiversidade Brasileira (Lei nº 13.123/15), todas as informações referentes às execuções e resultados obtidos da pesquisa, foram devidamente cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

3.1 Obtenção do fitopatógeno

O *C. gloeosporioides* foi o fitopatógeno escolhido para realização da pesquisa, pelo qual foi adquirido através do acervo de preservações do LAFiBiO. O isolado fúngico foi reativado em placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), acondicionado em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 28 °C por um período de 7 dias. A fim de garantir a pureza, após cada reativação, a morfologia do fitopatógeno foi caracterizada com o auxílio de microscópio óptico, visando identificar suas estruturas reprodutivas. Além disso, para garantir a disponibilidade ao longo do experimento, o fungo foi preservado em Castellani e Glicerol a 30% em ambiente refrigerado a 4°C e a -10° respectivamente.

3.2 Obtenção dos agentes de biocontrole:

Neste estudo, foram selecionadas 3 bactérias como potenciais agentes de biocontrole, sendo elas: *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. velezensis*. Os isolados bacterianos foram reativados em placas de Petri contendo meio sólido TSA (*Tryptone Soya Agar*), acondicionadas em BOD a 28 °C por um período de 2 dias. Visando garantir a pureza, todas as reativações realizadas no experimento foram avaliadas em relação a ausência de contaminantes, coloração de Gram e a formação de colônia. Além disso, todos os isolados bacterianos foram preservados em meio de Castellani e em glicerol a 30%, sendo armazenados em condições refrigeradas de 4 °C e -10 °C, respectivamente, para assegurar sua viabilidade e disponibilidade ao longo do período de pesquisa.

3.3 Antagonismo por pareamento direto:

Para compreender a capacidade de inibição, os isolados bacterianos selecionados foram submetidos ao método de pareamento direto com o *C. gloeosporioides* em meio BDA. Para isso, foi inserido um disco de 5mm de diâmetro do meio de cultura contendo estruturas micelial do fitopatógeno no centro da placa de Petri e a riscagem parcial da placa dos isolados bacterianos. O tratamento controle do experimento foi representado pelo fitopatógeno inserido na placa com meio BDA sem a presença das agentes de controle. As placas foram acondicionadas em BOD a 28 °C por um período de 8 dias.

Visando compreender a eficiência da bactéria na produção de metabólitos secundários, a execução do experimento foi realizada em dois tempos diferentes, sendo representados em T0 (Tempo 0) e T24 (Tempo 24). No T0 a riscagem dos isolados bacterianos e a inserção do disco de meio com micélio do patógeno foram realizados simultaneamente. Já no T24, a riscagem dos isolados bacterianos foi realizada com 24 horas de antecedência da inserção do fitopatógeno. Destacando que cada tempo teve seus

respectivos tratamentos controles, pelos quais os discos com estruturas do fitopatógeno também foram colocados ao mesmo tempo que os isolados bacterianos.

Para avaliação da eficiência no controle do fitopatógeno, foram realizados registros fotográficos dos pareamentos e as imagens foram submetidas ao *software* ImageJ, mensurando os diâmetros das colônias dos fitopatógenos. As coletas de dados foram realizadas com intervalos de dois dias até completar os oito dias do experimento. Os dados estimaram a porcentagem de inibição utilizando a fórmula:

$$\%Inibição = (C - T / C) \cdot 100 \text{ (Eq. 1)}$$

Onde: C se refere ao crescimento do controle (mm) e o T ao crescimento do tratamento (mm).

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos, sendo distribuídos quatro para o T0 (controle, *B. pumilus* x *C. gloeosporioides*, *B. subtilis* x *C. gloeosporioides*, *B. velezensis* x *C. gloeosporioides*) e quatro para o T24 (controle, *B. pumilus* x *C. gloeosporioides*, *B. subtilis* x *C. gloeosporioides*, *B. velezensis* x *C. gloeosporioides*), com cinco repetições por tratamento.

3.4 Antagonismo por metabólitos voláteis:

Além do pareamento direto, também foram realizados testes de antagonismo de metabólitos secundários voláteis produzidos pelas bactérias. Para isso, foram utilizadas placas de Petri bipartida contendo meio BDA. Em um dos compartimentos foi adicionado um disco de 5 mm do meio contendo as estruturas miceliais do fitopatógeno a 1 cm da borda da placa, enquanto no outro foi realizada a riscagem da estrutura bacteriana. Já em relação ao controle, foi inserido em um dos lados o disco com as estruturas do fitopatógeno e no outro apenas o meio BDA. Todas as placas foram acondicionadas em BOD a 28 °C durante um período de oito dias.

Neste experimento, também foi adquirido a estratégia de serem utilizados dois tempos diferentes, em que no T0 foi realizada a riscagem da estrutura bacteriana e o disco contendo o micélio do fitopatógeno simultaneamente, enquanto no T24 a riscagem da bactéria foi realizada com 24 horas de antes de inserir o fitopatógeno. Enfatizando que cada tempo obteve seus respectivos controles, em que o fitopatógeno foram inseridos ao mesmo tempo que foram inseridos nas placas com os isolados bacterianos.

Durante o período do experimento foram realizados registros fotográficos das placas, os quais foram submetidas ao *software* ImageJ, visando coletar o raio das colônias dos fitopatógenos. Esses dados foram coletados com intervalos de dois dias durante oito dias e, posteriormente, foram aplicadas na fórmula citada anteriormente, com o objetivo de compreender a porcentagem de inibição das bactérias sob o fitopatógeno.

O experimento também seguiu a mesma lógica do pareamento direto, montado em delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos, sendo metade atribuída ao T0 (controle, *B. pumilus* x *C. gloeosporioides*, *B. subtilis* x *C. Gloeosporioides*, *B. velezensis* x *C. gloeosporioides*) e a outra metade ao T24 (controle, *B. pumilus* x *C. gloeosporioides*, *B. subtilis* x *C. gloeosporioides*, *B. velezensis* x *C. Gloeosporioides*), com 5 repetições por tratamento.

3.5 Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) foi empregada para investigar a eficácia de *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus velezensis* no controle biológico *in vitro* do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizando métodos de pareamento direto e a ação de metabólitos secundários voláteis. A normalidade dos dados foi verificada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov (Berger; Zhou, 2014) e Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965), enquanto a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene (Schultz, 1985).

Diante da ausência de homogeneidade e normalidade, foi adotado o procedimento de bootstrapping (1000 reamostragens; 95% IC BCa) para corrigir possíveis desvios de normalidade, aumentando a robustez dos resultados e fornecendo um intervalo de confiança de 95% para as diferenças entre as médias (Haukoos; Lewis, 2005).

