



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**JOÃO EVANGELISTA DE ÁVILA DOS SANTOS**

**EMISSÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) POR *BACILLUS* sp.  
NO ANTAGONISMO A FITOPATÓGENOS DA BANANEIRA (*Musa* spp.)**

**FORTALEZA**

**2022**

JOÃO EVANGELISTA DE ÁVILA DOS SANTOS

EMISSÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) POR *BACILLUS* sp. NO  
ANTAGONISMO A FITOPATÓGENOS DA BANANEIRA (*Musa* spp.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica – Química de Produtos Naturais.

Orientadora: Mary Anne Sousa Lima

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

---

- S235e Santos, João Evangelista de Ávila dos.  
Emissão de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) por *Bacillus* sp. no antagonismo a fitopatógenos da bananeira (*Musa* sp.) / João Evangelista de Ávila dos Santos. – 2022.  
112 f.: il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima.
1. *Bacillus* sp.; mal do Panamá; Antracnose. I. Título.

CDD 540

---

JOÃO EVANGELISTA DE ÁVILA DOS SANTOS

EMISSÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COVs) POR *BACILLUS* sp. NO  
ANTAGONISMO A FITOPATÓGENOS DA BANANEIRA (*Musa* spp.)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Centro de Ciências, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica – Química de Produtos Naturais.

Aprovada em 06/12/2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Mary Anne Sousa Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Antonia Torres Ávila Pimenta  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Maria da Conceição Ferreira de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva  
Embrapa Agroindústria Tropical (Embrapa)

---

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Antonio Ávila dos Santos (*In memoriam*),  
Ana Isadora Gomes de Ávila e Ozanira Araújo  
de Ávila dos Santos.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-graduação em Química por proporcionar uma estrutura de laboratórios, pesquisas e formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento da bolsa.

À Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza, por disponibilizar toda infraestrutura de laboratórios e a matéria prima desse estudo - micro-organismos.

Um Agradecimento todo especial à pesquisadora da Embrapa Agroindústria Tropical – Fortaleza, Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva, pela orientação, conselhos e toda disponibilidade durante esse período de doutorado.

À professora Dra. Mary Anne Sousa Lima pela orientação, ensinamentos e paciência.

À professora Antônia Pimenta Ávila Torres pela parceria e contribuições na minha vida acadêmica.

Ao pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical Dr. Guilherme Julião Zocolo pela contribuição na quimiometria e por sua visão otimista que tanto nos incentivou.

À banca examinadora por aceitar o convite e contribuir com este trabalho.

Aos colegas de Laboratório Maria Vieira, Débora Sousa, Mateus Rufino, Natália Moura, Henrique Nunes e Naomi de Freitas pela amizade, ensinamentos e companheirismo nesse período de doutorado.

Aos meus amigos Ana Tayná, Regina Alves e Nonato Alves que me acolheram em sua casa durante o período de doutorado.

A minha esposa Tamires Gomes, pelo companheirismo e apoio.

Aos meus pais (Luis dos Santos e Ozanira de Ávila) e meus treze irmãos pelo suporte que me deram para chegar até o fim deste doutorado.

“Ninguém nasce pronto. Ninguém sequer morre pronto.” (GOMES, 2020, p. 250).

## RESUMO

Espécies do gênero *Bacillus* são importantes agentes de biocontrole de diversos fitopatógenos habitantes do solo e da fase pós-colheita dos frutos, através da emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs). Desta forma, foi realizado o estudo do efeito antagonista das cepas de *Bacillus* spp. isoladas da rizosfera de bananeira (*Musa* spp.), frente aos fitopatógenos que atacam o seu sistema radicular (*Fusarium kalimantanense*) e frutos (*Lasiodiplodia brasiliensis* e *Colletotrichum musae*), visando à identificação de COVs com atividade antifúngica. Num total, foram isoladas e identificadas 98 cepas de rizobactérias de bananeiras oriundas de várias localidades dos estados do Ceará e Rio Grande do Norte - Brasil. Os isolados das bactérias foram submetidos a *screening* de atividade antagonista *in vitro* frente ao fitopatógeno *F. kalimantanense* LPPC130. Dentre as bactérias ativas, *Bacillus* sp. LPPC170 demonstrou resultados promissores, e foi selecionada como antagonista para experimentos de co-cultivo frente a *L. brasiliensis* e *C. musae*. A análise dos COVs dos micro-organismos em cultura axênica (*Bacillus* sp., *F. kalimantanense*, *L. brasiliensis* e *C. musae*) e dos experimentos de co-cultivo (*Bacillus* sp. versus *F. kalimantanense*; *Bacillus* sp. versus *L. brasiliensis*, *Bacillus* sp. versus *C. musae*) foram realizados através de técnicas combinadas de microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), e tratamento dos resultados por análise multivariada de dados. A caracterização estrutural foi realizada por comparação de dados de fragmentação dos cromatogramas obtidos, tempos de retenção e índices de *Kovats* dos COVs com dados da literatura. O uso da ferramenta quimiométrica permitiu a discriminação do perfil dos COVs de acordo com o experimento de co-cultivo. Os dados obtidos revelaram que a bactéria antagonista influenciou no metabolismo dos fitopatógenos. Alguns COVs com atividade antifúngica (ácido butanoico, ácido pentanoico e ácido 3-metilbutanoico) foram produzidos majoritariamente pelo antagonista quando confrontado com os fitopatógenos. Outros compostos do fungo sofreram alterações na sua abundância relativa e tiveram a sua produção inibida. Padrões químicos dos COVs identificados foram obtidos e testados quanto a sua atividade antifúngica. Os resultados revelaram que os compostos orgânicos voláteis emitidos por *Bacillus* sp. LPPC170 foram promissores na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos analisados, e demonstraram o seu potencial como possíveis metabólitos de controle biológico das doenças das bananeiras.



**Palavras-chave:** *Bacillus* sp.; mal do Panamá; Antracnose; *Colletotrichum musae*; *Fusarium kalimantanense*; *Lasiodiplodia brasiliensis*.

## ABSTRACT

Species of the genus *Bacillus* are important biocontrol agents for several phytopathogens that inhabit the soil and the postharvest phase of fruits, through the emission of volatile organic compounds (VOCs). Thus, the study of the antagonistic effect of *Bacillus* sp. isolated from the rhizosphere of banana trees (*Musa* spp.), against phytopathogens that attack its root system (*Fusarium kalimantanense*) and fruits (*Lasiodiplodia brasiliensis* and *Colletotrichum musae*), aiming to identify VOCs with antifungal activity. In total, 98 strains of rhizobacteria from banana trees were isolated and identified from various locations in the states of Ceará and Rio Grande do Norte - Brazil. The bacterial isolates were subjected to *in vitro* antagonist activity screening against the phytopathogen *F. kalimantanense* LPPC130. Among the active bacteria, *Bacillus* sp. LPPC170 showed promising results and was selected as an antagonist for co-cultivation experiments against *L. brasiliensis* and *C. musae*. The analysis of VOCs from microorganisms in axenic culture (*Bacillus* sp., *F. kalimantanense*, *L. brasiliensis* and *C. musae*) and from co-culture experiments (*Bacillus* sp. versus *F. kalimantanense*; *Bacillus* sp. versus *L. brasiliensis*, *Bacillus* sp. versus *C. musae*) were performed using combined techniques of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME), gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), and treatment of the results by multivariate analysis of data. Structural characterization was carried out by comparing fragmentation data from the obtained chromatograms, retention times, and Kovats indices of VOCs with data from the literature. The chemometric tool allowed the discrimination of the profile of VOCs according to the co-culture experiment. The data obtained revealed that the antagonist bacteria influenced the metabolism of phytopathogens. Some VOCs with antifungal activity (butanoic acid, pentanoic acid and 3-methylbutanoic acid) were mainly produced by the antagonist when confronted with phytopathogens. Other compounds of the fungus suffered from changes in their relative abundance and had their production inhibited. Chemical standards of the identified VOCs were obtained and tested for their antifungal activity. The results revealed that the volatile organic compounds emitted by *Bacillus* sp. LPPC170 were promising in inhibiting the mycelial growth of the phytopathogens analyzed and demonstrated their potential as possible biological control metabolites of banana diseases.

**Keywords:** *Bacillus* sp.; Panama disease; Anthracnose; *Colletotrichum musa*; *Fusarium kalimantanense*; *Lasiodiplodia brasiliensis*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Bananeiras com sintoma do mal do Panamá; sintomas externos (a) e sintomas internos (b).....	15
Figura 2 - (a) Frutos de banana, após 3-4 dias de incubação em condições de temperatura e umidade controlada, com sintomas típicos de antracnose causada pelo fungo <i>C. musae</i> . (b) Frutos de banana com sintomas típicos da podridão da coroa, ocasionada por um complexo de fungos, dentre os quais <i>L. brasiliensis</i> 16	
Figura 3 - Região da rizosfera onde ocorre mecanismo de defesa da planta através de antagonismo de micro-organismos.....	17
Figura 4 - Estruturas químicas de COVs identificados a partir das espécies de <i>B. cereus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> e <i>B. mojavensis</i> .....	18
Figura 5 - (a) Esquema do processo de infecção da planta de bananeira. (b) Muda de bananeira cv. Maçã com sintomas do mal do Panamá. (c) Pseudocaule necrosado apresentando sintomas de infecção, após 75 dias de inoculação do fitopatógeno.....	23
Figura 6 - Culturas de <i>Bacillus</i> sp. repicadas por técnica de estriamento.....	26
Figura 7 - Número de publicações e citações de artigos científicos publicados contendo as palavras-chaves “Volatile organic compounds” e “Bacillus”.....	29
Figura 8 - Estruturas químicas de Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por espécies de <i>Bacillus</i> com potencial antifúngico.....	34
Figure 9 - (a) Histogram of mycelial growth inhibition of the fungal strain (LPPC130) (cm). (b) Mycelial growth of the control treatment (growth of the fungal strain only), (c) Mycelial growth of the fungal strain (LPPC130) against the bacterial strain (LPPC170) (treatment with antagonist). The bar graph indicates the standard deviation error of the four replicates (each replicate = one Petri dish with each treatment). Tukey's test showed significant differences between control and treatment ( $p < 0.0001$ ).....	49
Figure 10 - Electron Scanning Microscopy of the vegetative structures of the LPPC130 strain. (a) Control treatment; (b and c) Treatments with VOCs LPPC170. The VOCs of <i>Bacillus</i> sp. LPPC170 caused deformations in the vegetative structure of the pathogen.....	51

- Figure 11 - Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of the emission of VOCs from the three culture configurations (bacterial strain LPPC170, fungal strain LPPC130, and co-cultivation) in biological triplicates. (a) Graph of scores: Culture axenic of bacterial strain (red); Culture axenic of the fungal strain of the pathogen LPPC130 (lilac) and Co-cultivation of the two microorganisms (green); (b) Loading graph in correlation scale: In positive regions: axenic culture of bacterial strain and fungal strain. In negative regions: co-cultivation. (c) Heatmap plot of the correlation of the three different analyses and relative abundance of VOC emission (n=3). Analysis of variance (ANOVA) using Fisher's LSD method showed a significant p-value (0.05).....53
- Figure 12 - Pure standards VOCs showed strong antifungal activity against the fungal strain LPPC130. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey multiple range test method ( $p < 0.05$ ). Compounds were tested in pure form (except B24, which was used at 1 mg/mL) with a volume of 150  $\mu$ L. B24 = tiglic acid, B17 = 2-methyl-butanoic acid, C26 = ethyl 3-hydroxybutanoate, C15 = butane-2,3-diol, C3 = acetic acid, B14 = butanoic acid, B6 = propanoic acid, B20 = pentanoic acid and B16 = 3-methyl-butanoic acid.....54
- Figura 13 - Árvore de máxima parcimônia (MP) concatenada das regiões gênicas *ITS*, *GAPDH*, *GS*, *ACT* e *TUB2*. Os valores nos ramos são de 1000 repetições de *bootstrap*. O código em negrito refere-se ao isolado deste estudo; outros códigos referem-se à sequência de *C. simmondsii* (BRIP28519) foi usada como outgroup..... 66
- Figura 14 - Árvore de máxima parcimônia (MP) concatenada das regiões gênicas *EF-1 $\alpha$* , *TUB2* e *ITS*. Os valores nos ramos são de 1000 repetições de *bootstrap*. O código BAN82 em negrito refere-se ao isolado deste estudo; outros códigos em negrito referem-se as sequências tipos. Sequência de *Diplodia seriata* (CBS\_112555) foi usada como outgroup ..... 67
- Figura 15 - (A) Microscopia Eletrônica de Varredura de LPPC389 na ausência do antagonista, (B e C) tratamento com a cepa bacteriana LPPC170, (D) BAN82 na ausência do antagonista, (E e F) tratamento com a cepa bacteriana LPPC170. As imagens foram observadas após 4 dias de incubação a  $28 \pm 2$  °C ..... 69
- Figura 16 - Análise PLS-DA dos valores de área obtido por CG-EM da emissão de COVs de LPPC170 (*Bacillus* sp.), LPPC389 (*C. musae*) e co-cultivo (*Bacillus* sp. x

*C. musae*) em triplicatas biológicas. (a) Gráfico de escores: Cultura axênica da cepa bacteriana (vermelho), Cultura axênica da cepa fúngica do patógeno LPPC389 (azul) e co-cultivo (verde); (b) Gráfico de loadings em escala de correlação: Em regiões positivas: cultura axênica de cepa bacteriana e cepa fúngica. Em regiões negativas: co-cultivo. (c) Gráfico de Heatmap da correlação das três análises diferentes e abundância relativa de emissão de VOCs (n=3). A análise de variância (ANOVA) usando o método LSD de Fisher mostrou um valor de p significativo (0,05) ..... 72

Figura 17 - Análise PLS-DA dos valores de área obtido por CG-EM da emissão de COVs de LPPC170 (*Bacillus* sp.), BAN82 (*L. brasiliensis*) e co-cultivo (*Bacillus* sp x *L. brasiliensis*) (n=3). (a) Gráfico de escores: Cultura axênica da cepa bacteriana (vermelho), cultura axênica da cepa fúngica (lilás) e co-cultivo (verde); (b) Gráfico de loadings em escala de correlação: Em regiões positivas: COVs correlacionados a cepa bacteriana e o isolado fúngico. Em regiões negativas: COVs no co-cultivo. (c) Gráfico de Heatmap da correlação das três análises diferentes e abundância relativa de emissão de COVs (n=3). A análise de variância (ANOVA) usando o método LSD de Fisher mostrou um valor de p significativo (0,05)..... 74