As comparações entre grupos foram realizadas pelo teste de Bonferroni, garantindo a significância estatística para $p < 0,05$. Adicionalmente, análises de regressão linear múltipla (método *forward*) foram conduzidas para explorar o efeito das características de cada cepa de *Bacillus* sobre a inibição do crescimento de *C. gloeosporioides*. Todas as análises foram realizadas com o software IBM® SPSS® (SPSS Corp, 2017).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da interação entre os fatores:

Inicialmente, por meio das análises estatísticas foram avaliados a significância e o tamanho do efeito dos seguintes fatores: bactéria, fase de observação e a interação entre bactéria x fase de observação. Foi observado que no experimento do pareamento direto o

fator “bactéria” apresentou um efeito estatisticamente significativo, com efeito (η^2 parcial) de 0.996, indicando que 99,6% da variância na eficiência pode ser explicada pelo tipo de bactéria. A fase de observação também demonstrou efeito estatisticamente significativo, com um η^2 parcial de 0.965, indicando que 96,5% da variância pode ser atribuída ao momento de aplicação.

Além disso, também foi observado que a interação entre o fator “bactéria” e “fase de observação” demonstrou ser estatisticamente significativo, com η^2 parcial de 0.975, sugerindo que 97,5% da variação na eficiência se deve à interação entre o tipo de bactéria e o momento de aplicação. Neste sentido, a interação dos fatores impacta significativamente a eficiência do controle, como demonstrado nos dados descritos na Tabela 1. Essa interação sugere que o ajuste do momento de aplicação em função da bactéria utilizada pode otimizar significativamente os resultados. De acordo com Wu *et al.* (2015), a utilização dos bioinsumos ainda é prejudicada pelo conhecimento insuficiente sobre os mecanismos básicos das espécies de *Bacillus*, o que limita seu uso eficaz no controle biológico. Dessa maneira, essas informações devem ser levadas em consideração em futuros protocolos de aplicação, uma vez que, a eficiência do controle biológico não depende apenas de fatores isolados, mas também de como esses fatores interagem.

Tabela 1- Análise de variância da eficiência dos *Bacillus* spp, para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* via duas fases de aplicação no antagonismo por pareamento direto

Origem	Soma dos quadrados ^a	df	Quadrado médio	Z	Sig ^b	Eta ² Parcial (η^2)	Poder Observado ^b
Intercepto	4760,784	5	355,082	422,098	0,000	0,989	1,000
Bactéria	552,454	1	4760,784	5659,313	0,000	0,996	1,000
Fase	779,280	2	276,227	328,361	0,000	0,965	1,000
Bactéria * Fase	443,674	1	779,280	926,358	0,000	0,975	1,000
Padrão	20,190	2	221,837	263,706	0,000	0,956	1,000
Total	6556,382	24	0,841				
Total corrigido	1795,598	30					

Nota: a.0,989 (R Quadrado Ajustado = ,986), b. Calculado usando alfa = 0,05

Esse comportamento também foi observado nos experimentos focados nos metabólitos voláteis, onde os três fatores demonstraram efeitos significativos (Tabela 2). No fator “bactéria” foi observado η^2 parcial de 0,996, indicando que 99,6% da variância pode estar relacionada pelo tipo de bactéria. Já no fator “fase de observação”, o efeito foi de 0,965, que apesar de numericamente ser inferior ao fator “bactéria”, ainda assim indica que 96,5% da variância pode estar relacionada pela fase de observação. Por fim, na interação entre os

dois fatores também foi observado efeito significativo, com um tamanho de efeito de 0,975, indicando que 97,5% da variância na eficiência pode ser explicada pela interação entre tipo de bactéria e a fase de observação. Neste caso, assim como os testes de pareamento direto, os resultados indicam que a eficácia dos metabólitos voláteis é influenciada não apenas pelos fatores isolados, mas, sobretudo, pela sinergia entre o tipo de bactéria e o momento de observação. Kalamara e Stanley-Wall (2021) ressaltam que os processos regulatórios de *Bacillus* spp. são complexos e dependem de sinais ambientais. Portanto, o contexto de aplicação deve ser analisado para potencializar a síntese de metabólitos secundários e, assim, aumentar a eficiência no controle do fitopatógeno.

Tabela 2- Análise de variância da eficiência dos *Bacillus* spp. para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* nas duas fases de aplicação no antagonismo por metabólitos voláteis.

Origem	Soma dos quadrados ^a	df	Quadrado médio	Z	Sig ^b	Eta ² Parcial (η ²)	Poder Observado ^b
Intercepto	4760,784	5	355,082	422,098	0,000	0,989	1,000
Bactéria	552,454	1	4760,784	5659,313	0,000	0,996	1,000
Fase	779,280	2	276,227	328,361	0,000	0,965	1,000
Bactéria * Fase	443,674	1	779,280	926,358	0,000	0,975	1,000
Padrão	20,190	2	221,837	263,706	0,000	0,956	1,000
Total	6556,382	24	0,841				
Total corrigido	1795,598	30					

Nota: a.0,989 (R Quadrado Ajustado = ,986), b. Calculado usando alfa = 0,05

A partir desses resultados, é possível compreender que a escolha da bactéria, quanto ao momento de aplicação, é um fator determinante para conseguir atingir a eficiência no controle do fitopatógeno. Em pesquisas anteriores, Chen *et al.* (2020) abordam que em decorrência da diversidade de espécies do gênero, é fundamental compreender suas potencialidades antes da aplicação das formulações comerciais. Hu *et al.* (2024) também corrobora com essas análises, uma vez que a eficiência antagônica do *Bacillus* ssp. também pode variar em função do tempo e das condições submetidas.

Devido aos seus múltiplos benefícios, formulações de produtos à base de bactérias desse gênero têm recebido atenção significativa como um concorrente para fungicidas químicos para controlar doenças de plantas (Kim *et al.*, 2021). Apesar disso, é fundamental reconhecer os potenciais inerentes às bactérias para atingir a eficiência no controle, sendo necessário que os mecanismos de interação entre os antagonistas hospedeiro-fitopatógeno-bactéria sejam estudados mais a fundo (Alemu *et al.*, 2023).