Figura 18 - Teste de atividade antifúngica de COVs padrões em placas divididas (n=3). (A) Inibição do crescimento micelial de *C. musae* (LPPC389). (B) Inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia brasiliensis* (BAN82). Ácido 3-metilbutanoico (15), ácido butanoico (13), ácido valérico (21), ácido propanoico (6) e ácido acético (3) ..... 76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Bacillus</i> comercializadas no Brasil como agentes probióticos.....	27
Tabela 2 - Compostos orgânicos voláteis de <i>Bacillus</i> e suas principais aplicações.....	30
Tabela 3 - VOCs identified in <i>Bacillus</i> sp. (LPPC170) and <i>F. kalimantanense</i> (LPPC130) strains and co-culture using SPME extraction and GC-MS analysis (n=3) after three days of cultivation. ....	50
Tabela 4 - Efeito antagônico dos COVs da cepa <i>Bacillus</i> sp. LPPC170 frente ao crescimento micelial de <i>C. musae</i> LPPC389 (A e B) e <i>Lasiodiplodia brasiliensis</i> BAN82 (C e D) em testes in vitro. Os dados são a média de cinco repetições com $\pm$ desvio padrão (DP). As médias nos dois testes apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste Fischer LSD ( $P < 0,05$ ).....	68
Tabela 5 - COVs identificados por análises de CG-EM nas culturas axênicas de <i>Bacillus</i> sp. LPPC170, <i>C. musae</i> LPPC389 e <i>L. brasiliensis</i> BAN82 e na co-cultura de LPPC170 x LPPC389 e LPPC170 x BAN82. Abundância relativa (%) dos valores de área. Os dados são a média de três repetições com $\pm$ desvio padrão (DP). ....	70
Tabela 6 - Teste de atividade antifúngica de padrões comerciais de ácidos orgânicos frente aos fitopatógenos <i>C. musae</i> LPPC389 e <i>L. brasiliensis</i> BAN82. Os COVs foram testados individualmente durante 3 dias, em triplicatas (cada repetição uma placa). Foi usado um volume de 150 $\mu$ L de cada substância pura, exceto para o ácido 2-metilbut-2-enoico usado em uma concentração de 1 mg/mL. (NI=não inibiu).....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Atm	Atmosfera
BDA	Batata Dextrose Ágar
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
Da	Dalton, Unidade de massa atômica.
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
Foc	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>cubense</i>
f. sp.	<i>Forma specialis</i>
g/L	Gramas por Litro
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KI	Índice de Kovats
LPPC	Laboratório de Patologia Pós-colheita
LSD	Least Significant Difference
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Polymerase Chain Reactions
PLS-DA	Partial Least Squares Discriminant Analysis
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
nm	Nanômetro
RN	Rio Grande do Norte
S.A	Sociedade Anônima
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SPME	Solid Phase Microextraction
SI	Similarity Index
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
µL	MicroLitro
UV	Ultravioleta
CNPAT	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO DO ANTAGONISMO DE COVs DE <i>Bacillus</i> spp. CONTRA ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp. e <i>Lasiodiplodia</i> spp.</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>ANTAGONISM OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF THE <i>Bacillus</i> sp. AGAINST <i>Fusarium kalimantanense</i></b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE BANANA (<i>Colletotrichum musae</i> e <i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>)</b> .....	<b>58</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>80</b>
	<b>ANEXO A – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS</b> .....	<b>86</b>
	<b>ANEXO B – ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS IDENTIFICADOS DE <i>Bacillus</i> SP. LPPC170, <i>C. musa</i> LPPC389 E <i>L. brasilienses</i> BAN82</b> .....	<b>88</b>
	<b>ANEXO C – PERFIS CROMATOGRÁFICO DAS ANÁLISES DE COVs POR GCMS</b> .....	<b>99</b>
	<b>ANEXO D – ANÁLISES DE VALIDAÇÃO CRUZADA DOS DADOS DE PLS-DA</b> .....	<b>111</b>



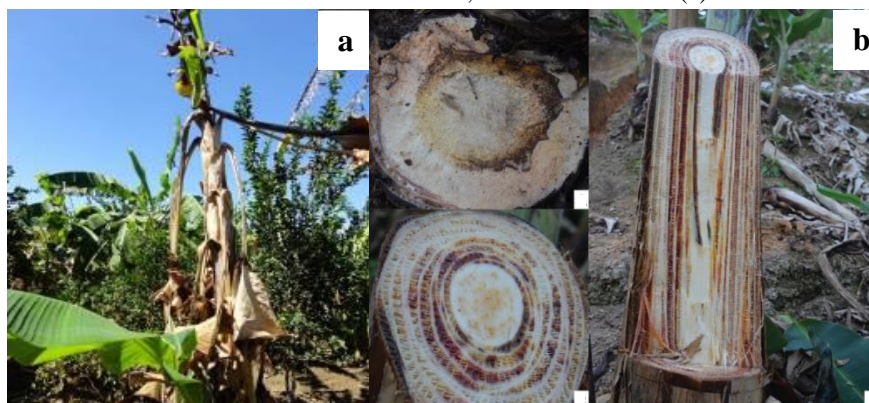
## 1 INTRODUÇÃO

A banana é uma pseudobaga da bananeira (*Musa* spp.), está entre as principais frutas consumidas no mundo. Apresenta valor comercial relativamente baixo, alto valor nutritivo e o seu consumo *in natura*, a torna uma das frutas mais populares e consumidas em países tropicais como o Brasil (Nomoura, 2020). O Brasil é o quarto produtor mundial de bananas e exporta apenas 1% de sua produção, ou seja, a maior parte do produto é consumido internamente e a principal finalidade é para alimentação humana (Nomoura, 2020; IBGE, 2021).

Estima-se que no ano de 2021 foram produzidas, no Brasil, 6.995.706 toneladas de frutos de banana (IBGE, 2021). Esse produto tem um mercado muito amplo em todas as regiões do país, o que torna a produção comercialmente viável e economicamente rentável. O setor da bananicultura movimentou cerca de 7,5 bilhões de reais no ano de 2021, portanto, apresenta grande importância social para o setor econômico, gerando quinhentos mil empregos diretos e um milhão de empregos indiretos, sendo que 48% dessa produção vem de pequenos produtores (IBGE, 2021; Rocha, 2021).

Um dos principais problemas que vem afetando a bananicultura mundial é o mal do Panamá ou murcha do *Fusarium* (FIGURA 1). O principal agente causal dessa doença são as espécies do complexo *Fusarium oxysporum*, destacando-se o *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) (E.F. Smith) Snyder e Hansen. Mais recentemente foi relatado no Brasil uma nova espécie: *F. kalimantanense* (Maryani *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2023). O Foc tem causado dizimação de bananais em várias partes do mundo, principalmente em países de clima tropical. Estima-se que uma estirpe do Foc raça 4 tropical (R4T) tenha dizimado 8 milhões de bananeiras por ano na Indonésia, e mais de 80% das cultivares de banana produzidas no mundo são suscetíveis a esta raça do patógeno (BRASIL, 2018).

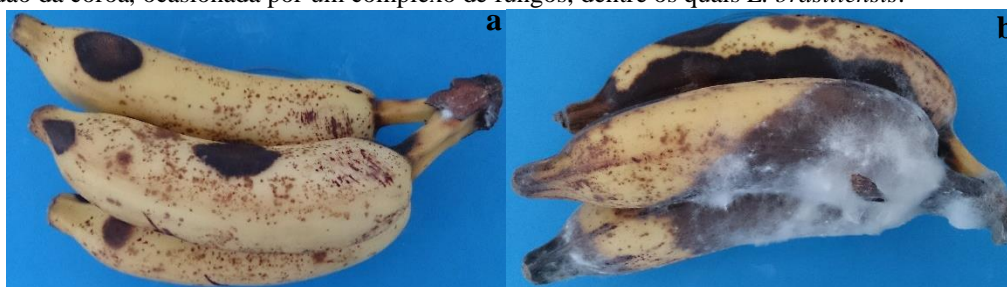
**Figura 1** - Bananeiras com sintoma do mal do Panamá; sintomas externos (a) e sintomas internos (b).



Fonte: (a) Christiana Bruce; (b) Brasil, 2018.

Além da problemática das infecções de Foc nos cultivares, o fruto da bananeira também enfrenta danos (quantidade e qualidade) e perdas econômicas na fase de pós-colheita. Nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, as perdas pós-colheita de frutas e hortaliças são em torno de 30-40 % da produção. Parte desses problemas são provocados por fungos fitopatogênicos como os gêneros *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia* (Spagnol, 2018; Contarino, *et al.*, 2019). As espécies de *Lasiodiplodia* fazem parte de um complexo de fungos, que são agente causal da podridão na região da coroa dos frutos (Kamel, Cortesi e Saracchi, 2016). Enquanto que, *Colletotrichum musae* é o patógeno responsável pela enfermidade conhecida como antracnose (Vilaplana, *et al.*, 2018). Estas duas doenças da fase de pós-colheita reduzem drasticamente a vida de prateleira dos frutos (FIGURA 2a e 2b).

**Figura 2 - (a)** Frutos de banana, após 3-4 dias de incubação em condições de temperatura e umidade controlada, com sintomas típicos de antracnose causada pelo fungo *C. musae*. **(b)** Frutos de banana com sintomas típicos da podridão da coroa, ocasionada por um complexo de fungos, dentre os quais *L. brasiliensis*.



Autor: Christiana Bruce

Para resolução da problemática de doenças de pós-colheita os fungicidas são essenciais para controlar doenças e garantir a segurança alimentar em todo mundo. No entanto, é cada vez mais conhecido que o controle de doenças a partir de agrotóxicos não é a forma mais segura. Os micro-organismos são muito evoluídos do ponto de vista biológico, e possuem facilidades para desenvolver mecanismos de defesa contra moléculas antimicrobianas, adquirindo resistência a essas substâncias. Além disso, os problemas de contaminação do meio ambiente, dos alimentos e mananciais causam grandes impactos para a saúde humana e animal, além de provocar a morte da microbiota do solo, a redução da biodiversidade, dentre outros (Noumavo, *et al.*, 2016; Gao, *et al.*, 2017; Gao, *et al.*, 2018).

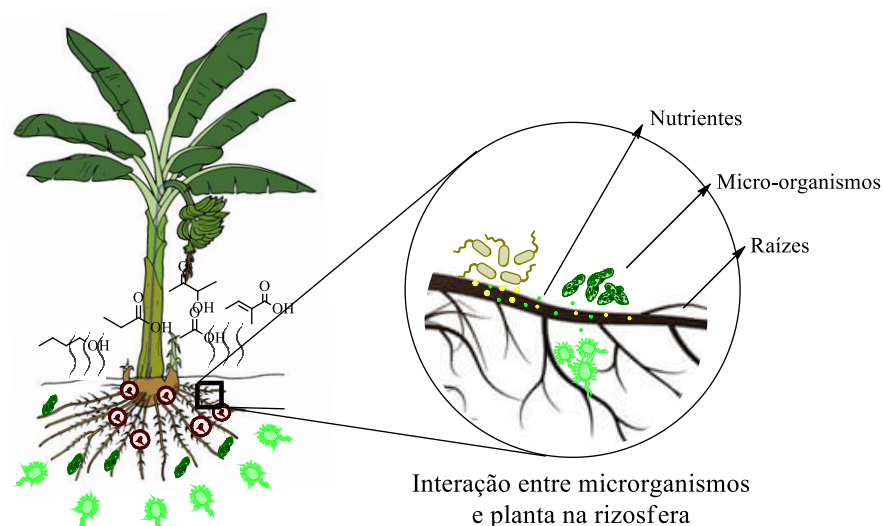
Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para reduzir ou substituir o uso de agrotóxicos em campos agrícolas está se tornando um grande desafio. A implantação de uma agricultura mais sustentável, sem agredir o meio ambiente e garantir segurança alimentar para uma população de 7 bilhões de pessoas, é uma tarefa de extrema importância para a ciência desse século (Chen, *et al.*, 2013).

Assim, o biocontrole ou controle biológico vem despontando como a alternativa mais segura e eficiente para substituir os defensivos no manejo das doenças na agricultura. Uma única cepa de micro-organismo pode ser usada para controlar várias outros patógenos, promover um melhor condicionamento do solo, o crescimento e produtividade das plantas, além de não apresentar toxicidade ao meio ambiente (Gao, *et al.*, 2017).

Os micro-organismos presentes na rizosfera (região onde as raízes das plantas estão em contato com o solo, sendo, portanto, um ambiente rico em nutrientes e micro-organismos) constituem a primeira linha de defesa da planta contra ataques de patógenos. A microbiota do solo tem a mesma função da microbiota do corpo humano. Com isso, se houver um desequilíbrio entre patógenos e antagonistas surgirá uma infecção e a doença se manifestará (FIGURA 3). Através dessa simbiose, espécies de plantas conseguem sobreviver à ataques de doenças causadas por patógenos, antes mesmo de existir os agrotóxicos. Para tanto, se torna importante conhecer melhor quais os tipos de organismos capazes de desenvolver antagonismos à fitopatógenos, além dos mecanismos químicos e biológicos envolvidos nesse contexto (Mendes, *et al.*, 2011; Carrión, *et al.*, 2019).

O fator enzimático é a principal arma utilizada pelos micro-organismos no confronto direto entre as espécies (Mendes, *et al.*, 2011). No entanto, existem outras formas de comunicação química que os micro-organismos usam para demarcar espaços, e manter as cepas patogênicas distantes. O primeiro mecanismo de defesa é a emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelo antagonista da rizosfera (FIGURA 3). Esses COVs são liberados no ambiente e conseguem facilmente se dissipar podendo delimitar um raio de ação abaixo e acima do solo (Del Rosario, Chiappero e Banchio, 2019).

**Figura 3** - Região da rizosfera onde ocorre mecanismo de defesa da planta através de antagonismo de micro-organismos.

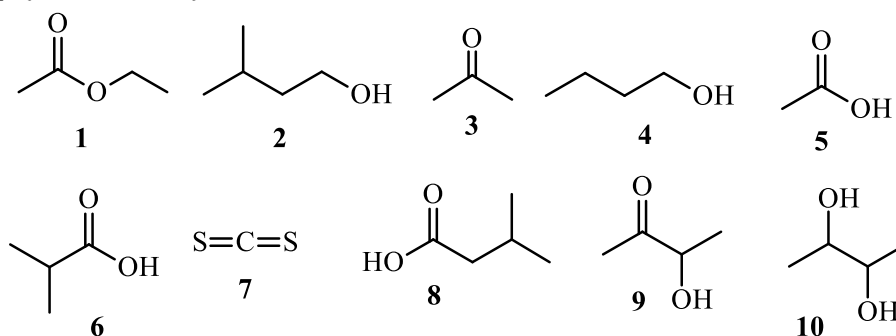


Fonte: Próprio autor

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são moléculas de baixo peso molecular (menor que 500 Da), alta pressão de vapor, que apresentam caráter lipofílico e baixa polaridade. Desta forma, são moléculas de fácil evaporação em temperatura ambiente e desempenham um papel importante na química biológica dos micro-organismos, de plantas e dos seres humanos (Effmert *et al.*, 2012; Lemfack *et al.*, 2016). Os micro-organismos produzem COVs para realizar comunicação química, seja como mecanismo de defesa ou como sinalização entre espécies. A comunicação química entre espécies se dá, principalmente, através da emissão de moléculas de baixo peso molecular. Assim, compreender essas interações pode ser um caminho alternativo e sustentável para a descoberta de metabólitos secundários bioativos (Morath, Hung e Bennett, 2012; Jamil *et al.*, 2022). A análise e caracterização estrutural de COVs emitidos por micro-organismos em experimentos de co-cultivo e avaliação da atividade antagonista frente a fitopatógenos, se mostra como uma estratégia moderna e eficiente para a prevenção e manejo de doenças na agricultura.

Espécies do gênero *Bacillus* são relatadas como importantes agentes de biocontrole de diversos fitopatógenos habitantes do solo e da fase de pós-colheita através da emissão de COVs (Chaves, *et al.*, 2015; Shafi, Tian e Ji, 2017; Rath, Mitchell e Gold, 2018). Um estudo realizado com as cepas de *B. cereus*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens*, mostrou o potencial dos COVs dessas espécies contra os patógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* e *Moniliophthora perniciosa*. Dentre os compostos identificados, acetato de etila (**1**), 3-metilbutanol (**2**), propano-2-ona (**3**), butanol (**4**), ácido acético (**5**), ácido 2-metilpropanóico (**6**), dissulfeto de carbono (**7**) e ácido 3-metilbutanoico (**8**) foram considerados como responsáveis pela inibição do crescimento micelial dos isolados fitopatogênicos (Chaves, *et al.*, 2015). Além disso, os COVs 3-hidroxi-2-butanona (**9**) e 2,3-butanodiol (**10**) (FIGURA 4), identificados a partir das espécies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. mojavensis* são considerados como agentes promotores do crescimento de plantas (Rath, Mitchell e Gold, 2018).

**Figura 4** - Estruturas químicas de COVs identificados a partir das espécies de *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* e *B. mojavensis*.



Fonte: Próprio autor

Dentro deste contexto, a Embrapa Agroindústria Tropical-CE possui grande interesse no desenvolvimento de projetos utilizando agentes de biocontrole de fitopatógenos, onde a utilização de espécies do gênero *Bacillus* isolados da rizosfera é uma das linhas de pesquisa que se encontram em desenvolvimento sob a supervisão da pesquisadora Dra. Christiana de Fátima Bruce da Silva. Assim, a proposta desse projeto visa a realização de experimentos de co-cultivo utilizando cepa de *Bacillus* sp. isoladas da rizosfera de bananeiras frente a fitopatógenos *Fusarium kalimantanense* LPPC130 (sistema radicular), *Colletotrichum musae* LPPC389 (frutos) e *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82 (frutos), para a identificação de COVs com possível atividade antifúngica.