4.2 Análise de eficiência entre as bactérias

Após a análise das variáveis globais, foi realizado o teste Post Hoc com o objetivo de comparar a eficiência entre as diferentes espécies de *Bacillus* spp no controle do *C. gloeosporioides*, mantendo as condições experimentais. Essa comparação é intergrupo, ou seja, busca identificar a diferença entre os sujeitos dentro do mesmo grupo de tratamentos. Diante disso, na Tabela 3 é possível observar as diferenças existentes entre as espécies de *Bacillus* spp. em termos de eficiência no controle do fitopatógeno através do pareamento direto.

Tabela 3- Teste posthoc da eficiência dos *Bacillus* spp. para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* via pareamento direto em duas fases de aplicação

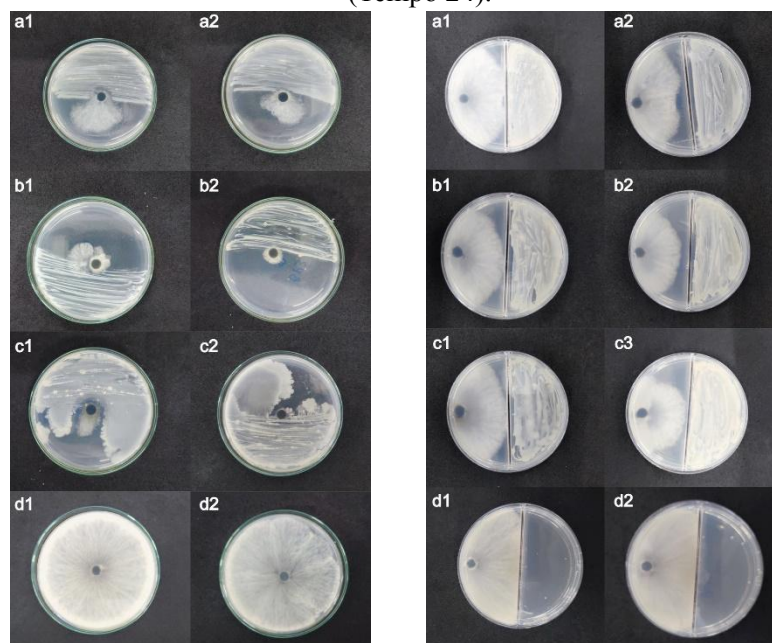
<i>Bacillus</i>	Eficiência de aplicação (%)	
	0h	24h
<i>B. subtilis</i>	24,466 Bb	39,840 Ac
<i>B. pumilus</i>	46,696 Ba	77,220 Ab
<i>B. velezensis</i>	47,168 Ba	86,786 Aa

Nota: Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os o mesmo bacillus para as diferentes fases de aplicação e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes bacillus no mesmo tempo de aplicação.

Na fase 0 horas, o *B. subtilis* apresentou uma eficiência média de 24,466%, enquanto na fase de 24 horas a eficiência foi significativamente maior, possuindo uma eficiência média de 39,840%. Além disso, a análise revelou que o *B. subtilis* apresentou uma diferença média significativa em comparação ao *B. pumilus* e o *B. velezensis*. Já a espécie *B. pumilus* demonstrou maior eficiência na fase de 0 horas, apresentando uma média de 46,696mm, enquanto na fase de 24 horas também apresentou um aumento significativo, com uma eficiência média de 77,220%. Em relação às outras bactérias foi observado diferença significativa apenas com o *B. subtilis*.

Por fim, foi observado que *B. velezensis* foi a bactéria que apresentou a maior eficiência, com uma eficiência média de 47,168% na fase de 0 horas e 86,786% na fase de 24 horas, além de apresentar diferença estatística em relação ao *B. subtilis*. Dessa forma, o pareamento direto tanto o *B. pumilus* quanto *B. velezensis* são significativos, diferindo de *B. subtilis* no controle de *C. gloeosporioides*, com efeitos significativos confirmados nas análises estatísticas. Na Figura 1, podem ser observadas as imagens dos pareamentos.

Figura 1– Confrontos por pareamento direto e por metabólitos voláteis, respectivamente. a1- *B. subtilis* (Tempo 0), a2- *B. subtilis* (Tempo 24), b1- *B. pumilus* (Tempo 0), b2- *B. pumilus* (Tempo 24), c1- *B. velezensis* (Tempo 0), c2- *B. velezensis* (Tempo 24), d1- Controle (Tempo), d2- Controle (Tempo 24).



Fonte: Elaborada pelo autor

A fase de aplicação das bactérias impacta significativamente na eficácia no controle de *C. gloeosporioides*. As espécies de *Bacillus* mostraram maior eficiência quando aplicadas antes da introdução do fungo, com 24 horas de antecedência. Esses resultados auxiliam na tomada de decisão no campo para produtores com biofábricas, permitindo que eles realizem a multiplicação dos microrganismos e aguardem 24 horas para maximizar a produção de metabólitos secundários no bioinsumo gerado. Este padrão foi observado principalmente para *B. velezensis*, que apresentou eficiência em comparação às outras espécies testadas. A interação significativa entre o tipo de bactéria e o momento de aplicação sugere que o desempenho das bactérias pode ser otimizado ajustando o momento de aplicação, reforçando a importância do manejo adequado no uso de biocontrole.

Outros estudos demonstram o potencial do *B. velezensis*, *B. pumilis* e *B. subtilis* no controle do *C. gloeosporioides*. Wang *et al.* (2023) destaca que o *B. velezensis* apresenta forte antagonismo ao fitopatógeno, observando através de microscopia eletrônica que o agente biocontrolador consegue romper o micélio do fitopatógeno, inibindo efetivamente seu crescimento. Magallón-andalón *et al.* (2024) demonstrou através dos seus dados que *B. pumilis* apresentou uma taxa de inibição de 78,04 de inibição contra o *C. gloeosporioides*, apresentando resultados próximos da presente pesquisa. Emanuel *et al.* (2020) também

comprovou a eficiência do *B. subtilis* no controle do fitopatógeno, além de discutir sobre a diversidade de metabólitos antimicrobianos envolvidos no antagonismo.

É importante destacar que bactérias do gênero *Bacillus* spp. não realizam a biossíntese de metabólitos de forma contínua, a fim de evitar sobrecarga metabólica. A produção de metabólitos secundários é ativada em resposta a fatores de estresse, como a presença de fitopatógenos, o que desencadeia a ativação de um grupo de genes responsáveis por sua síntese (Andric *et al.*, 2021). Conforme relatado por Luna-Bulbarela *et al.* (2024), esses fatores podem ser subprodutos da respiração, metabolismo ou de natureza exógena, como antimicrobianos que apresentam atividade contra *Bacillus* spp. Nesse mesmo estudo, também é enfatizado que no caso de *C. gloeosporioides*, foram identificados vários metabólitos que ameaçam a sobrevivência de *Bacillus* spp., o que ativa seu sistema de defesa, desencadeando a liberação de metabólitos secundários para inibir o fitopatógeno.

Já em relação aos experimentos com antagonismo através dos metabólitos voláteis, também foi observado diferentes porcentagem de inibição (Tabela 4). A bactéria *B. subtilis* mostrou um aumento estatisticamente significativo na eficiência entre as duas fases de observação. Na fase de 0 horas, a eficiência média foi de 3,662, enquanto na fase de 24 horas, a eficiência média subiu para 9,404. O *B. pumilus* também demonstrou uma melhoria estatisticamente significativa entre as fases, apresentando eficiência média na fase de 0 horas foi de 13,516, enquanto na fase de 24 horas aumentou para 17,340. Entre as três espécies testadas, *B. velezensis* apresentou o maior aumento na eficiência, apresentando na fase de 0 horas a eficiência média de 5,324, enquanto na fase de 24 horas, esse valor subiu para 26,338.

Tabela 4- Teste posthoc da eficiência dos *Bacillus* spp. para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* via metabólitos voláteis em duas fases de aplicação

<i>Bacillus</i>	Eficiência de aplicação (%)	
	0h	24h
<i>B. subtilis</i>	3,662 Bc	9,404 Ac
<i>B. pumilus</i>	13,516 Ba	17,340 Ab
<i>B. velezensis</i>	5,324 Bb	26,388 Aa

Nota: Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os o mesmo bacillus para as diferentes fases de aplicação e letras minúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os diferentes bacillus no mesmo tempo de aplicação.

Em relação a comparação dos valores entre as bactérias, foi possível observar que houve diferença estatística entre todas as bactérias na fase do tempo 0 horas, como também no tempo de 24 horas. No caso do tempo de 0 horas o *B. pumilus* demonstrou maior eficiência no controle do fitopatógeno, enquanto o *B. subtilis* apresentou o menor valor. Já no

tempo de 24 horas o *B. subtilis* persiste em continuar como o agente biocontrolador de menor eficiência, enquanto o *B. velezensis* lidera entre as bactérias.

Apesar de apresentar valores inferiores em comparação ao antagonismo por pareamento direto, foi possível observar que a produção dos metabólitos voláteis apresentou efeitos inibitórios em relação ao fitopatógeno em estudo, como pode ser observado na Figura 3. A utilização dessa estratégia no controle biológico é desejável, já que os metabólitos voláteis apresentam pequeno peso molecular, baixo ponto de ebulição e lipofilicidade, permitindo que se espalhem por longas distâncias em concentrações baixas (Tang *et al.*, 2024).

Outros estudos que também testaram a eficiência dos metabólitos voláteis, apresentaram resultados semelhantes. Kim *et al.* (2024) demonstrou em seus experimentos que o *B. velezensis* conseguiu inibir o *C. gloeosporioides* em 29,59%, além de ocasionar mudanças morfológicas nas hifas do fitopatógeno. Choub *et al.* (2022) também conseguiu comprovar a eficiência dos metabólitos voláteis no controle do fitopatógeno em estudo, conseguindo taxas de inibição que atingiram 30% de eficiência. Rajaofera *et al.* (2019), que também relatou resultados semelhantes em relação a eficiência do *C. gloeosporioides*, informou que várias bactérias do gênero *Bacillus* spp. possuem a capacidade de sintetizar diversos metabólitos voláteis, como ácido cloroacético, éster tetradecílico e ácido hexadecanóico, que possuem a capacidade inibitório do fitopatógeno.

Ainda que possuam taxas de inibições inferiores quando comparados ao *B. velezensis*, o *B. subtilis* e *B. pumilus* também apresentaram efeito inibitório no crescimento do fitopatógeno. Os resultados de Zhou *et al.* (2019) e Zhao (2019) demonstraram o potencial inibitório do *B. subtilis* por meio dos metabólitos voláteis, comprovando que além de interferir na morfologia das hifas e na germinação dos fungos, também estimula as plantas a desenvolver resistência induzida. Estudos também ressaltam o potencial do *B. pumilus* no controle biológico, como consta nos resultados de Zheng *et al.* (2023), que foi demonstrado a eficiência do controle do *C. gloeosporioides* com uma inibição de 30%, produzindo diversos metabólitos voláteis como 2-decanona e 2-metilpirazina. Nas Figura 3 é possível observar o comportamento dos confrontos através de pareamento direto e pelos metabólitos voláteis no último dia de observação.

A ação dos metabólitos secundários voláteis ocorre a partir da reação com os componentes presentes na parede celular do fitopatógeno, que é formada principalmente por quitina. Conforme Wang *et al.* (2021), os metabólitos voláteis gerados por espécies do gênero

Bacillus têm a capacidade de interferir nos processos ligados à formação da parede celular, comprometendo assim sua integridade e, conseqüentemente, sua resistência mecânica.

Ademais, destaca-se que a biossíntese de metabólitos é favorecida em condições ideais, como o estabelecimento das bactérias em ambientes que ofereçam a concentração adequada de nutrientes (Schwarz *et al.*, 2021). Nesse contexto, o maior efeito inibitório observado em 24 horas pode ser justificado, uma vez que a bactéria teve tempo suficiente para se estabelecer, e, quando em contato com o fitopatógeno, ativou os genes relacionados à biossíntese com o propósito de inibir o fitopatógeno.

4.3 Análise da taxa de inibição ao decorrer do tempo

Para entender o comportamento das três espécies de *Bacillus spp.* ao longo do experimento, realizou-se uma análise de regressão linear baseada nos valores de taxa de inibição. Os dados obtidos auxiliam os produtores na tomada de decisões mais assertivas sobre a aplicação de controle biológico da doença em seus cultivos, permitindo uma abordagem fundamentada e eficiente para otimizar a proteção das plantas.