## **1.2 Objetivos**

### ***1.2.1 Objetivo geral***

Identificar os principais compostos orgânicos voláteis emitidos por cepas de *Bacillus* isoladas da rizosfera de bananeiras e avaliar o potencial antifúngico desses compostos contra fitopatógenos da bananeira.

### ***1.2.2 Objetivos específicos***

1. Confrontar a cepa bacteriana *Bacillus* sp. LPPC170 contra os três fitopatógenos (*F. kalimantanense* LPPC130, *C. musae* LPPC389 e *L. brasiliensis* BAN82) em sistema de co-cultura.
2. Identificar os COVs presentes na cultura axênica de cada cepa microbiana e na co-cultura através da técnica de microextração de fase sólida (SPME) e de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).
3. Estudar o mecanismo de ação dos COVs, emitidos pela cepa LPPC170, na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos através da microscopia eletrônica de varredura (MEV).
4. Identificar padrões matemáticos que indiquem quais COVs são mais expressivos na cultura axênica e co-cultura.
5. Usar padrões comerciais dos principais COVs para testar a atividade antifúngica contra as três cepas fitopatogênicas.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Alerta quarentenário: *Fusarium exysporum* f. sp. *cubense***, raça 4 tropical (R4T) / Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: MAPA, 2018. 12p.
- CARRIÓN, V. J., PEREZ-JARAMILLO, J., CORDOVEZ, V., TRACANNA, V., DE HOLLANDER, M., RUIZ-BUCK, D., & RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, Washington, D.C, v. 366, p. 606-612, 2019.
- CHAVES-LÓPEZ, C., SERIO, A., GIANOTTI, A., SACCHETTI, G., NDAGIJIMANA, M., CICCARONE, C., PAPARELLA, A. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, p. 487-499, 2015.
- CHEN, F., WANG, M., ZHENG, Y., LI, S., WANG, H., HAN, D., GUO, S. The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and PCR-DGGE. **Current Microbiology**, Cham, v. 67, p. 177-182, 2013.
- CONTARINO, R., BRIGHINA, S., FALLICO, B., CIRVILLERI, G., PARAFATI, L., RESTUCCIA, C. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 70-74, 2019.
- DEL ROSARIO CAPPELLARI, L., CHIAPPERO, J., BANCHIO, E. Invisible signals from the underground: A practical method to investigate the effect of microbial volatile organic compounds emitted by rhizobacteria on plant growth. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Malden, v. 47, p. 363-484, 2019.
- EFFMERT, U., KALDERÁS, J., WARNKE, R., PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of Chemical Ecology**, Cham, v. 38, p. 665-703, 2012.
- GAO, H., LI, P., XU, X., ZENG, Q., GUAN, W. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 456-471, 2018.
- GAO, H., XU, X., ZENG, Q., LI, P. Optimization of headspace solid-phase microextraction for GC-MS analysis of volatile compounds produced by biocontrol strain *Bacillus subtilis* CF-3 using response surface methodology. **Food Science and Technology Research**, Basileia, v. 23, p. 583-593, 2017.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistemico-da-producao-agricola.html?=&t=destaques>. Acesso em: Junho de 2022.

- JAMIL, F., MUKHTAR, H., FOUILLAUD, M., DUFOSSÉ, L. Rhizosphere signaling: Insights into plant–rhizomicrobiome interactions for sustainable agronomy. **Microorganisms**, Basileia, v.10, p. 1-27, 2022.
- KAMEL, M. A. M., CORTESI, P., & SARACCHI, M. Etiological agents of crown rot of organic bananas in Dominican Republic. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 120, p. 112-120, 2016.
- LEMFACK, M. C., RAVELLA, S. R., LORENZ, N., KAI, M., JUNG, K., SCHULZ, S., PIECHULLA, B. Novel volatiles of skin-borne bacteria inhibit the growth of gram-positive bacteria and affect quorum-sensing controlled phenotypes of gram-negative bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 503-515, 2016.
- MARYANI, N., LOMBARD, L., POERBA, Y. S., SUBANDIYAH, S., CROUS, P. W., KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 91, p. 79-99, 2018.
- MENDES, R., KRUIJT, M., DE BRUIJN, I., DEKKERS, E., VAN DER VOORT, M., SCHNEIDER, J. H., RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washington D.C, v. 332, p. 1097-1100, 2011.
- MORATH, S. U., HUNG, R., BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 73-83, 2012.
- NOMURA, E. S. Risco real da bananicultura nacional. **AGRIANUAL 2020**, São Paulo, p.141-144, 2020.
- NOUMAVO, P. A., AGBODJATO, N. A., BABA-MOUSSA, F., ADJANOHOUN, A., BABA-MOUSSA, L. Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 15, p. 1452-1463, 2016.
- RATH, M., MITCHELL, T. R., GOLD, S. E. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 208, p.76-84, 2018.
- ROCHA, S. L., APOLINÁRIO, Á. F. A. G., ROCHA, M. A. Canais de comercialização de banana in natura no Brasil. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das almas, v. 246, p. 1-16, 2021.
- SANTOS, J. E. Á., SILVA, D. E. M., VIEIRA, R. F. B. D. S., CARVALHO, A. M. S., SCHURT, D. A., LIMA, M. A. S., SILVA, C. F. B. First report of *Fusarium kalimantanense* causing *Fusarium* wilt on banana tree in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 107, p. 227, 2023.
- SHAFI, J., TIAN, H., JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 31, p. 446-459, 2017.

SPAGNOL, W. Redução de perdas nas cadeias de frutas e hortaliças pela análise da vida útil dinâmica. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 21, p. 1-10, 2018.

VILAPLANA, R., HURTADO, G., VALENCIA-CHAMORRO, S. Hot water dips elicit disease resistance against anthracnose caused by *Colletotrichum musae* in organic bananas (*Musa acuminata*). **LWT**, Athens, v. 95, p. 247-254, 2018.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO DO ANTAGONISMO DE COVs DE *Bacillus* spp. CONTRA ESPÉCIES DE *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. e *Lasiodiplodia* spp.

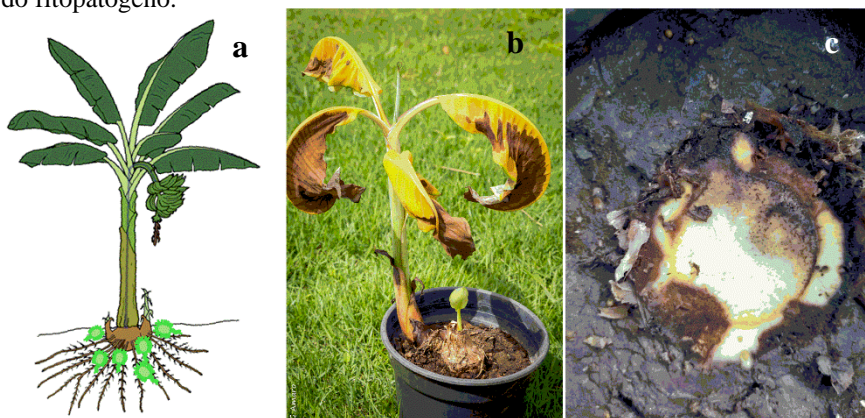
### 2.1 Mal do Panamá na cultura da banana

O mal do Panamá ou murcha do *Fusarium* é uma doença que acomete o cultivo de bananeiras (*Musa* spp.) no mundo inteiro, sendo causada pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) e suas linhagens filogenéticas (Ploetz, 2015; Maryani *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020a). Esta doença tem se tornado o principal obstáculo para a produção de bananas em várias regiões do planeta, sendo considerada como uma das maiores ameaças a bananicultura (Ploetz, 2015).

O Foc é um patógeno habitante do solo e sobrevive principalmente em restos de matéria orgânica, sendo capaz de permanecer no solo por vários anos, mesmo sem a presença do hospedeiro. Apesar de originado na Ásia, o fitopatógeno foi dispersado para outros continentes através do transporte de materiais vegetativos utilizados para plantio (rizomas) e de plantas infectadas (Pérez-Vicente, 2004).

A infecção ocorre através do xilema do hospedeiro, onde o patógeno ocasiona obstrução dos vasos condutores, e conseqüentemente danos na absorção de nutrientes da planta (Dong *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020a). Os principais sintomas observados nas plantas são o surgimento de folhas murchas, amarelas, apodrecimento das raízes, necrose do pseudocaule e dos vasos de rizomas (FIGURA 5) (Pérez-Vicente, 2004).

**Figura 5** - (a) Esquema do processo de infecção da planta de bananeira. (b) Muda de bananeira cv. Maçã com sintomas do mal do Panamá. (c) Pseudocaule necrosado apresentando sintomas de infecção, após 75 dias de inoculação do fitopatógeno.



Fonte: (a) Próprio autor, (b) Daniel Schurt e (c) Christiana Bruce

O Foc apresenta quatro raças, as quais são definidas pela patogenicidade que cada uma delas é capaz de causar nos diferentes cultivares (Pérez-Vicente, 2004; Ploetz, 2015). A raça 1 infecta principalmente as espécies de bananeiras Manzano (banana-maçã) e Gros-Michel. Enquanto que, a raça 2 é responsável por doenças na cultivar Bluggoe (banana-figo) (Stover e Waite, 1960). Até o momento não existe um consenso se a raça 3 é considerada um patógeno de banana, porém é conhecida como patogênico a helicônias (Zhang *et al.*, 2021). Já a raça 4 é conhecida por infectar espécies de bananeiras resistentes às raças 1 e 2. Essa raça foi classificada a partir da década de 1990, por ocasionar danos nas espécies de bananeiras do grupo Cavendish, no sudeste da Ásia (Ploetz, 2015).

Para o manejo do Foc, medidas como a rotação de culturas, substituição dos cultivares susceptíveis a doença e aplicação de biofertilizantes estão sendo as estratégias mais eficazes de exclusão ao patógeno (Ploetz, 2015; Mon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Porém, por ser um patógeno de solo, o seu manejo através do uso de fungicidas se torna muito difícil, devido principalmente às questões ambientais (Li *et al.*, 2020b; Mon *et al.*, 2021).

A aplicação de fungicidas no solo afeta consideravelmente a microbiota, causando desequilíbrio e empobrecimento deste *habitat* (Bubici *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020b). Portanto, existe um grande interesse no desenvolvimento de produtos probióticos com aspecto multifuncional (promoção de crescimento de plantas e controle biológico de patógenos) que possam ser utilizados de forma eficaz e ecologicamente segura no manejo deste patógeno (Marcano *et al.*, 2016).

Dentro deste contexto, o uso de agentes biológicos da rizosfera vem sendo estudado como alternativa para o manejo do mal do Panamá. Os solos da rizosfera de plantas resistentes/tolerantes aos patógenos são ricos em micro-organismos antagonistas capazes de suprimir agentes causadores de doenças (Xue *et al.* 2015). Várias pesquisas com espécies de *Bacillus* ou consórcios de micro-organismos, que ajudam a potencializar os efeitos de supressão contra o Foc, vêm sendo desenvolvidas (Xue *et al.* 2015; Han *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2019; Yadav *et al.*, 2021), através de estudos na área de manejo, utilização de agentes biológicos e químicos.

## 2.2 Doenças pós-colheita da banana

A antracnose e a podridão da coroa, causadas pelos fungos *Colletotrichum musae* e *Lasiodiplodia* spp., respectivamente, são as principais doenças da pós-colheita da banana (FAO, 2020), além de acometer outros frutos tropicais, como manga, mamão, pitaita, abacate e goiaba

(Zakaria, 2021). Estas infecções causam podridão nos frutos (FIGURA 2a), levando a danos quantitativos e qualitativos, bem como perdas precoces, com impactos econômicos consideráveis (Balendres, Mendoza e Cueva, 2019).

O gênero *Colletotrichum* abrange atualmente um total de 252 espécies identificadas (Talhinhas e Baroncelli, 2021; Guevara-Suarez *et al.*, 2022). Apesar de diversas espécies serem relatadas como agentes da antracnose em frutos (Zakaria, 2021), o fitopatógeno *C. musae* é a espécie mais associada à antracnose da banana no Brasil (Vieira *et al.*, 2017).

Para o manejo da antracnose, dados da literatura relatam o uso de diferentes cepas de *Bacillus* spp. como agentes antagonistas para o controle biológico de *Colletotrichum* spp. (Damasceno *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020). Estas bactérias secretam toxinas ou emitem compostos orgânicos voláteis que tem o papel de inibir o desenvolvimento do patógeno. No Brasil, nove empresas que comercializam diferentes ingredientes ativos de *B. amyloliquefaciens*, além de quatro produtos comercializados com diferentes cepas de *B. subtilis* (Agrofit, 2022), estão registradas no ministério da Agricultura e Meio Ambiente (MAPA) para o manejo biológico destes fitopatógenos.

Assim como a antracnose, a podridão da coroa ocasiona necrose em frutos, reduzindo a vida de prateleira do produto e aumentando as perdas pós-colheita (FIGURA 2b) (Kamel, Cortesi e Saracchi, 2016). O fitopatógeno *Lasiodiplodia brasiliensis* é um dos responsáveis por causar esta enfermidade em frutos da banana. Os frutos durante o seu amadurecimento apresentam altos teores de açúcares e baixos níveis de pH, que favorecem o desenvolvimento do patógeno (Alvindia, 2012). Somado às condições nutricionais, as condições ambientais (temperatura e umidade) podem ser preponderantes para o desenvolvimento do patógeno, proporcionando rápido crescimento nestas condições. E, em muitos casos, podem ocorrer também a seleção de isolados fúngicos resistentes aos fungicidas utilizados no manejo da doença (Guimarães *et al.*, 2019; Kulkarni *et al.*, 2022).

Dentro desse contexto de manejo da resistência a defensivos, o uso de micro-organismos para o controle biológico das doenças na fase de pós-colheita pode ser uma alternativa interessante. Por exemplo, o caldo da cultura celular de uma cepa de *B. amyloliquefaciens* HBR-2 mostrou atividade antagonista contra diferentes cepas resistentes a fungicidas de *L. theobromae* causadores da podridão da coroa em frutos de manga (Yang, *et al.*, 2021). Em outro estudo, o sobrenadante da cultura da cepa *B. amyloliquefaciens* JN15 inibiu em até 60% o crescimento micelial do patógeno *L. theobromae* (Chukeatirote, Phueaouan e Piwkam, 2018). Apesar de ser um fitopatógeno causador de doenças importantes, ainda não existe um bioproduto específico para controle da podridão de coroa.

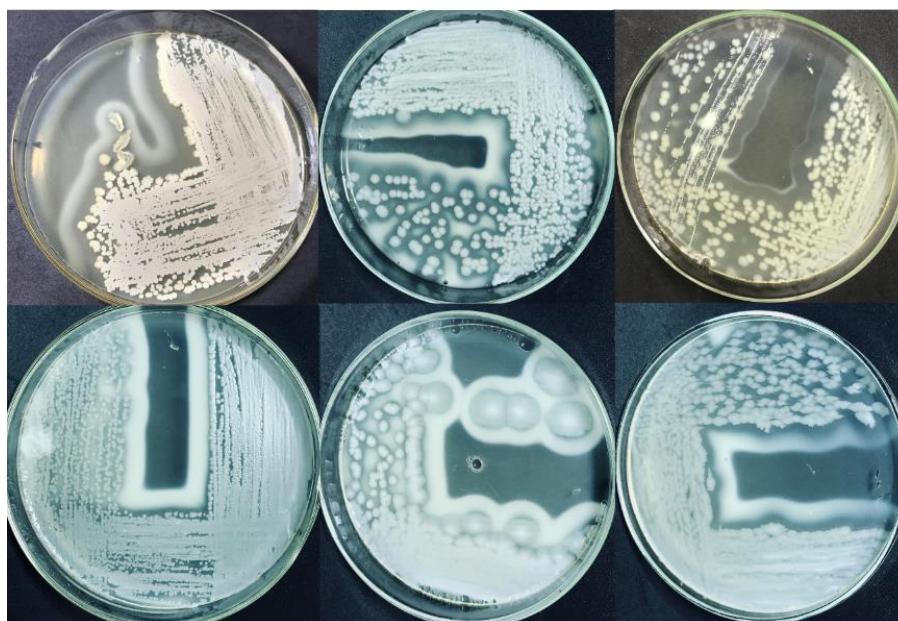
### 2.3 Gênero *Bacillus*

*Bacillus* é um gênero pertencente ao filo Firmicutes e formado por bactérias gram-positivas com formato de bastonetes, com pelo menos 266 espécies catalogadas (FIGURA 6) (James *et al.*, 2021). Uma das suas principais características é a capacidade de produzir esporos: formação de uma estrutura externa dura, dormente e não reprodutiva conhecida como endósporo, o que as tornam resistentes a situações de estresses tais como: aumento de temperatura, resistência a produtos químicos e a radiação UV, dentre outras (Mongkoltharuk, 2012; Jeżewska-Fraćkowiak *et al.*, 2018).