4.3.1 Metabólitos voláteis

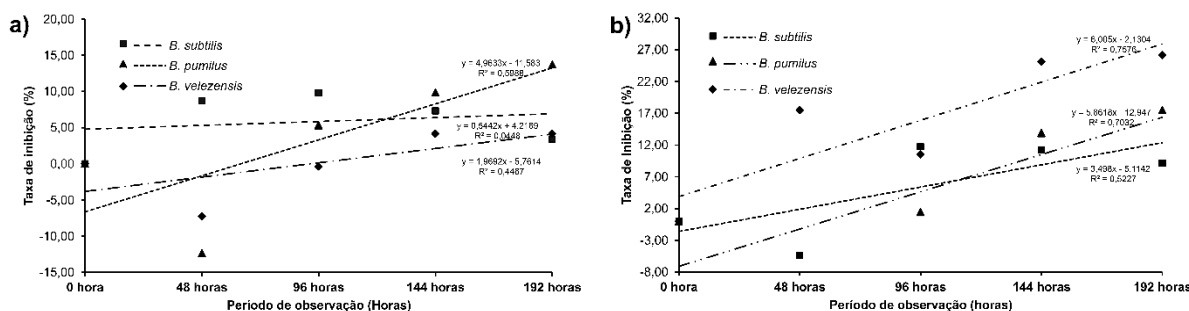
Na Figura 4a e Tabela 5, é possível observar o comportamento do antagonismo através metabólitos voláteis nos dois tempos de avaliação do experimento. Para o modelo de regressão, o impacto do tempo sobre a eficiência dos metabólitos voláteis de *B. subtilis* o fator "Tempo" apresentou um coeficiente β de 0,611, indicando uma tendência positiva em relação ao efeito do tempo sobre a eficiência.

No entanto, essa influência não foi estatisticamente significativa, e com coeficiente de determinação baixo ($R^2 = 0,044$, $p = 0,291$) indicando que apenas 4,4% da variação nos resultados pode ser explicada pelo tempo, o que reflete uma baixa capacidade preditiva do modelo neste estágio do experimento. Este resultado sugere que, nas condições avaliadas até 192 horas, o tempo não exerce um efeito significativo sobre a eficiência dos metabólitos voláteis de *Bacillus subtilis*, indicando que a eficácia do composto não depende diretamente do fator temporal dentro desse intervalo. Ellouze *et al.* (2021) ressaltam que, além do tempo, outros fatores devem ser considerados e ajustados na síntese de metabólitos *in vitro*, como a composição do meio de cultura e a temperatura.

Já o modelo de regressão do impacto do tempo sobre a eficiência dos metabólitos voláteis de *B. velezensis* demonstrou que o fator "Tempo" apresenta um coeficiente β de

2,259 significativa para a variável tempo. Esses achados indicam que, à medida que o tempo de exposição aumenta, a eficiência dos metabólitos voláteis também se intensifica. Já o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,446$) indica que 44,6% da variação nos resultados pode ser explicada pelo tempo (Figura 4a).

Figura 4- Metabólitos voláteis na fase de 0 horas (a) e na fase de 24 horas (b) na produção de *Bacillus velezensis* sobre o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides*.



Dentre os três *Bacillus* analisados, o modelo para *B. pumilus* indicou que o fator "Tempo" apresentou o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,598$, $p = 0,001$), sugerindo que 59,8% da variação nos resultados pode ser explicada pelo tempo. O coeficiente Beta, estatisticamente significativo ($\beta = 4,881$, $p = 0,01$), reforça a ideia de que o tempo exerce um efeito positivo sobre a eficiência dos metabólitos voláteis. O maior coeficiente de determinação entre os três *Bacillus* indica uma influência do tempo na eficácia dos compostos voláteis de *B. pumilus* (Tabela 5).

Tabela 5- Parâmetros de eficiência da aplicação dos *Bacillus*, associados às duas fases de aplicação, do para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* através dos metabólitos voláteis

<i>Bacillus</i>	Eficiência da aplicação (%)							
	Fase de aplicação							
	(0 h)				(24h)			
	Coeficiente β	t	p .	R^2	Coeficiente β	t	p . ^a	R^2
<i>B. subtilis</i>	0,611	1.158	0,291	0,044	3,545	5,232	< 0,001	0,703
<i>B. pumilus</i>	4,881	5,885	< 0,001	0,598	5,812	7,365	0,003	0,522
<i>B.velezensis</i>	2,259	4,712	< 0,007	0,446	8,439	10,268	< 0,001	0,757

Nota: a. Calculado usando alfa = 0,05

Ainda assim, tais coeficientes demonstram que, mesmo sendo estatisticamente significativos, o fator tempo reflete uma capacidade preditiva limitada do modelo, sugerindo

que outros fatores podem estar influenciando a eficiência dos metabólitos. Esse resultado pode ser atribuído aos mecanismos de defesa do fitopatógeno, que possivelmente atuaram de maneira antagônica aos agentes biocontroladores, objetivando manter a sobrevivência da sua população (Bartolini *et al.*, 2019). Entretanto, os agentes de controle conseguiram ativar seus próprios mecanismos de defesa por meio da sua sensibilidade aos sinalizadores, o que resultou, posteriormente, no controle biológico do fitopatógeno (Yang *et al.*, 2023).

Para o *B. pumilus*, o tempo tem efeito significativo na eficiência dos metabólitos voláteis. O coeficiente β de 5,812 significativo, indica uma forte relação positiva entre o tempo de exposição e a eficiência. Ainda o coeficiente de determinação (R^2) apresentado na Figura 4, indica que 70,3% da variação na eficiência dos metabólitos voláteis de *Bacillus pumilus* pode ser explicada pelo tempo de exposição. Sugerindo que o tempo de pré-incubação durante o experimento tem uma forte relação entre a eficiência dos compostos voláteis.

Assim como o *B. pumilus*, o *B. subtilis* quando analisado sua aplicação a partir das 24 horas, o tempo também exerce efeito positivo significativo sobre a eficiência dos metabólitos voláteis para o controle do *C. gloeosporioides*. O coeficiente β estatisticamente significativo 3,545 indica que, para cada incremento temporal, há um aumento substancial na eficiência dos metabólitos voláteis de *B. subtilis* no controle de *C. gloeosporioides*. Por exemplo, pode-se inferir que a cada 48 horas a eficiência dos metabólitos voláteis tende a aumentar 3,545, ou seja, o efeito positivo do tempo continua a ser significativo. Mesmo comportamento é evidenciado para o composto volátil de *B. velezensis*.

Esses resultados demonstram que, diferentemente da aplicação simultânea do *B. velezensis* com o fitopatógeno a partir dos metabólitos voláteis, ao se permitir o crescimento da bactéria por um período de 24 horas antes da exposição, há uma melhora significativa na eficiência dos metabólitos voláteis (Figura 3b). Isso evidencia uma relação direta entre o aumento do tempo de pré-incubação e a eficácia dos compostos, que pode ser confirmado a partir do coeficiente de determinação $R^2 = 0,757$, sugerindo que o crescimento inicial da bactéria potencializa a ação dos metabólitos voláteis sobre o patógeno.

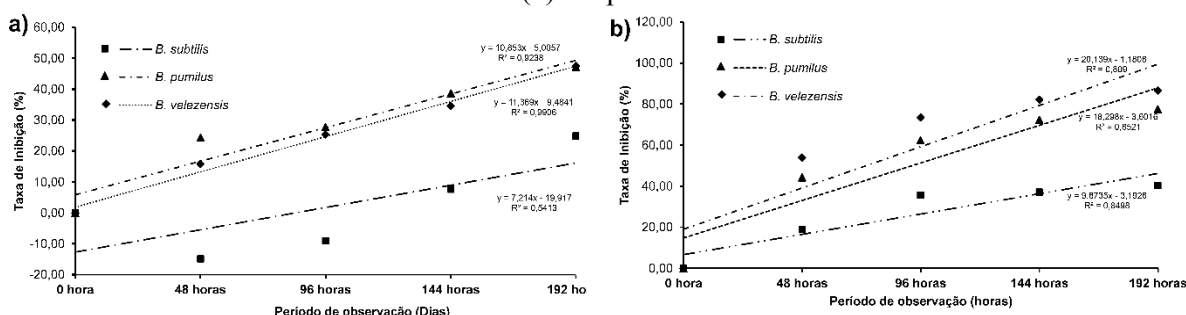
A compreensão da relação entre o tempo e a taxa de inibição é essencial para auxiliar na tomada de decisões no campo, pois permite entender a interação entre o agente biocontrolador e o fitopatógeno. De acordo com Feng *et al.* (2024), os agentes de biocontrole são considerados uma estratégia segura e promissora para o manejo de doenças. No entanto, é fundamental compreender as particularidades de cada *Bacillus* spp. para garantir a eficácia da

implantação do controle biológico. Isso enfatiza a necessidade de aprofundar os estudos voltados ao controle biológico, especialmente no que diz respeito às interações entre o agente biocontrolador e o fitopatógeno.

4.3.2 Confronto por pareamento direto

Na Figura 5 se apresenta os valores de regressão linear ao longo do tempo do experimento com pareamento direto na fase de (a) 0 horas e no (b) tempo de 24 horas. Observa-se o comportamento no antagonismo por pareamento direto, onde, nos tempos de 0 e 24 horas, houve um aumento expressivo na taxa de inibição, sendo os resultados mais elevados no tempo de 24 horas.

Figura 5- Regressão linear ao longo do tempo do experimento por pareamento direto na fase de (a) 0 horas e no (b) tempo de 24 horas



Fonte: Elaborada pelo autor

Entre os três isolados de *Bacillus* analisados, *B. pumilus* apresentou o maior coeficiente de determinação para o fator "Tempo" ($R^2 = 0,990$, $p < 0,001$), indicando que 99,0% da variação nos resultados é explicada pelo tempo. O coeficiente Beta, também estatisticamente significativo ($\beta = 10,753$, $p < 0,001$), confirma o efeito positivo do tempo na eficiência do controle. Esse alto valor de R^2 em relação aos outros *Bacillus* sugere uma forte influência do tempo na eficácia de *B. pumilus* no controle biológico (Tabela 6).

Tabela 6- Parâmetros de eficiência da aplicação dos *Bacillus*, associados às duas fases de aplicação, do para o controle do fungo *Coletotrichum gloeosporioides* através de pareamento direto

Bacillus	Eficiência da aplicação (%)							
	Fase de aplicação							
	(0 h)				(24h)			
	Coeficiente β	t	p.	R^2	Coeficiente β	t	p. ^a	R^2
<i>B. subtilis</i>	7,136	5,140	0,009	0,543	9,816	10,914	< 0,001	0,849
<i>B. pumilus</i>	10,753	15,58	< 0,001	0,990	18,242	11,345	< 0,001	0,853
<i>B. velezensis</i>	11,353	41,35	< 0,001	0,923	20,189	9,920	0,005	0,809

Nota: a. Calculado usando $\alpha = 0,05$

Sidorova *et al.* (2020) relatam que diversos fatores, como o tempo de cultivo, podem interferir nas propriedades microbianas. Eles comprovaram, por meio de cromatografia, que a síntese de metabólitos é favorecida ao longo do tempo, devido à maior estabilização das bactérias no meio de cultura. Dessa forma, o tempo de 24 horas favoreceu as bactérias, pois, ao confrontar o fitopatógeno, elas já estavam estabilizadas, permitindo a realização do controle biológico de maneira eficiente.

A alta eficiência dos *Bacillus* spp. como agentes biocontroladores pode ser afetada por inconsistências nas condições agrícolas do mundo real, o que pode limitar os efeitos benéficos (Nimbeshaho *et al.*, 2024). Portanto, entender o comportamento ao longo do tempo contribui para a mitigação dos riscos inerentes à agricultura, permitindo que os agricultores adaptem as melhores estratégias de acordo com suas realidades (Dutilloy *et al.*, 2024).

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as espécies *B. velezensis*, *B. pumilus* e *B. subtilis* apresentam potencial biotecnológico significativo no controle biológico *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, tanto nos ensaios de pareamento direto quanto pela ação de metabólitos voláteis.

A taxa de inibição do fitopatógeno quando os agentes biocontroladores são aplicados antes da inoculação do fitopatógeno, com destaque para *B. velezensis*, que apresenta maior eficácia.

Há uma correlação significativa entre o momento de aplicação e a escolha da espécie bacteriana na eficiência do controle biológico. Esses achados reforçam a importância do momento da aplicação e da seleção adequada da cepa para maximizar a eficácia no manejo fitopatológico. Testes em campo, caso reproduzam o mesmo resultado, podem ser úteis no manejo de doenças causadas pelo fitopatógeno.

REFERÊNCIAS

- AKOIJAM, Nirmala; JOSHI, Santa Ram. Bioprospecting acid-and arsenic-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria for mitigation of arsenic toxicity in acidic agricultural soils. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 6, p. 229, 2023.
- ALEMU, Kumlachew et al. Biocontrol potentials of native bacterial strains for the management of coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in Ethiopia. **Biocontrol Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 98-114, 2023.

ALIJANI, Zahra et al. Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. **International journal of food microbiology**, v. 307, p. 108276, 2019.

ANDRIĆ, Sofija et al. Lipopeptide interplay mediates molecular interactions between soil Bacilli and Pseudomonads. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, p. e02038-21, 2021.