Apesar de ser muito comum a presença de espécies de *Bacillus* no trato intestinal de animais e seres humanos, o principal *habitat* dessa estirpe é o solo. Portanto, são comumente encontradas na rizosfera e caracterizadas como rizobactérias (James *et al.*, 2021).

Vários estudos têm demonstrado o potencial dessas espécies como agentes antimicrobianos (Gao *et al.*, 2018), promotores de crescimento de plantas (Gutiérrez-Luna *et al.*, 2020), como probiótico na indústria de alimentos (Deng *et al.*, 2021; Lucey *et al.*, 2021) e produtores de enzimas responsáveis por transformações químicas como lacase, lipase, amilase e protease (Mongkoltharuk, 2012; Deng *et al.*, 2021; James *et al.*, 2021).

**Figura 6** - Culturas de *Bacillus* spp. repicadas por técnica de estriamento.



Fonte: Próprio autor

Em geral, as espécies de *Bacillus* são benéficas para os humanos, animais e plantas. Em humanos e animais sua principal aplicação é no tratamento de infecções gastrointestinais

(Elshagabee *et al.*, 2017; Piewngam *et al.*, 2017; Jeżewska-Fraçkowiak *et al.*, 2018). Em plantas, estudos tem demonstrado o potencial dessas cepas na promoção do crescimento, e como elicitores de indução de resistência sistêmica (Kloepper, Ryu e Zhang, 2004; Deng *et al.*, 2021), além do grande potencial como agentes de biocontrole de doenças.

No Brasil, várias espécies de *Bacillus* já possuem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para serem utilizadas na agricultura como biopesticidas. Suas principais aplicações são como nematicidas, inseticidas microbiológicos, fungistático/bacteriostáticos e fungicidas biológicos (Anvisa, 2020). A principal vantagem desses produtos biológicos é o baixo impacto no meio ambiente e consequentemente na saúde dos seres humanos, já que estes micro-organismos utilizam princípios ativos biológicos e semioquímicos para interagir com outras espécies (Kerkut e Gilbert, 1985).

A Tabela 1 mostra as espécies de *Bacillus* e os principais produtos comerciais registrados para uso na agricultura no Brasil. É interessante ressaltar que alguns produtos são formulados a partir de consórcio de cepas da mesma espécie, como é o caso do produto comercial Acera®, formulado por duas cepas distintas de *B. thuringiensis*.

**Tabela 1** - Espécies de *Bacillus* comercializadas no Brasil como agentes probióticos.

<b>Espécie</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Produto comercial</b>
<i>B. sphaericus</i>	Inseticida microbiológico	Vectolex® (Sumitomo Chemical Co., LTDA) Sphaerus SC® (Bthek biotecnologia LTDA)
<i>B. subtilis</i>	Fungicida/fungistático, bactericida/ bacteriostático e nematicida	Serenade® (Bayer S.A.)
<i>B. pumilus</i>	Fungicida	Dipel WG. ® (Sumitomo Chemical Co., LTDA) Serenade® (Bayer S.A)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Nematicida e fungicida microbiológico	Duravel® (Basf S.A) NemaControl® (Simbiose LTDA.) No-Nema® (Biovalens Ltda)
<i>B. methylotrophicus</i>	Nematicida microbiológico	Onix OG® (Lallemand LTDA)
<i>B. firmus</i>	Nematicida microbiológico	Andril Prime® e Votivo Prime® (Basf S.A)
<i>B. thuringiensis</i>	Inseticida microbiológico	Agree® (Certis USA, LLC) Dipel® (Sumitomo Chemical Co., LTDA) BtControl® (Simbiose LTDA.) Acera® (Ballagro Agro Tecnologia Ltda)

		Bt-horus® (Bthek biotecnologia LTDA)
<i>B. licheniformis</i>	Nematicida microbiológico	Quartzo® e Presence® (FMC Química do Brasil LTDA)
<i>B. velezensis</i>	Nematicida e fungicida microbiológico	Ataplan® (FMC Química do Brasil LTDA)

Fonte: Próprio autor

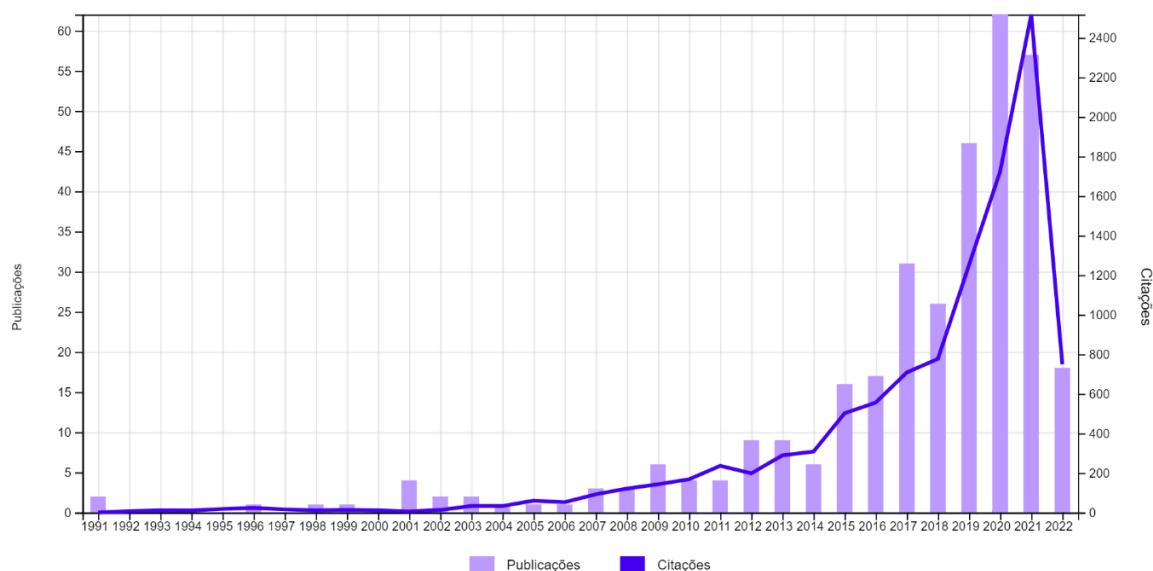
#### 2.4 Estudos sobre os compostos orgânicos voláteis de *Bacillus* spp.

Segundo o levantamento bibliográfico utilizando o site *Web of Science*, no período de 1991 a 2022 foram produzidas 333 publicações utilizando o termo “*Volatile organic compounds*” e “*Bacillus*”. Essas publicações geraram mais de 10 500 citações, com uma média de 32,01 citações por artigo. A Figura 7 mostra que o estudo de COVs de *Bacillus* tem crescido a partir de 2015, demonstrando o potencial biotecnológico destes micro-organismos, que até então foram pouco explorados.

O levantamento bibliográfico teve como objetivo encontrar estudos específicos de COVs, na sua forma isolada, emitidos por espécies do gênero *Bacillus*, e avaliação da atividade antifúngica contra os fitopatógenos dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia*. Dos 333 artigos publicados, apenas 9,7% estão relacionados aos estudos químicos para identificação de moléculas com potencial biotecnológico e de biocontrole.

De acordo com a busca realizada, foram encontrados 44 COVs identificados nas espécies de *Bacillus* como *B. amyloliquefaciens*, *B. vallismortis*, *B. megaterium*, *B. artrophaeus*, *B. subtilis*, *B. velezensis* e *B. pumilus* com atividades comprovadas em promoção de crescimento de plantas, e atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Monilinia laxa*, *M. fructicola*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas oryzae*, *Clavibacter michiganensis*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *C. gloeosporioides* e *C. lindemuthianum*.

**Figura 7** - Número de publicações e citações de artigos científicos publicados contendo as palavras-chaves “Volatile organic compounds” e “*Bacillus*”.



Fonte: site: <https://www-webofscience.ez11.periodicos.capes.gov.br>.

A maior parte dos COVs são compostos oxigenados pertencentes à classe das cetonas, ácidos carboxílicos, álcoois e éster. Pôde-se ainda observar que a maioria dos estudos estão voltados para a ação do sinergismo das moléculas, onde alguns autores atribuem a atividade de inibição aos compostos majoritários emitidos pelo micro-organismo.

Quando se faz o estudo de COVs em micro-organismos, várias substâncias de diversas classes químicas são identificadas. Vários artigos científicos têm se aprofundado nos estudos de moléculas alvo, identificando dentro do conjunto de COVs aqueles que são responsáveis por promover a atividade antimicrobiana. A Tabela 2 traz informações sobre estudos de COVs de diferentes cepas *Bacillus*, onde foram feitos estudos do sinergismo dos compostos. E posteriormente, a partir de testes individuais de cada substância pura, identificando aquelas responsáveis pela atividade antimicrobiana, promotora de crescimento (bioestimulante) ou indução de resistência da planta (bioprotetor).

**Tabela 2** - Compostos orgânicos voláteis de *Bacillus* e suas principais aplicações.

Composto orgânico volátil	Micro-organismo	Aplicação/Patógeno alvo	Referência
Butano-2,3-diol (1)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Bioestimulante Bioprotetor	Ryu <i>et al.</i> , 2004
2-Pentilfurano (2)	<i>B. megaterium</i> XTBG34	Bioestimulante	Zou, Li e Yu, 2010
Decan-2-ona (3) 2,3,6-trimetilfenol (4) Fenol (5) 2-Etil-hexanol (6)	<i>B. amyloliquefaciens</i> NJN-6	<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Yuan <i>et al.</i> , 2012
Undecan-2-ol (7) Nonanal (8) Naftaleno (9) Benzotiazol (10) Nonan-2-ona (11)			
3-Hidroxibutan-2-ona (12)	<i>B. vallismortis</i> EXTN-1	Bioestimulante Bioprotetor	Ann <i>et al.</i> , 2013
Disulfeto de dimetila (13)	<i>Bacillus</i> sp. B55	Bioestimulante	Meldau <i>et al.</i> , 2013
2-Benziletanamina (14) Nonan-2-ona (11) Decan-2-ona (3)	<i>B. pumilus</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	Zheng <i>et al.</i> , 2013
Ácido acético (15) Ácido butírico (16) Ácido 3-metilbutanoico (17) Ácido propanoico (18)		<i>F. oxysporum</i> f. <i>sp. cubense</i>	Huang <i>et al.</i> , 2015
Tiofeno (19)	<i>B. amyloliquefaciens</i> CPA-8	<i>Monilinia laxa</i> , <i>M. fructicola</i>	Gotor-Vila <i>et al.</i> , 2017
Butanol (20)			
Acetato de <i>n</i> -butila (21) 4-Hept-1-en-4-ol (22) 3-Metil-hexan-3-ol (23)	<i>B. subtilis</i> M29	<i>B. cinerea</i>	Mu <i>et al.</i> , 2017
Nonanal (8) Benzotiazol (10)	<i>B. subtilis</i>	<i>C. michiganensis</i>	Rajer <i>et al.</i> , 2017
Acetofenona (24) Benzaldeído (25)			
1,2-Benzisotiazol-3(2 <i>H</i> )-ona (26) Benzaldeído (25)	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42 <i>B. artrophaeus</i> LSSC22	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tahir <i>et al.</i> , 2017
2,4-Di-terc-butiltiofenol (27)	<i>B. subtilis</i> CF-3	<i>C. gloeosporioides</i>	Gao <i>et al.</i> , 2018



Benzotiazol (10)			
Undecan-2-ona (28)			
<i>N,N</i> -Dimetil dodecilamina (29)	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Massawe <i>et al.</i> , 2018
Buta-1,3-dieno (30)			
Benzotiazol (10)			
Buta-1,3-dieno (30)			
Decanol (31)	<i>B. amyloliquefaciens</i> D13	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Xie <i>et al.</i> , 2018
3,5,5-Trimetil hexanol (32)			
Ácido 2-metil butanoico (33)	<i>B. amyloliquefaciens</i> ALB629	<i>C. lindemuthianum</i>	Martins <i>et al.</i> , 2019
Ácido 3-metil butanoico (17)			
Ácido cloroacético (34)			
Octadecano (35)	<i>B. atrophaeus</i> HAB-5	<i>C. gloeosporioides</i>	Rajaofera <i>et al.</i> , 2019
Ácido hexa decanóico (36)			
Acetato de metila (37)			
Nonan-2-ona (11)	<i>B. amyloliquefaciens</i> L3	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Wu <i>et al.</i> , 2019
Heptan-2-ona (38)			
Butano-2,3-diona (39)	<i>B. velezensis</i>	<i>B. cinerea</i>	Calvo <i>et al.</i> , 2020
Benzaldeído (25)			
Undecan-3-ona (40)			
Undecan-2-ol (7)			
Undecanal (41)	<i>B. velezensis</i> CT32	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>fragariae</i>	Li <i>et al.</i> , 2020a
2,4-Dimetil-6-terc- butilfenol (42)			
Benzotiazol (10)			

Fonte: Próprio autor

O composto butano-2,3-diol (**1**), produzido por *B. amyloliquefaciens* (Ryu *et al.*, 2004) já é utilizado na agricultura como bioestimulante e bioprotetor de plantas. A cepa de *B. vallismortis* EXTN-1 produziu resistência sistêmica contra um patógeno do tabaco e promoveu crescimento da planta devido a emissão do COV 3-hidroxiбутан-2-ona (**12**) (Ann *et al.*, 2013).

Outros COVs emitidos por *Bacillus* spp. também apresentaram atividade de promoção de crescimento de plantas. O composto 2-pentilfurano (**2**), produzido pela cepa *B. megaterium* XTBG34, promoveu o crescimento da planta *Arabidopsis thaliana* (Zou, Li e Yu, 2010). Uma mistura de voláteis emitido por *Bacillus* sp. B55 foi benéfico para o desenvolvimento de *Nicotina attenuata* (tabaco), a partir da suplementação com disulfeto de

dimetila (**13**), verificou-se que esse COV foi o principal responsável por promover o crescimento da planta (Meldau *et al.*, 2013).

Pouco é conhecido sobre os mecanismos de ação dos COVs na promoção do crescimento de plantas, no solo e no hospedeiro. Sabe-se que essas moléculas desempenham um papel importante na comunicação química e podem levar a uma série de processos que ajudam no desenvolvimento e sanidade das plantas (Dias *et al.*, 2021).

Vários COVs produzidos por *Bacillus* spp. também tem demonstrado potencial antimicrobiano contra diversos gêneros de micro-organismos. No entanto, a maioria dos estudos relatam sobre a atividade da mistura de compostos emitidos e poucos estudos especificam qual dos compostos são responsáveis pela atividade.

*B. amyloliquefaciens* CPA-8 produziu o COV tiofeno (**19**), que apresentou forte atividade antifúngica contra os fitopatógenos de pós-colheita *Monilinia laxa* e *M. fructicola* (Gotor-Vila *et al.*, 2017). A emissão dos compostos 1,2-benzotiazol-3(2H)-ona (**26**), benzaldeído (**25**) e buta-1,3-dieno (**8**) produzido por *B. amyloliquefaciens* FZB42 e *B. artrophaeus* LSSC22 foram eficazes contra *Ralstonia solanacearum* TBBS1, agente causal da murcha bacteriana do tabaco (Tahir *et al.*, 2017). Dentre os COVs produzidos pelo isolado *B. amyloliquefaciens* D13, o álcool decanol (**31**) e o 3,5,5-trimetilhexanol (**32**) inibiram o desenvolvimento do fitopatógeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e promoveu alterações morfológicas na bactéria (Xie *et al.*, 2018).