ANTONIOLI, Gabriela et al. Poly (lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. **Food Chemistry**, v. 326, p. 126997, 2020.

AYALA, Facundo; BARTOLINI, Marco; GRAU, Roberto. The stress-responsive alternative sigma factor SigB of *Bacillus subtilis* and its relatives: an old friend with new functions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1761, 2020.

BALDERAS-RUIZ, Karina A. et al. *Bacillus velezensis* 83 a bacterial strain from mango phyllosphere, useful for biological control and plant growth promotion. **Amb Express**, v. 10, p. 1-19, 2020.

BARTOLINI, Marco et al. Stress-responsive alternative sigma factor SigB plays a positive role in the antifungal proficiency of *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 9, p. e00178-19, 2019.

BERGER, Vance W.; ZHOU, YanYan. Kolmogorov–Smirnov Test: Overview. In: WILEY STATSREF: STATISTICS REFERENCE ONLINE. [S. l.]: Wiley, 2014.

BHUNJUN, Chitrabhanu S. et al. Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v. 107, p. 107-127, 2021.

BONATERRA, Anna et al. Bacteria as biological control agents of plant diseases. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1759, 2022.

BORTOLOTI, Gillyene; SAMPAIO, Renata Martins. Desafios e estratégias no desenvolvimento dos bioinsumos para controle biológico no Brasil. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 20, n. 60, p. 291-307, 2024.

BRAUER, Veronica Soares et al. Antifungal agents in agriculture: friends and foes of public health. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, p. 521, 2019.

CHEN, Kai et al. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. **Biological control**, v. 151, p. 104419, 2020.

CHOUB, Vantha et al. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Horticulturae**, v. 8, n. 6, p. 557, 2022.

DE SILVA, Nimali I. et al. Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133-148, 2019.

DOWLING, Madeline et al. Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. **Plant Disease**, v. 104, n. 9, p. 2301-2316, 2020.

DUTILLOY, Emma et al. *Bacillus velezensis* BE2 controls wheat and barley diseases by direct antagonism and induced systemic resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 64, 2024.

EFRON, Bradley *et al.* Least angle regression. **The Annals of Statistics**, [s. l.], v. 32, n. 2, 2004.

EL-GENDI, Hamada et al. Foliar applications of *Bacillus subtilis* HA1 culture filtrate enhance tomato growth and induce systemic resistance against tobacco mosaic virus infection. **Horticulturae**, v. 8, n. 4, p. 301, 2022.

ELLOUZE, Mariem et al. Modeling *Bacillus cereus* growth and cereulide formation in cereal-, dairy-, meat-, vegetable-based food and culture medium. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 639546, 2021.

ELSAYED, Tarek R. et al. Biocontrol of bacterial wilt disease through complex interaction between tomato plant, antagonists, the indigenous rhizosphere microbiota, and *Ralstonia solanacearum*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2835, 2020.

EMANUEL, Ramírez-Vigil et al. In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-14, 2020.

FENG, Baozhen et al. Combined application of the endophyte *Bacillus* K1 and sodium dehydroacetate alleviates postharvest gray mold in grapes. **Food Microbiology**, p. 104637, 2024.

FONSECA, Jennifer Salgado da et al. Amazonian Bacteria from River Sediments as a Biocontrol Solution against *Ralstonia solanacearum*. **Microorganisms**, v. 12, n. 7, p. 1364, 2024.

FONTANA, Daniele Cristina et al. Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 570, 2021.

GARCÍA-LATORRE, Carlos; RODRIGO, Sara; SANTAMARIA, Oscar. Biological Control of *Pseudomonas syringae* in Tomato Using Filtrates and Extracts Produced by *Alternaria leptinellae*. **Horticulturae**, v. 10, n. 4, p. 334, 2024.

GUZMÁN-GUZMÁN, Paulina et al. *Trichoderma* species: Our best fungal allies in the biocontrol of plant diseases—A review. **Plants**, v. 12, n. 3, p. 432, 2023.

HAMMER, OYVIND; HARPER, DAVID AT; RYAN, PAUL D. Palaeontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HAUKOOS, Jason S.; LEWIS, Roger J. Advanced statistics: bootstrapping confidence intervals for statistics with “difficult” distributions. **Academic emergency medicine**, v. 12, n. 4, p. 360-365, 2005.

HE, Dun-Chun et al. Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1311, 2021.

HU, Yuxin et al. Optimization of cultivation system for *Bacillus* Siamese strain and its biocontrol effect on postharvest *Colletotrichum gloeosporioides*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 218, p. 113170, 2024.

JAISWAL, Durgesh Kumar et al. Biocontrol strategies: an eco-smart tool for integrated pest and diseases management. **BMC microbiology**, v. 22, n. 1, p. 324, 2022.

JAMALI, Hena et al. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 3, p. 268-280, 2020.

JIN, Pengfei et al. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 102-107, 2020.

JOLIFFE, IT; MORGAN, Bjt. Principal component analysis and exploratory factor analysis. **Statistical Methods in Medical Research**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 69–95, 1992.

KAISER, Henry F.; RICE, John. Little Jiffy, Mark Iv. **Educational and Psychological Measurement**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 111–117, 1974.

KALAMARA, Margarita; STANLEY-WALL, Nicola R. The intertwined roles of specialized metabolites within the *Bacillus subtilis* biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 203, n. 22, p. 10.1128/jb. 00431-21, 2021.

KIESEWALTER, Heiko T. et al. Genomic and chemical diversity of *Bacillus subtilis* secondary metabolites against plant pathogenic fungi. **Msystems**, v. 6, n. 1, p. 10.1128/msystems. 00770-20, 2021.

KIM, Tae Yoon et al. Antifungal potential of *Bacillus velezensis* CE 100 for the control of different *Colletotrichum* species through isolation of active dipeptide, cyclo-(d-phenylalanyl-d-prolyl). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 14, p. 7786, 2022.

KIM, Young Soo et al. Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 626, 2021.

KUMAR, Vinay et al. Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 50-63, 2020.

LAURITSEN, Jonas Greve et al. Identification and differentiation of *Pseudomonas* species in field samples using an rpoD amplicon sequencing methodology. **Msystems**, v. 6, n. 4, p. 10.1128/msystems. 00704-21, 2021.

LE HAN, Ho et al. Whole-genome analysis and secondary metabolites production of a new strain *Brevibacillus halotolerans* 7WMA2: A potential biocontrol agent against fungal pathogens. **Chemosphere**, v. 307, p. 136004, 2022.