Cepas de *B. subtilis* biosintetizam COVs com potenciais antimicrobianos. Dentre eles, os COVs benzaldeído (**25**), nonanal (**8**), benzotiazol (**10**) e acetofenona (**24**) apresentaram atividade antibacteriana contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, que é o agente causal da podridão anelar bacteriana da batata (Rajer *et al.*, 2017). Em outro estudo, os compostos butanol (**20**), acetato de *n*-butila (**21**), hepten-4-ol (**16**) e 3-metil-hexan-3-ol (**23**) foram capazes de destruir as estruturas morfológicas de *Botrytis cinerea*, um fungo responsável por causar doenças na pós-colheita de frutos (Mu *et al.*, 2017).

O benzaldeído (**25**) e butano-2,3-diona (**18**) detectados em *B. velezensis* foram testados contra diversos fitopatógenos dentre eles o causador do mofo cinzento em frutas na pós-colheita, *B. cinerea*, e inibiram o crescimento micelial do patógeno controlando a doença (Calvo *et al.*, 2020). O buta-1,3-dieno (**30**), benzotiazol (**10**), undecan-2-ona (**28**), e *N,N*-dimetildodecilamina (**29**), identificados em *Bacillus* spp., foram os principais contribuintes da atividade antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum* (Massawe *et al.*, 2018).

Com relação aos compostos voláteis com potencial antifúngico contra isolados do gênero *Fusarium*, destacam-se os compostos nonan-2-ona (**11**) e heptan-2-ona (**38**), que

demonstraram forte atividade antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, um fitopatógeno responsável por causar doenças em melões (Wu *et al.*, 2019). Por outro lado, o decanal, benzotiazol (10), undecan-2-ona (28), undecan-3-ona (40), undecan-2-ol (7), undecanal (41) e 2,4-dimetil-6-*terc*-butilfenol (42), liberados por *B. velezensis* CT32, mostraram inibição de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, agente causal da murcha vascular em morangueiro (Li *et al.*, 2020a).

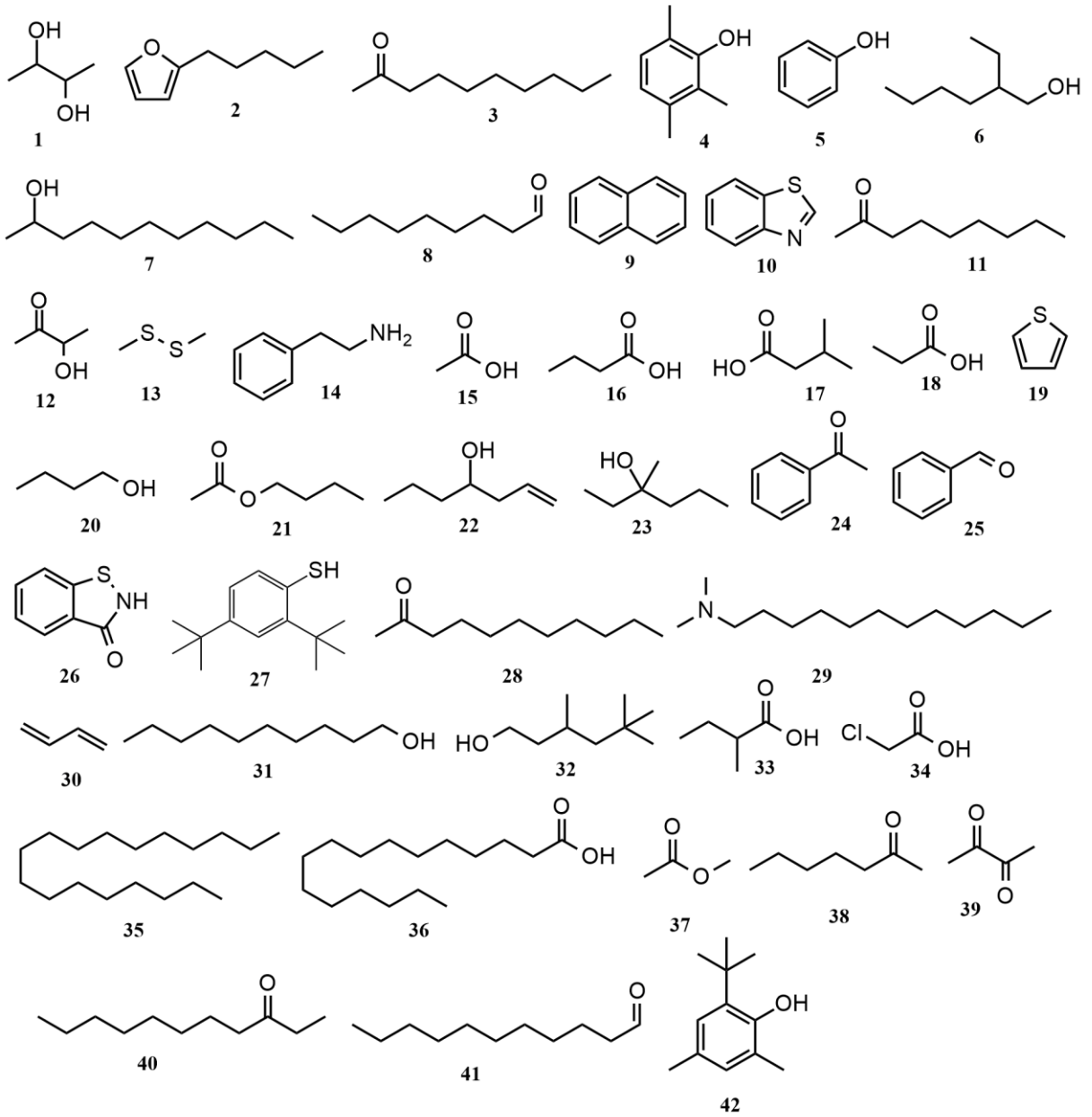
O Foc, principal espécie de fitopatógeno da bananeira, demonstrou-se susceptível a ação do benzotiazol (10), nonan-2-ona (11), decan-2-ona (3), 2,3,6-trimetilfenol (4), fenol (5), 2-etilhexanol (30), undecan-2-ol (7), nonanal (8) e naftaleno (9) detectados em *B. amyloliquefaciens* NJN-6 (Yuan *et al.*, 2012). Estudos utilizando ácidos orgânicos de cadeia curta, oriundos da fermentação de vísceras de peixes, revelaram que essas moléculas de baixa massa molecular são promissoras no combate a infecção pelo Foc. Testes realizados em solos mostraram que o ácido acético (15), ácido butírico (16), ácido 3-metilbutanoico (17) e ácido propanoico (18) suprimiram significativamente o desenvolvimento do Foc (Huang *et al.*, 2015).

Para as espécies de *Colletotrichum* a emissão dos COVS nonan-2-ona (11), decan-2-ona (3) e 2-benziletanamina (14) emitidos por *B. pumilus* e *B. thuringiensis* foram responsáveis por total inibição do crescimento micelial de *C. gloeosporioides*, uma das espécies agente causal da antracnose em mangas (Zheng *et al.*, 2013). O efeito dos compostos 2,4-di-*terc*-butiltiofenol (27) e benzotiazol (10) também ocasionaram incrementos na taxa de frutos sadios quando submetidos a infecção por *C. gloeosporioides* (Gao *et al.*, 2018). Em outro estudo realizado com *B. atrophaeus* HAB-5 mostrou-se que o ácido cloroacético (34), octadecano (35), ácido hexadecanóico (36), acetato de metila (37), foram os principais compostos responsáveis pela atividade antifúngica contra este fitopatógeno (Rajaofera *et al.*, 2019). Por outro lado, o ácido 3-metilbutanoico (17) e ácido 2-metilbutanoico (33) emitidos por *B. amyloliquefaciens* ALB629 inibiram o crescimento de *C. lindemuthianum* (Martins *et al.*, 2019).

Não foi encontrado na literatura, estudos sobre a ação dos COVs de *Bacillus* spp. contra espécies do gênero *Lasiodiplodia*.

Com base nos dados da Tabela 2, observa-se que alguns COVs são relatados com mais frequência em diferentes estudos. O benzotiazol (10) foi relatado em cinco estudos diferentes, sendo emitido por diferentes cepas de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens*). As funções orgânicas mais comuns são de compostos oxigenados como; álcoois, cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos.

**Figura 8** - Estruturas químicas de Compostos orgânicos voláteis (COVs) produzidos por espécies de *Bacillus* com potencial antifúngico.



Fonte: Próprio autor

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Relação de Monografias dos Ingredientes Ativos de Agrotóxicos, Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/search?SearchableText=Bacillus>. Acesso: 02/04/2022.

AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Brasília, 2022. Disponível: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 04/04/2022.

ALVINDIA, D. G. Revisiting hot water treatments in controlling crown rot of banana cv. Buñgulan. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 33, p. 59-64, 2012.

ANN, M. N., CHO, Y. E., RYU, H. J., KIM, H. T., PARK, K. Growth promotion of tobacco plant by 3-hydroxy-2-butanone from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. **The Korean Journal of Pesticide Science**, [S.l.], v. 17, p. 388-393, 2013.

BALENDRES, M. A., MENDOZA, J. V., DELA CUEVA, F. Characteristics of *Colletotrichum musae* PHBN0002 and the susceptibility of popular banana cultivars to postharvest anthracnose. **Indian Phytopathology**, Nova Delhi, v. 73, p. 57-64, 2020.

BUBICI, G., KAUSHAL, M., PRIGIGALLO, M. I., GÓMEZ-LAMA CABANÁS, C., MERCADO-BLANCO, J. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 1-33, 2019.

CALVO, H., MENDIARA, I., ARIAS, E., GRACIA, A. P., BLANCO, D., & VENTURINI, M. E. Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 166, p. 1-10, 2020.

CHEN, K., TIAN, Z., HE, H., LONG, C. A., JIANG, F. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. **Biological Control**, New York, v. 151, p.1-9, 2020.

CHUKEATIROTE, E., PHUEAOUAN, T., PIWKAM, A. Screening of rhizosphere soil bacteria for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*. **Agriculture and Natural Resources**, Amsterdam, v. 52, p. 325-329, 2018.

DAMASCENO, C. L., DUARTE, E. A. A., DOS SANTOS, L. B. P. R., DE OLIVEIRA, T. A. S., DE JESUS, F. N., DE OLIVEIRA, L. M., SOARES, A. C. F. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. **Biological Control**, New York, v. 137, p. 1-10, 2019.

DENG, F., CHEN, Y., SUN, T., WU, Y., SU, Y., LIU, C., WEN, J. Antimicrobial resistance, virulence characteristics and genotypes of *Bacillus* spp. from probiotic products of diverse origins. **Food Research International**, Ottawa, v. 139, p. 1-9, 2021.

DIAS, B. H. S., JUNG, S. H., CASTRO OLIVEIRA, J. V. D., RYU, C. M. C4 Bacterial volatiles improve plant health. **Pathogens**, Basileia, v. 10, p. 1-21, 2021.

DONG, H., FAN, H., LEI, Z., WU, C., ZHOU, D., LI, H. Histological and gene expression analyses in banana reveals the pathogenic differences between races 1 and 4 of banana *Fusarium* wilt pathogen. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 109, p. 1029-1042, 2019.

ELSHAGHABEE, F. M., ROKANA, N., GULHANE, R. D., SHARMA, C., PANWAR, H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 1-15, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Banana Market Review February 2020 Snapshot; **FAO**: Rome, 2020.

GAO, H., LI, P., XU, X., ZENG, Q., GUAN, W. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1-15, 2018.

GOTOR-VILA, A., TEIXIDÓ, N., DI FRANCESCO, A., USALL, J., UGOLINI, L., TORRES, R., MARI, M. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. **Food Microbiology**, Londres, v. 64, p. 219-225, 2017.

GUEVARA-SUAREZ, M., CÁRDENAS, M., JIMÉNEZ, P., AFANADOR-KAFURI, L., RESTREPO, S. *Colletotrichum* species complexes associated with crops in Northern South America: A review. **Agronomy**, Basileia, v. 12, p. 1-20, 2022.

GUIMARÃES, J. E., DE LA FUENTE, B., PÉREZ-GAGO, M. B., ANDRADAS, C., CARBÓ, R., MATTIUZ, B. H., PALOU, L. Antifungal activity of GRAS salts against *Lasiodiplodia theobromae* in vitro and as ingredients of hydroxypropyl methylcellulose-lipid composite edible coatings to control *Diplodia* stem-end rot and maintain postharvest quality of citrus fruit. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 301, p. 9-18, 2019.

GUTIÉRREZ-LUNA, F. M., LÓPEZ-BUCIO, J., ALTAMIRANO-HERNÁNDEZ, J., VALENCIA-CANTERO, E., DE LA CRUZ, H. R., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. **Symbiosis**, New York, v. 51, p. 75-83, 2010.

HAN, L., WANG, Z., LI, N., WANG, Y., FENG, J., ZHANG, X. *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 suppresses *Fusarium* wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 136, p. 55-66, 2019.

HUANG, X., WEN, T., ZHANG, J., MENG, L., ZHU, T., CAI, Z. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **BioControl**, Cham, v. 60, p. 113-124, 2015.

JAMES, G., DAS, B. C., JOSE, S., VJ, R. K. *Bacillus* as an aquaculture friendly microbe. **Aquaculture International**, London, v. 29, p. 323-353, 2021.

JEŻEWSKA-FRĄCKOWIAK, J., SEROCZYŃSKA, K., BANASZCZYK, J., JEDRZEJCZAK, G., ŻYLICZ-STACHULA, A., SKOWRON, P. M. The promises and risks of probiotic *Bacillus* species. **Acta Biochimica Polonica**, Varsóvia, v. 65, p. 509-519, 2018.

- KAMEL, M. A. M., CORTESI, P., SARACCHI, M. Etiological agents of crown rot of organic bananas in Dominican Republic. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 120, p. 112-120, 2016.
- KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and pharmacology**. 1. ed. Oxford: Pergamon, 1985.
- KLOEPPER, J. W., RYU, C. M., ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, p. 1259-1266, 2004.
- KULKARNI, S. A., SELLAMUTHU, P. S., NAGARAJAN, S. K., MADHAVAN, T., SADIKU, E. R. Antifungal activity of wild bergamot (*Monarda fistulosa*) essential oil against postharvest fungal pathogens of banana fruits. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 144, p. 166-174, 2022.
- LI, X., WANG, X., SHI, X., WANG, B., LI, M., WANG, Q., ZHANG, S. Antifungal effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. **Processes**, Basileia, v. 8, p. 1-14, 2020a.
- LI, Z., WANG, T., HE, C., CHENG, K., ZENG, R., SONG, Y. Control of Panama disease of banana by intercropping with chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): Cultivar differences. **BMC Plant Biology**, Cham, v. 20, p. 1-13, 2020b.
- LUCEY, P. M., LEAN, I. J., ALY, S. S., GOLDBERGER, H. M., BLOCK, E., THOMPSON, J. S., ROSSOW, H. A. Effects of mannan-oligosaccharide and *Bacillus subtilis* supplementation to preweaning Holstein dairy heifers on body weight gain, diarrhea, and shedding of fecal pathogens. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 104, p. 4290-4302, 2021.
- MARCANO, I. E., DIAZ-ALCANTARA, C. A., URBANO, B., & GONZALEZ-ANDRES, F. Assessment of bacterial populations associated with banana tree roots and development of successful plant probiotics for banana crop. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 99, p. 1-20, 2016.
- MARTINS, S. J., FARIA, A. F., PEDROSO, M. P., CUNHA, M. G., ROCHA, M. R., MEDEIROS, F. H. V. Microbial volatiles organic compounds control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, Amsterdam, v. 131, p. 36-42, 2019.
- MARYANI, N., LOMBARD, L., POERBA, Y. S., SUBANDIYAH, S., CROUS, P. W., KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 91, p. 79-99, 2018.
- MASSAWE, V. C., HANIF, A., FARZAND, A., MBURU, D. K., OCHOLA, S. O., WU, L., GAO, X. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 108, p. 1373-1385, 2018.
- MELDAU, D. G., MELDAU, S., HOANG, L. H., UNDERBERG, S., WÜNSCHE, H., BALDWIN, I. T. Dimethyl disulfide produced by the naturally associated bacterium *Bacillus*

- sp. B55 promotes *Nicotiana attenuata* growth by enhancing sulfur nutrition. **The Plant Cell**, Oxford, v. 25, p. 2731-2747, 2013.
- MON, Y. Y., BIDABADI, S. S., OO, K. S., ZHENG, S. J. The antagonistic mechanism of rhizosphere microbes and endophytes on the interaction between banana and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amsterdam, v. 116, p. 1-9, 2021.
- MONGKOLTHANARUK, W. Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 22, p. 1597-1604, 2012.
- MU, J., LI, X., JIAO, J., JI, G., WU, J., HU, F., LI, H. Biocontrol potential of vermicompost through antifungal volatiles produced by indigenous bacteria. **Biological Control**, Amsterdam, v. 112, p. 49-54, 2017.
- PÉREZ-VICENTE, L. *Fusarium* wilt (Panama disease) of bananas: An updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. **Fitosanidad**, Oaxaca, v. 8, p. 27-38, 2004.
- PIEWNGAM, P., ZHENG, Y., NGUYEN, T. H., DICKEY, S. W., JOO, H. S., VILLARUZ, A. E., OTTO, M. Pathogen elimination by probiotic *Bacillus* via signalling interference. **Nature**, New York, v. 562, p. 532-537, 2018.
- PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, p. 1512-1521, 2015.
- RAJAOFERA, M. J. N., WANG, Y., DAHAR, G. Y., JIN, P., FAN, L., XU, L., MIAO, W. Volatile organic compounds of *Bacillus atrophaeus* HAB-5 inhibit the growth of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 156, p. 170-176, 2019.
- RAJER, F. U., WU, H., XIE, Y., XIE, S., RAZA, W., TAHIR, H. A. S., GAO, X. Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. **Microbiology**, Cham, v. 163, p. 523-530, 2017.
- RYU, C. M., FARAG M. A., HU C.H., REDDY M. S., KLOEPPER J. W., PARE P. W. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Oxford, v. 134, p. 1017–1026, 2004.
- SHEN, Z., XUE, C., PENTON, C. R., THOMASHOW, L. S., ZHANG, N., WANG, B., SHEN, Q. Suppression of banana Panama disease induced by soil microbiome reconstruction through an integrated agricultural strategy. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 128, p. 164-174, 2019.
- STOVER, R. H., WAITE, B. H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas: V. Pathogenicity and distribution of *F. oxysporum* f. *ubense* races 1 and 2. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 38, p. 51-61, 1960.



- TALHINHAS, P., BARONCELLI, R. *Colletotrichum* species and complexes: Geographic distribution, host range and conservation status. **Fungal Diversity**, Cham, v. 110, p. 109-198, 2021.
- TAHIR, H. A. S., GU, Q., WU, H., NIU, Y., HUO, R., GAO, X. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, New York, v. 7, p. 1-15, 2017.
- VIEIRA, W. A., LIMA, W. G., NASCIMENTO, E. S., MICHEREFF, S. J., CÂMARA, M. P., DOYLE, V. P. The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. **Mycologia**, Madison, v. 109, p. 912-934, 2017.
- XIE, S., ZANG, H., WU, H., UDDIN RAJER, F., GAO, X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v. 19, p. 49-58, 2018.
- XUE, C., RYAN PENTON, C., SHEN, Z., ZHANG, R., HUANG, Q., LI, R., SHEN, Q. Manipulating the banana rhizosphere microbiome for biological control of Panama disease. **Scientific Reports**, New York, v. 5, p. 1-11, 2015.
- WANG, B., SUN, M., YANG, J., SHEN, Z., OU, Y., FU, L., SHEN, Q. Inducing banana *Fusarium* wilt disease suppression through soil microbiome reshaping by pineapple-banana rotation combined with biofertilizer application. **Soil**, Munique, v. 8, p. 17-29, 2022.
- WU, Y., ZHOU, J., LI, C., MA, Y. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microbiology Open**, Malden, v. 8, p. 1-14, 2019.
- YADAV, K., DAMODARAN, T., DUTT, K., SINGH, A., MUTHUKUMAR, M., RAJAN, S., & SHARMA, P. C. Effective biocontrol of banana *fusarium* wilt tropical race 4 by a *Bacillus* rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. **Rhizosphere**, Amsterdam, v. 18, p. 1-9, 2021.
- YANG, Y., DONG, G., WANG, M., XIAN, X., WANG, J., LIANG, X. Multifungicide resistance profiles and biocontrol in *Lasiodiplodia theobromae* from mango fields. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 145, p. 1-8, 2021.
- YUAN, J., RAZA, W., SHEN, Q., HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 78, p. 5942-5944, 2012.
- ZAKARIA, L. Diversity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in tropical fruit crops-A review. **Agriculture**, Basileia, v. 11, p. 1-23, 2021.
- ZHANG, X., HUANG, H., WU, B., XIE, J., VILJOEN, A., WANG, W., LI, C. The M35 metalloprotease effector Foc M35-1 is required for full virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4. **Pathogens**, Basileia, v. 10, p. 1-15, 2021.

ZHENG, M., SHI, J., SHI, J., WANG, Q., LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, Amsterdam, v. 65, p. 200-206, 2013.

ZOU, C., LI, Z., YU, D. *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran. **The Journal of Microbiology**, Cham, v. 48, p. 460-466, 2010.

### 3 ANTAGONISM OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS OF THE *Bacillus* sp. AGAINST *Fusarium kalimantanense*

João E. A. dos Santos<sup>1</sup>, Maria V. de Brito<sup>1</sup>, Antonia T. A. Pimenta<sup>1</sup>, Gisele S. da Silva<sup>2</sup>, Guilherme J. Zocolo<sup>2</sup>, Celli R. Muniz<sup>2</sup>, Suelen C. de Medeiros<sup>3</sup>, Thalles B. Grangeiro<sup>3</sup>, Mary Anne S. Lima<sup>1</sup>, Christiana F. B. da Silva<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bl. 940, Fortaleza-CE, 60.440-593, Brazil.

<sup>2</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Sara Mesquita 2270, Pici, Fortaleza-CE, 60511-110, Brazil.

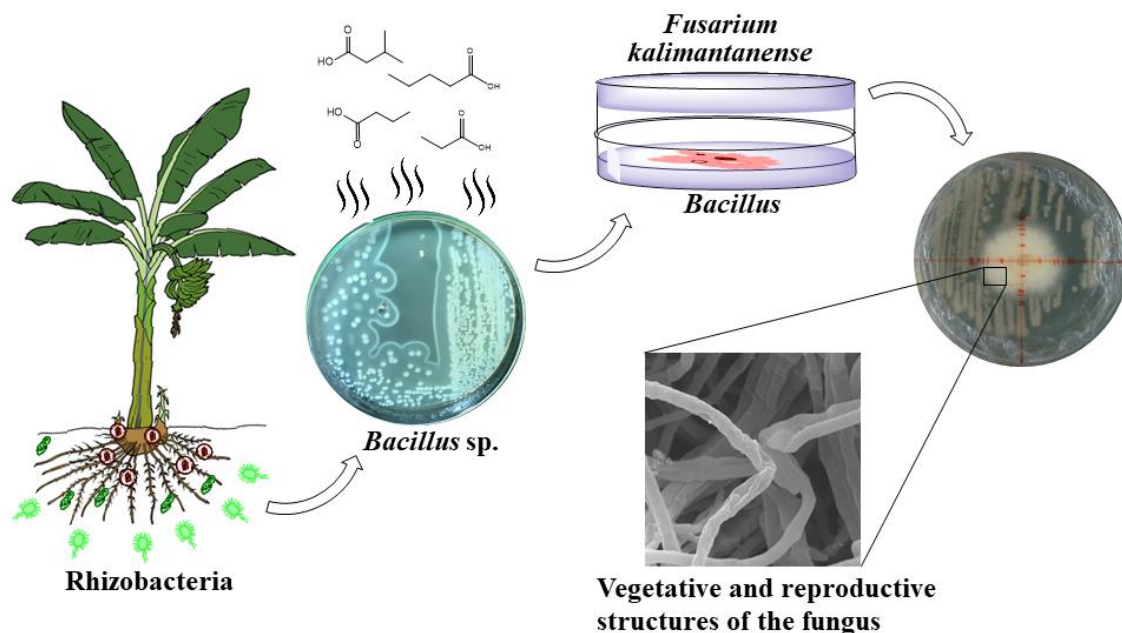
<sup>3</sup>Departamento de Biologia, Science Center, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Bl 906, Fortaleza, Ceará, 60.440-900, Brazil.

#### ABSTRACT

*Fusarium kalimantanense* is a genetic lineage of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) and belongs to the *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC). This pathogen is a causative agent of Panama disease, an infection that has caused damage to the banana crop worldwide. *Bacillus* sp. (LPPC170) showed preliminary antagonist activity against *F. kalimantanense* (LPPC130) *in vitro* tests from the cultivation of axenic culture and co-culture with inhibition of mycelial growth of phytopathogen of 41.23 %. According to these findings, volatile organic compounds (VOCs) emitted from *Bacillus* sp. were obtained by solid-phase microextraction (SPME) and identified by gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS). The multivariate data analysis tool (PLS-DA and Heatmap) identified short-chain organic acids as the main antagonistic VOCs responsible for inhibiting the mycelial growth of LPPC130. Acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, pentanoic acid, and 3-methyl-butanoic acid exhibited a strong inhibitory effect on the mycelial growth of LPPC130, with inhibition of 20.68 %, 33.30 %, 26.87 %, 43.71 %, and 53.10 %, respectively. Scanning electron microscopy revealed that VOCs caused damage to the vegetative and reproductive structures of the fungus. These results suggest *Bacillus* LPPC170 as an excellent biocontrol tool against the phytopathogen causative agents of Panama disease.

**Keywords:** Biocontrol, *Musa* spp., Panama disease, Volatile compounds.

## Graphic abstract



## 3.1 Introduction

Banana (*Musa* spp.) is an important fruit in various regions worldwide. Estimates indicate that the average global exportation of bananas in 2020 was 22.2 million tons, a growth of 1.7 percent compared to 2019, valued at approximately 13,7 billion USD (FAO 2021). One of the main factors affecting the banana crop is Panama disease caused by the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Sm.) W.C. Snyder e H.N. Hansen (Foc) (Li *et al.* 2020a). In recent studies, Maryani *et al.* (2019) and Santos *et al.* (2022) argues that another genetic lineage from the *Fusarium oxysporum* complex, *Fusarium kalimantanense*, has been causing Panama disease in Asia and Latin America, respectively.

The banana *Fusarium* complex pathogens are soil-borne and produce chlamydospores that can survive for many years in this environment. Using fungicides is a strategy to treat this phytopathogen of plantlets from rhizomes (Ploetz, 2015; Maryani *et al.*, 2019). However, it is a problematic control measure because its use considerably affects the soil microbiota, causing imbalance and impoverishment of the planting area (Shen *et al.*, 2013). So far, there is no practical way to treat the Panama disease directly in the field (Shen *et al.* 2015; Shen *et al.* 2018; Li *et al.* 2020b), and the search for alternative control methods has become imperative.

Volatile organic compounds (VOCs) are produced by microorganisms, animals, and plants for chemical communication, either as a defense mechanism or as signaling between species. Many of these molecules are extremely important for biotechnological applications, such as antibiotics, plant growth promotion activities, and antimicrobials. The emission of VOCs of various microbial strains possesses a symbiotic function with the plants and antagonizes a series of phytopathogens (Morath, Hung, and Bennett 2012).

Several reports in the literature suggest VOCs of species from the *Bacillus* genus as strong candidates for biocontrol of soil and post-harvest pathogens (Chaves-López *et al.* 2015; Shafi, Tian and Ji 2017; Rath, Mitchell and Gold 2018; Zhao *et al.* 2019). A study carried out with *Bacillus* species: *B. cereus*, *B. pumilus* and *B. amyloliquefaciens*, showed the potential of VOCs against *Foc* and *Moniliophthora perniciosa*. Propanone, 1-butanol, 3-methyl-butanol, acetic acid, 2-methyl-propanoic acid, carbon disulfide, 3-methyl-butanoic acid, and ethyl acetate were the VOCs responsible for the inhibition of mycelial growth of the two phytopathogenic strains (Chaves-López *et al.* 2015). Meanwhile, the acetoin and butane-2,3-diol VOCs identified from *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. mojavensis* act as plant growth promoters (Rath, Mitchell, and Gold 2018). In antagonism tests, VOCs of the *B. amyloliquefaciens* NJN-6 strain successfully controlled the growth of the *Foc*. The VOCs 2,3,6-trimethylphenol and all benzothiazole phenol emitted by the NJN-6 strain completely inhibited the growth of *Foc* (Yuan *et al.*, 2012a).

In this study, VOCs produced from the antagonism tests of *Bacillus* sp. (LPPC170) against the *Fusarium kalimantanense* (LPPC130) in axenic culture, and co-culture were identified by solid-phase microextraction inserted headspace (SPME-HS) associated with gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Multivariate data analysis tools (PLS-DA) suggested VOCs responsible for inhibiting the mycelial growth of the pathogen.

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Microorganisms and culture conditions

The strain of *Bacillus* sp. LPPC170 was previously selected from preliminary tests that measured the antimicrobial potential of its volatile compounds against the phytopathogen *F. kalimantanense*. Ten strains from the rhizosphere of banana trees cultivated in northeastern Brazil and belonging to the working collection of the soil microbiology laboratory of Embrapa Tropical Agroindustry, Fortaleza, Brazil, were evaluated (Annex 1, Table 1).

*Bacillus* sp. (LPPC170) was preserved in nutrient broth medium (meat extract 1.0 g/L; yeast extract 2.0 g/L; peptone 5.0 g/L and sodium chloride 5.0 g/L), containing 30 % glycerol supplement, at a temperature of -70 °C. *F. kalimantanense* (LPPC130) was obtained from plantlets of infected banana trees with Panama disease from Embrapa Roraima, Roraima, Brazil (Santos *et al.* 2022), and preserved in sterilized soil at -70 °C. The samples of the microorganisms (*Bacillus* sp. and *Fusarium kalimantanense*) were identified at the molecular level and deposited in the Postharvest Pathology Laboratory, Embrapa Agroindústria Tropical-CE, Fortaleza, Ceará, Brazil.

### 3.2.2 Molecular identification of microorganisms

Molecular identification of the LPPC170 strain was performed by Sanger sequencing of the 16S gene using the primers sense (5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3') and antisense (5'-AGGAGGTGATCCAACCG CA-3') (Mohkam *et al.*, 2016) and recA senso (5'-GATCGTCAAGCAGCCTTAGAT-3') e antisenso (5'-TTACCGACCA TAACGCCGAC-3'). The bacterial genomic DNA was obtained by the conventional cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol (Warner 1996). Polymerase chain reactions (PCR) were performed for amplification of the 16S gene, using a final volume of 10 µL, which contained 200 ng of genomic DNA, 12.5 pmol of each primer, and 5 µL of master mix, containing dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, and Taq DNA polymerase according to the manufacturer (PROMEGA). PCR reactions were conducted in a Veriti 96 well Thermocycler (Applied Biosystems) programmed for an initial denaturation step (2 min at 95 °C), followed by 30 cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C. The final single extension was 5 min at 72 °C. The presence of PCR products of the expected size was confirmed by 1.0 % agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide. DNA was purified from the rest of the PCR reaction using the Wizard® SV

Gel and PCR Clean-UP System purification kit (PROMEGA). DNA sequences were assembled into contigs using the Phred/Phrap/Consed program package (Ewing *et al.*, 1998; Gordon, 2003). Searches for similar DNA sequences available in public sequence databases were performed using NCBI BLAST (Johnson *et al.*, 2008) through its public interface on the NCBI website ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). The sequence was deposited and is available in the NCBI database (accession number: 16S: MN565278; and recA: OP962010).