LI, Xichen et al. A dual RNA-seq analyses revealed dynamic arms race during the invasion of walnut by *Colletotrichum gloeosporioides*. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 653, 2024.

LIMDOLTHAMAND, Supharoek et al. Biocontrol efficacy of endophytic *Trichoderma* spp. in fresh and dry powder formulations in controlling northern corn leaf blight in sweet corn. **Biological Control**, v. 181, p. 105217, 2023.

LOC, Nguyen Hoang et al. Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34. **Mycology**, v. 11, n. 1, p. 38-48, 2020.

LUNA-BULBARELA, Agustín et al. Response of *Bacillus velezensis* 83 to interaction with *Colletotrichum gloeosporioides* resembles a Greek phalanx-style formation: A stress resistant phenotype with antibiosis capacity. **Microbiological Research**, v. 280, p. 127592, 2024.

MAGALLÓN-ANDALÓN, Claudia Gabriela et al. Antagonistic potential of *Bacillus* spp. for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado (*Persea americana* Mill.) 'Hass'. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p. 1-12, 2024.

MOHAMAD, Osama Abdalla et al. Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 47, 2020.

MORALES-CEDENO, Luzmaria R. et al. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126612, 2021.

MOSELA, Mirela et al. *Bacillus velezensis* strain Ag75 as a new multifunctional agent for biocontrol, phosphate solubilization and growth promotion in maize and soybean crops. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15284, 2022.

NGALIMAT, Mohamad Syazwan et al. A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 614, 2021.

NIMBESHAHO, François et al. Unravelling the secondary metabolome and biocontrol potential of the recently described species *Bacillus nakamurai*. **Microbiological Research**, v. 288, p. 127841, 2024.

NIU, Ben et al. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 585404, 2020.

OBIANOM, Chinelo; ROMANAZZI, Gianfranco; SIVAKUMAR, Dharini. Effects of chitosan treatment on avocado postharvest diseases and expression of phenylalanine ammonia-lyase, chitinase and lipoxygenase genes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 147, p. 214-221, 2019.

OLIVEIRA, Camilla Martins et al. *Trichoderma harzianum* transcriptome in response to the nematode *Pratylenchus brachyurus*. **Biological Control**, v. 183, p. 105245, 2023.

RAJAOFERA, Mamy Jayne Nelly et al. Volatile organic compounds of *Bacillus atrophaeus* HAB-5 inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 156, p. 170-176, 2019.

RIBEIRO, Amanda et al. Bioprospection of culturable endophytic fungi associated with the ornamental plant *Pachystachys lutea*. **Current Microbiology**, v. 75, p. 588-596, 2018.

RONG, Songhao et al. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 162, p. 69-77, 2020.

SCHULTZ, B. B. Levene's Test for Relative Variation. **Systematic Biology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 449-456, 1985.

SCHWARZ, Jenny et al. Triaging of culture conditions for enhanced secondary metabolite diversity from different bacteria. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 193, 2021.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, [s. l.], v. 52, n. 3-4, p. 591-611, 1965.

SIDOROVA, Tatyana M. et al. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. **Saudi journal of biological sciences**, v. 27, n. 7, p. 1879-1885, 2020.

SPSS CORP, Released 2017. **IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 25.0**. Armonk, NY: IBM, 2017.

SU, Longhao et al. Antagonistic Mechanism Analysis of *Bacillus velezensis* JLU-1, a Biocontrol Agent of Rice Pathogen *Magnaporthe oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2024.

TALHINHAS, Pedro; BARONCELLI, Riccardo. Colletotrichum species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, v. 110, n. 1, p. 109-198, 2021.

TANG, Tao et al. Antipathogenic Activities of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus velezensis* LT1 against *Sclerotium rolfsii* LC1, the Pathogen of Southern Blight in *Coptis chinensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 72, n. 18, p. 10282-10294, 2024.

TATAY-NÚÑEZ, Josep et al. Isolation of local strains of the yeast *Metschnikowia* for biocontrol and lipid production purposes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 3, p. 88, 2024.

TSALGATIDOU, Polina C. et al. Integrated genomic and metabolomic analysis illuminates key secreted metabolites produced by the novel endophyte *Bacillus halotolerans* Cal. 1. 30 involved in diverse biological control activities. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 399, 2022.

TYAGI, Anshika et al. A Review on Biocontrol Agents as Sustainable Approach for Crop Disease Management: Applications, Production, and Future Perspectives. **Horticulturae**, v. 10, n. 8, p. 805, 2024.

WANG, Fang et al. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 174, p. 111456, 2021.

WANG, Ke et al. Antifungal mechanism of volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* CF-3 on *Colletotrichum gloeosporioides* assessed using omics technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 17, p. 5267-5278, 2021.

WANG, Linmin; ZHU, Tianhui. Strong Opponent of Walnut Anthracnose—*Bacillus velezensis* and Its Transcriptome Analysis. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, p. 1885, 2023.

WANG, Qing-Hai et al. Identification, virulence and fungicide sensitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* ss responsible for walnut anthracnose disease in China. **Plant disease**, v. 104, n. 5, p. 1358-1368, 2020.

WITKOWICZ, Robert et al. Effects of application of plant growth promoters, biological control agents and microbial soil additives on photosynthetic efficiency, canopy vegetation indices and yield of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 37, n. 4, p. 234-251, 2021.

WITTE, Thomas E. et al. A metabolomic study of vegetative incompatibility in *Cryphonectria parasitica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 157, p. 103633, 2021.

WU, Liming et al. Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1395, 2015.

YANG, Qilin et al. Transcriptome and metabolome analyses reveal that *Bacillus subtilis* BS-Z15 lipopeptides mycosubtilin homologue mediates plant defense responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1088220, 2023.

ZAID, Doaa S. et al. Comparative genome analysis reveals phylogenetic identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and genomic insights into its plant growth promotion and biocontrol effects. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, p. e02169-21, 2022.

ZAKARIA, Latiffah. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops—A review. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 297, 2021.

ZAPATA, Mario et al. Novel species and records of *Colletotrichum* associated with native woody plants in south-central Chile. **Mycological Progress**, v. 23, n. 1, p. 18, 2024.

ZHANG, Dai et al. Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* against *Alternaria solani* in potato. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1196, 2020.

ZHENG, Min et al. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 200-206, 2013.

ZHOU, Minshun et al. *Bacillus subtilis* CF-3 volatile organic compounds inhibit *Monilinia fructicola* growth in peach fruit. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1804, 2019.

ZIN, Nur A.; BADALUDDIN, Noor A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 65, n. 2, p. 168-178, 2020.