The identification at the molecular level of *F. kalimantanense* was made by Santos *et al.* 2023, with deposit numbers in GenBank accession: Seq1 OL802918 and Seq2 OL802919.

### **3.2.3 Antagonistic assay of *Bacillus* sp. VOCs against *Fusarium kalimantanense***

The antagonist effect of VOCs from *Bacillus* sp. (LPPC170) against the phytopathogen LPPC130 was analyzed by the double plate method in co-cultivation experiments (Rai, Singh, and Singh 1980) (ANNEX A, FIGURE 1). LPPC170 strain was transferred to a Petri plate containing 523 culture medium (sucrose 10.0 g/L, hydrolyzed casein 4.0 g/L, yeast extract 8.0 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, and bacteriological agar 15.0 g/L) (Kado and Heskett 1970) by striation technique. A 5 mm diameter disk of mycelium of the phytopathogen with seven days of growth was transferred to the central region of another Petri plate containing 523 medium. The two Petri dishes of the same diameter, one containing the antagonist LPPC170 and the other containing the phytopathogen LPPC130, were fitted, and the microorganisms did not have direct contact. The system was sealed with parafilm and kept at a temperature of  $28 \pm 2$  °C and in alternating photoperiods 12-hour for ten days. The antagonist effect values of VOCs constituents were obtained by measuring the diameter of the mycelial growth of the pathogen, comparing the fungus growth in the absence (control treatment) and the presence of the antagonist (treatment with antagonist), through measurements of the inhibition halos every 48 hours of the experiment in quadruplicate.

### **3.2.4 Collection of VOCs by HS- SPME**

For the chromatographic analysis of the volatile compounds, the microorganisms were cultured in vials. The co-cultivation experiment poured the culture medium onto the vial's walls. The bacterial strain was striated on one side of the flask, and a 5 mm disk of the fungal strain was inoculated on the opposite side of the same vial. 100 µL ( $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) solution of the axenic culture of the bacterial strain LPPC170 was transferred to a 40 mL vial containing

10 mL of 523 medium. Subsequently, a 5 mm diameter disk of the axenic culture of the fungus strain (LPPC130) was transferred to another vial containing the same culture medium as the bacterial strain. The vials were sealed (ANNEX A, FIGURE 2).

The VOCs collection methodology was performed according to Yuan *et al.* (2012a) and Tahir *et al.* (2017) to analyze *B. amyloliquefaciens* VOCs by optimizing fiber type, exposure time, and temperature. Divinylbenzene/carboxene/polydimethylsiloxane (DCP, 50/30  $\mu\text{m}$ ) 2 cm fiber was exposed to volatiles for 30 min at a temperature of 50 °C to collect the VOCs.

### ***3.2.5 Analysis of VOCs by GC-MS***

VOCs analysis in axenic culture and co-cultivation experiments were performed in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (Shimadzu, model QP 2010). In this experiment, Helium gas was used as a carrier gas with a flow of 1 mL/min and a DB-5 column measuring 30 m by 0.25 mm with a film thickness of 0.25  $\mu\text{M}$  (Agilent J&W). The fiber exposure time in the injector was 5 min at 220 °C. The temperature ramp was constructed as follows: Analysis in splitless mode; Starting temperature of the column was 35 °C for 3 min, increasing at a rate of 10 °C/min, up to 180 °C, and then the rate of 4 °C/min up to 240 °C, holding for 5 min; The total analysis time was 25.70 min. The mass spectrum was operated in electronic ionization mode at 70 eV with a temperature of 220 °C, and the scan was programmed for a mass range of 35 - 500 Da.

The identification of VOCs was performed using the NIST/EPA/NIH (NIST 11 MS) mass spectra library database, considering the column phase, the mass spectra similarity index greater than 75 %, the retention time of each absorption through the Kovats index of standards of a series of C7-C30 n-alkanes. Chromatographic peak area values were taken into account to measure the relative amount of each absorption.

### ***3.2.6 Analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM) of LPPC130 and antagonist/pathogen interaction***

The vegetative and reproductive structures of the LPPC130 fungal strain were exposed to two treatments: a) Control treatment: The fungal strain was grown in a Petri dish without the presence of the antagonist; b) Treatment with VOCs: The fungal strain was subjected to treatment with VOCs from the bacterial strain for five days. Rectangular fragments



approximately 5 mm long by 3 mm wide and 1 mm deep from the fungal strain culture, axenic culture, and co-culture, cultivated in 523 medium were collected for SEM analysis. The samples were placed in Eppendorf, added 1.5 mL of Karnovsky solution (50 ml of 8% paraformaldehyde, 10 ml of 25% glutaraldehyde, 940 ml of 0.2 M phosphate buffer, pH 7.3) for fixation, and stored at 4 °C for seven days. After removing the Karnovsky solution, fungus fragments were washed three times with 0.1 M phosphate buffer, 10 minutes between washes. After removing the phosphate buffer, the samples were fixed with 1% osmium tetroxide for 1 hour and then extracted with distilled water three times for 10 minutes. The dehydration process was carried out by applying successive washes of 30% to 90% ethanol, with an interval of 15 minutes and three times with 100 % ethanol for 15 minutes. After removing ethanol, the rectangular mycelium fragments were submitted to a lyophilization process using liquid carbon dioxide and a critical point drying apparatus SEM 850. Afterward, the samples were fixed on metallic support on the surface of a double-sided carbon tape. A conductive layer of gold approximately 30 nm thick was applied using Emitech's K650 metallizer for the metallization process. The images were observed by SEM apparatus (DMS 940, Zeiss) using an acceleration voltage of 15 kV.

### ***3.2.7 Assay of chemical standards of VOCs against LPPC130***

Commercial standards were selected from the discrimination of chromatographic data (GC-MS) by multivariate analyzes such as PLS-DA and Heatmap. Petri plates with a divider were used in the assays of commercial standards of VOCs against the fungal strain (LPPC130) in triplicate. Commercial VOC standards were obtained from the Sigma/Merck® brand. The two sides of the plate were poured with 523 medium, where on one side, a 5 mm disc containing the fungal strain was inoculated, and on the other side of the plate, a 2.5 cm disc of sterile filter paper, in which 150 µl of pure commercial substance was added (ANNEX A, FIGURE 3) (Fernando *et al.*, 2005; Tahir *et al.*, 2017;). 150 µL of distilled and sterilized water (DSW) were added for the control treatment. The solid organic compound was dissolved in water at 1 mg/ml. The antifungal effect was determined by measuring the diameter of the pathogen mycelial growth and comparing the control treatments with treatments in chemical standards.

### **3.2.8 Statistical treatment**

For PLS-DA and Heatmap analysis, the online statistical program MetaboAnalyst, version 4.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>) was used. A set of procedures was used to obtain a better result to normalize the data. First, the data were organized by the mean of each sample, then the generalized logarithmic transformations were performed, and finally, the data scaling using the Pareto Scale. The normalized data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) using Fisher's least significant difference method (Fisher's LSD), obtaining a p-value <0.05. GraphPad PRISM software did the pathogen's measurements of mycelial growth and created bar graphs (GraphPad Software, Inc.).

## **3.3 Results**

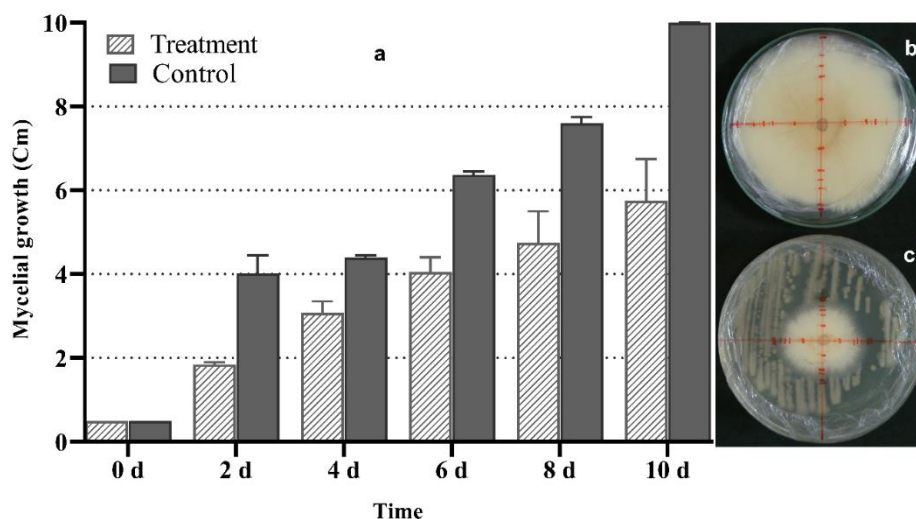
### **3.3.1 Identification of microorganisms**

Molecular identification found that strain LPPC170 was grouped in the *Bacillus cereus* group, and its 16S sequences were deposited in the Genbank database (accession number: MN565278). The best results obtained from BLASTn searches against the NCBI DNA Sequence Database for partial 16S rRNA gene sequences from LPPC170 showed the following results for the first three results in the list: (i) *Bacillus* sp. (in: Bacteria) strain NSAMYKJ16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT107057.1), (ii) *Bacillus tropicus* strain AOA-CPS1 chromosome (CP049019.1) and (iii) *Bacillus* sp. (in: Bacteria) strain HMA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT071452.1). For all three results, the query coverage was 100% and the identity 98.25%.

### **3.3.2 Antagonistic effect of *Bacillus* sp. in the mycelial growth of LPPC130**

The VOCs emitted by bacterial strain (LPPC170) showed significant inhibition, against the phytopathogen (LPPC130), with a p-value <0.0001, performed by the Tukey test. The diameter of the growth surface occupied by the mycelium from the treatment with the antagonist (5.86 cm) compared to the surface occupied by the control treatment (9.98 cm) showed a mean reduction of 41.23% in the ten-day interval of exposure to the VOCs of the bacterial strain (LPPC170) (FIGURE 9).

**Figura 9 - (a)** Histogram of mycelial growth inhibition of the fungal strain (LPPC130) (cm). **(b)** Mycelial growth of the control treatment (growth of the fungal strain only), **(c)** Mycelial growth of the fungal strain (LPPC130) against the bacterial strain (LPPC170) (treatment with antagonist). The bar graph indicates the standard deviation error of the four replicates (each replicate = one Petri dish with each treatment). Tukey's test showed significant differences between control and treatment ( $p < 0.0001$ ).



Fonte: Próprio autor

### 3.3.3 Analysis of VOCs produced by *Bacillus sp.* LPPC170, *F. kalimantanense* LPPC130, and co-cultivation by HS-SPME/GC-MS.

VOCs of both microorganisms in axenic culture and co-cultivation was observed in the GC-MS analysis. Twenty-seven VOCs were identified in the antagonist bacterial strain LPPC170, among which eleven alcohols, ten carboxylic acids, one ketone, and one alkene. In the fungal pathogen LPPC130, compounds were identified as five alcohols, five esters, and one carboxylic acid. Ethyl acetate (BF2), 2-methyl-propanol (BF4), 3-methyl-butanol (BF9), (S)-2-methyl-butanol (BF10), 3-methyl-butanoic acid (BF16), hexanol (BF19) and heptanol (BF30) were identified in both strains. On the other hand, acetic acid (C3), butane-2,3-diol (C15), 2-furyl-methanol (C18), 2-heptanone (C23), anisol (C25), ethyl 3-hydroxy-butanoate (C26), 2-methyl-propanoate 3-methyl-butyl (C31), 2-nonanone (C33), ethyl octanoate (C38) were identified only in a co-cultivation experiment (TABLE 3).

**Table 3** - VOCs identified in *Bacillus* sp. (LPPC170) and *F. kalimantanense* (LPPC130) strains and co-culture using SPME extraction and GC-MS analysis (n=3) after three days of cultivation.

N	VOCs	KI*	SI* %	LPPC170 (area %)	LPPC130 (area %)	Co-cultivation area (%)
<b>B1</b>	(E)-Penta-1,3-diene		95	1.87		0.1
<b>BF2</b>	Ethyl acetate	612	95	0.54	4.14	0.45
<b>C3</b>	Acetic acid	616	97			0.39
<b>BF4</b>	Isobutanol	626	96	6.66	3.67	1.62
<b>B5</b>	Butanol	664	97	3.26		0.47
<b>B6</b>	Propanoic acid	687	82	0.47		0.03
<b>B7</b>	Ethyl thioacetate	699	93	0.55		
<b>B8</b>	3-Hydroxybutan-2-one	708	94	1.56		0.07
<b>BF9</b>	3-Methylbutanol	735	96	2.3	21.17	14.56
<b>BF10</b>	(S)-2-Methylbutanol	739	93	0.20	13.97	7.54
<b>B11</b>	Ethyl isobutyrate	760	93	4.83		0.32
<b>B12</b>	Pentanol	768	94	1.77		0.04
<b>F13</b>	Isobutyl acetate	775	90		0.3	0.07
<b>B14</b>	Butanoic acid	782	92	2.16		0.39
<b>C15</b>	Butane-2,3-diol	792	92			0.05
<b>B16</b>	3-Methylbutanoic acid	847	95	20.94	0.4	2.27
<b>B17</b>	2-Methylbutanoic acid	857	91	14.89		2.34
<b>C18</b>	2-Furylmethanol	859	88			0.22
<b>BF19</b>	Hexanol	869	97	5.51	1.05	0.42
<b>B20</b>	Pentanoic acid	875	94	1.02		0.1
<b>F21</b>	3-Methylbutanol acetate	877	95		0.82	0.19
<b>F22</b>	2-Methylbutanol acetate	879	96		0.35	0.07
<b>C23</b>	Heptan-2-one	891	89			0.05
<b>B24</b>	3-Methylbut-2-enoic acid	912	87	1.43		0.33
<b>C25</b>	Metoxybenzene	929	84			0.15
<b>C26</b>	Ethyl 3- hydroxybutanoate	937	90			0.94
<b>B27</b>	Thiopicvalic acid	951	86	0.88		0.13
<b>B28</b>	Methyl 2-hydroxy-4- Methylvalerate	957	89	1.45		0.07
<b>B29</b>	Hexanoic acid	967	96	1.70		
<b>BF30</b>	Heptanol	972	94	2.26	0.14	1.9
<b>C31</b>	3-Methylbutyl isobutyrate	1018	89			0.09
<b>B32</b>	Octanol	1074	96	3.82		0.18
<b>C33</b>	Nonan-2-one	1097	88			0.08
<b>F34</b>	3-Octyl acetate	1125	84		0.14	
<b>F35</b>	2-Methyl-4-methoxy- Benzenamine	1135	87		42.24	52.57
<b>B36</b>	Octanoic acid	1116	88	1.51		0.15

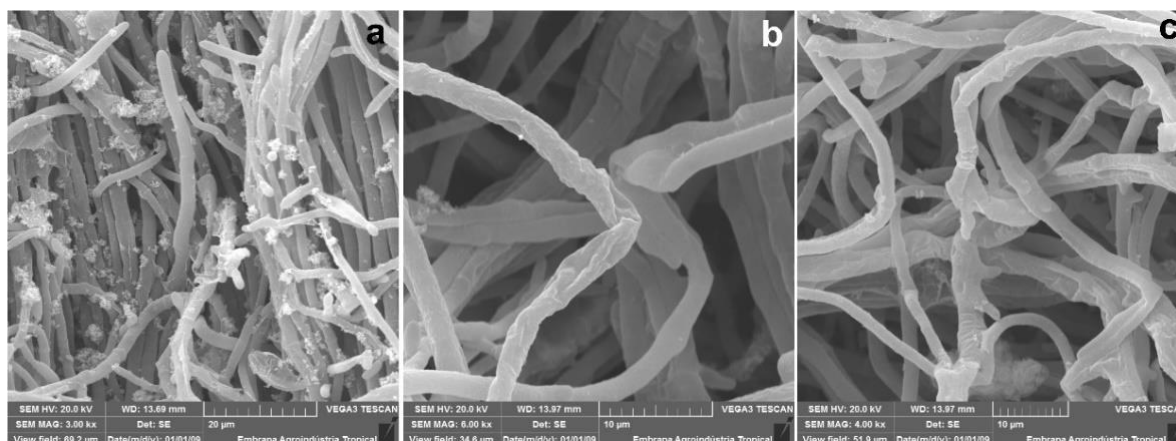
<b>B37</b>	Nonanol	1176	75	0.30	
<b>C38</b>	Ethyl octanoate	1196	75		0.18
<b>B39</b>	Decanol	1280	94	2.58	0.19
<b>B40</b>	Undecanol	1353	84	0.85	0.09
<b>B41</b>	Decanoic acid	1369	87	1.51	0.13

Fonte: Próprio autor. (\* Index Kovats. \*Similarity index).

### 3.3.4 Analysis of Scanning Electron Microscopy (SEM) of LPPC130 *F. kalimantanense* and antagonist/pathogen interaction

The images of the control treatment revealed that the fungal strain mycelium had a higher density of hydrated, well-developed, and nourished hyphae. In the treatment with VOCs LPPC170, a mycelium with lower density was observed. The hyphae were dehydrated, considerably deformed, withered, and malnourished (FIGURE 10).

**Figure 10** - Electron Scanning Microscopy of the vegetative structures of the LPPC130 strain. (a) Control treatment; (b and c) Treatments with VOCs LPPC170. The VOCs of *Bacillus* sp. LPPC170 caused deformations in the vegetative structure of the pathogen.



Fonte: Próprio autor; Celli Muniz

### 3.3.5 Multivariate analysis of HS-SPME/GC-MS data

Supervised analyzes were applied using Partial Least Squares with Discriminant Analysis (PLS-DA). In the PLS-DA analysis, PC1 concentrated 59.8% of the explained variance and PC2 27.3% of the information, totaling 87.1% of the total explained variance, thus demonstrating a clear distinction between the three biological systems studied (FIGURE 11).

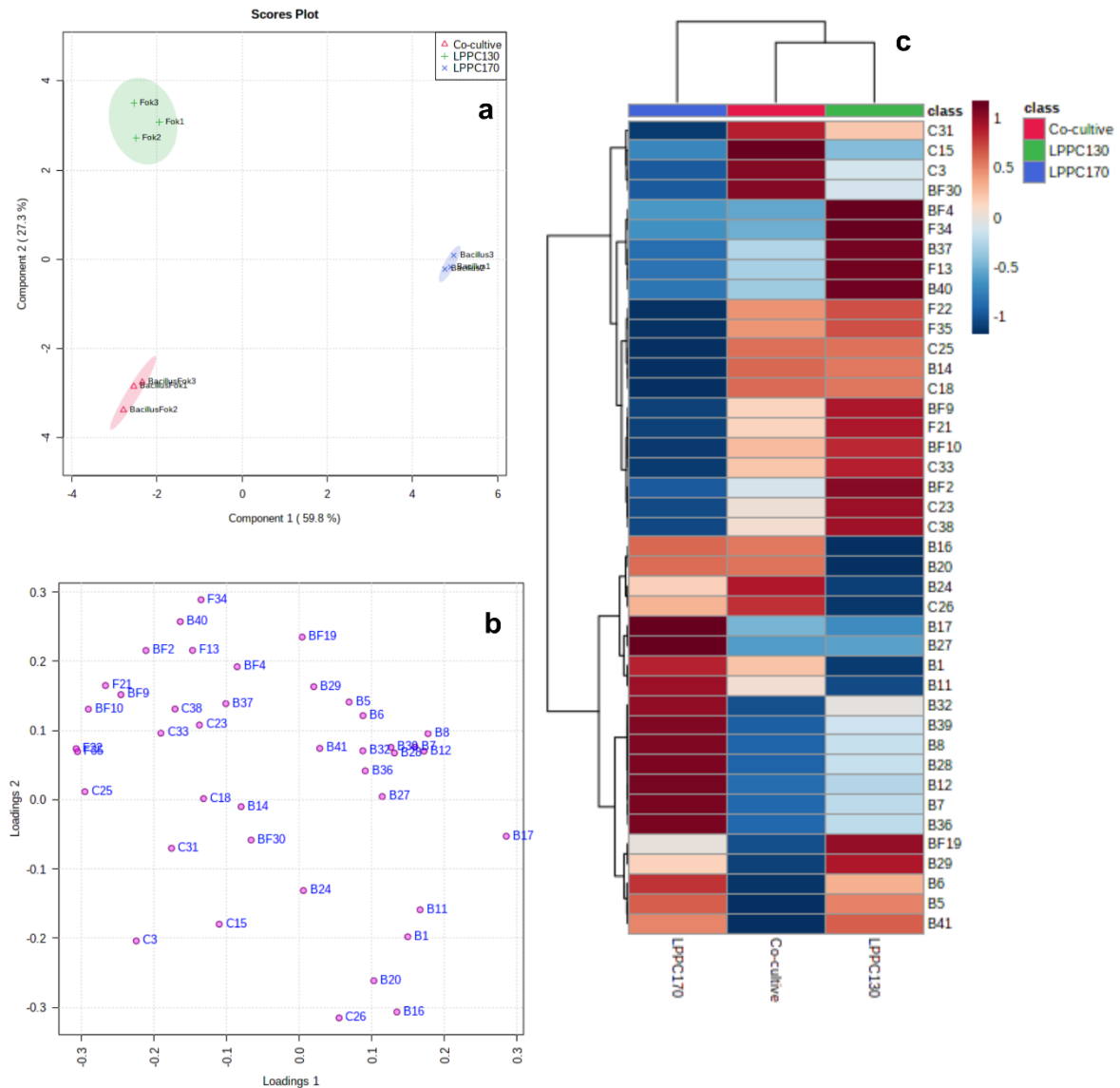
The analysis of the PLS-DA loadings graph demonstrates that 2-methyl-butanoic acid (B17) was strongly correlated with the LPPC170 bacterial strain sample. In addition, propanoic acid (B1), ethyl thioacetate (B7), 3-hydroxybutan-2-one (B8), and pentanol (B12)

were better distributed in positive regions (Quadrant I) and contributed most significantly to the bacterial strain group. The VOCs profile of the fungal strain LPPC130 group includes 3-octyl acetate (F34), isobutyl acetate (F13), ethyl acetate (BF2), 3-methyl-butanol (BF9), and 2-methyl-butanol acetate (F21) there were distributed in positive regions (Quadrant II).

In co-culture analysis, acetic acid (C3), butane-2,3-diol (C15), methoxybenzene (C25), ethyl 3-hydroxy-butanoate (C26), and 3-methyl-butyl-2-methyl-propanoate (C31) showed separation more expressive in the PLS-DA loadings plot. These compounds were observed only in the co-culture analysis, and for this reason, despite their low concentration, they contribute significantly to the construction of the model. On the other hand, the compounds: butanoic acid (B14), 3-methylbutanoic acid (B16), pentanoic acid (B20), and 3-methylbut-2-enoic acid (B24) emitted by the bacterial strain LPPC170, and the compounds 2-methyl-butanol acetate (F22) and 2-methyl-4-methoxy-benzamine (F35) emitted by the LPPC130 fungal strain were positioned close to the co-culture group. These findings showed that the emission of these compounds was not affected when the microorganisms were in the co-culture. The Heatmap graph corroborated, which shows the relative abundance of the emission of these compounds in the three configurations analyzed.

2-methyl-butanoic acid (B17), ethyl isobutyrate (B11), and pentanol (B12) were inhibited during co-cultivation, while 3-methylbutanoic acid (B16) and butanoic acid (B14) were not inhibited, according to the Heatmap graph. On the other hand, the graph shows an increase in the concentration of 3-methylbut-2-enoic acid (B24) and a stabilization in the emission of pentanoic acid (B20) compared to the axenic culture (FIGURE 11).

**Figure 11** - Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) of the emission of VOCs from the three culture configurations (bacterial strain LPPC170, fungal strain LPPC130, and co-cultivation) in biological triplicates. (a) Graph of scores: Culture axenic of bacterial strain (red); Culture axenic of the fungal strain of the pathogen LPPC130 (lilac) and Co-cultivation of the two microorganisms (green); (b) Loading graph in correlation scale: In positive regions: axenic culture of bacterial strain and fungal strain. In negative regions: co-cultivation. (c) Heatmap plot of the correlation of the three different analyses and relative abundance of VOC emission (n=3). Analysis of variance (ANOVA) using Fisher's LSD method showed a significant p-value (0.05).



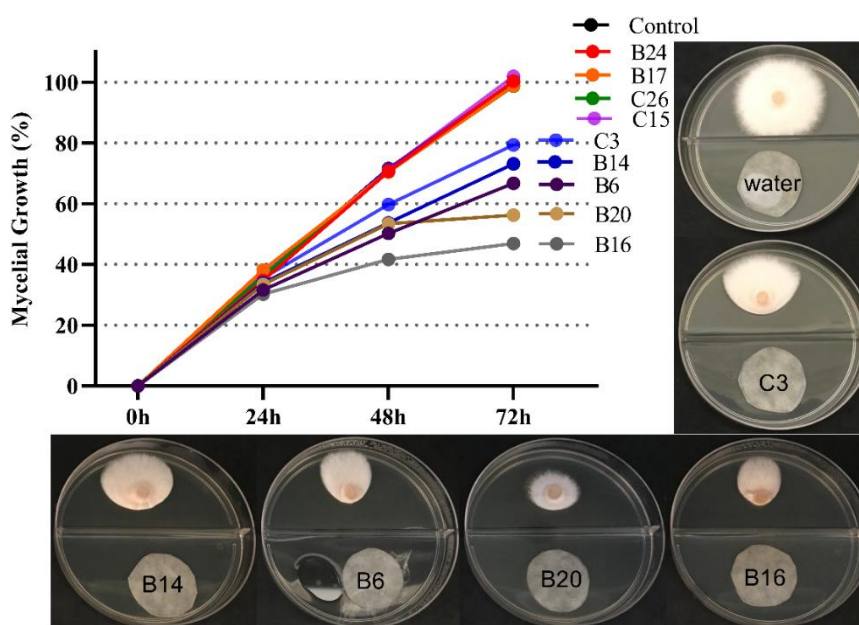
Fonte: Próprio autor

Analyzing the metabolism of the fungal strain LPPC130, it was possible to observe that the emission of the main VOCs 3-methyl-butanol acetate (F21), 2-methyl-butanol acetate (F22), 3-octyl acetate (F34) and 2-methyl-4-methoxy-benzamine (F35) showed lower means in the co-cultivation when compared to the axenic culture.

### 3.3.6 Antimicrobial activity test of volatile chemical standards against *LPPC130 F. kalimantanense*

The antimicrobial effect of nine Sigma Aldrich/Merck® brand chemical standards was identified in the bacterial strain LPP170 and the co-cultivation of the two microorganisms (bacterial and fungal strains) was tested. The commercial compounds propanoic acid (B6), pentanoic acid (B20), 3-methyl-butanoic acid (B16), butanoic acid (B14), and acetic acid (C3) demonstrated potent activity against the fungal strain LPPC130 with a p-value <0.05 in the Tukey's test. 3-methylbut-2-enoic acid (B24), 2-methyl-butanoic acid (B17), butane-2,3-diol (C15), and ethyl 3-hydroxy-butanoate (C26) showed mycelial growth like the control and insignificant separation by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. Compounds B16 and B20 demonstrated a strong inhibitory effect against the pathogen, reducing mycelial growth by 53.10% and 43.71%, respectively. Standards B6 and B14 inhibited pathogen development by 33.30% and 26.87%, while commercial VOC C3 inhibited 20.68% (FIGURE 12).

**Figura 12** - Pure standards VOCs showed strong antifungal activity against the fungal strain LPPC130. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey multiple range test method ( $p < 0.05$ ). Compounds were tested in pure form (except B24, which was used at 1 mg/mL) with a volume of 150  $\mu$ L. B24 = tiglic acid, B17 = 2-methyl-butanoic acid, C26 = ethyl 3-hydroxy-butanoate, C15 = butane-2,3-diol, C3 = acetic acid, B14 = butanoic acid, B6 = propanoic acid, B20 = pentanoic acid and B16 = 3-methyl-butanoic acid.



Fonte: Próprio autor



### 3.4 Discussion

These results showed more expressive effects in antagonistic tests against causative agents of Panama disease than those found in the pathogen's literature compared to *Bacillus* strains. For example, *B. amyloliquefaciens* NJN-6 strain inhibited Foc mycelial growth between 30 and 40% (Yuan *et al.* 2012a), while *B. amyloliquefaciens* W19 inhibited Foc by 21% (Wang *et al.*, 2013), and *B. velezensis* CT32 strain inhibited the *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* with percentages between 19.76% and 55.02% (Li *et al.* 2020a).

The data obtained from the SEM experiment demonstrate that the VOCs emitted by the LPPC170 bacterial strain cause damage to the mycelium of the LPPC130 fungal strain. The hyphae appear withered and dehydrated, which indicates that the VOCs emitted by the LPPC170 strain cause damage to the mycelium of the LPPC130 fungal strain (FIGURE 10). The literature reports two mechanisms of action of organic acids to inhibit the mycelial growth of microorganisms. The first was related to cell membrane disintegration (Alakomi *et al.*, 2000), and the second was associated with the uncoupling of the electron transport chain that inhibits the production of ATP, interrupting the absorption of nutrients by the microbial cell (Russell, 1992; Mani-López, García and López-Malo, 2012).

In this study, the main VOCs responsible for the inhibition of the pathogen were short-chain organic acids. Data interpretation from multivariate analysis suggested that the metabolism of both microorganisms was affected in co-culture. Some compounds emitted by LPPC170 bacterial strain, such as butanoic acid (B14), 3-methyl-butanoic acid (B16), and pentanoic acid (B20), and compounds emitted in the co-culture, such as acetic acid (C3), can be the key to inhibiting the pathogen in the confrontation with the bacteria. This behavior of microorganisms is related to chemical communication between the two kingdoms caused by the emission of VOCs in co-cultivation. The influence of these chemical signals can be expressed as changes in gene expression and response signals, which can increase or decrease the emission of a particular organic compound (Brown *et al.*, 2018).

Compounds that showed the most remarkable correlation with the bacteria in the multivariate analysis are all short-chain organic acids. In vitro studies demonstrate that butanoic acid (B14) and pentanoic acid (B20) showed antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* (Kovanda *et al.*, 2019). Butanoic acid inhibited the mycelial growth of fungal strains of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Li *et al.*, 2020a). 3-methyl-butanoic acid (B16) was reported as an antifungal against *Fusarium oxysporum* f. sp.

*lactucae* MA28, with 71.4% inhibition of mycelial growth of the pathogen at a concentration of 50  $\mu$ L (Chaves-López *et al.*, 2015).

Acetic acid (C3) was the compound most strongly correlated with co-cultivation. This low molecular weight molecule is antimicrobial and antiseptic in studies against *Pseudomonas aeruginosa*, a human pathogen responsible for hospital infections (Elmanama *et al.*, 2019). Studies have also shown that acetic acid and antibiotics can effectively overcome resistance to pathogens, as already observed in trials with *Salmonella* (Castro *et al.*, 2019). This application is possible because organic acids are agents that cause the cell's outer membrane to disintegrate and, consequently, more antibiotic permeability (Russell, 1992; Alakomi *et al.*, 2000; Mani-López, García and López-Malo, 2012).

The synergism of short-chain organic acids such as acetic acid, propanoic acid, butanoic acid, pentanoic acid, and 3-methyl-butanoic acid demonstrated great antimicrobial potential, inhibiting the mycelial growth of the pathogen Foc TR4 by 87.55% in vitro tests (Zhou, Liu and Lv 2018). This result corroborates the findings that organic acids emitted by bacterial strain LPPC170 and in co-cultivation are potential antimicrobial agents against the *Fusarium oxysporum* complex responsible for the Panama disease.

These results provide an overview of the interaction between microorganisms and how the VOCs act from a chemical and biological point of view, being able, through the antagonist, to promote biocontrol of the phytopathogen. In addition, the bacterial strain LPPC170 of *Bacillus* sp. has excellent potential to act as a biocontrol agent against Panama disease, providing an alternative to fungicides.

**Acknowledgments:** We would like to thank the Department of Organic and Inorganic Chemistry of the Federal University of Ceará for obtaining the GCMS chromatographic data, the Sequencing Platform of LABCEN/CCB at UFPE for the use of its facilities and Embrapa Tropical Agroindustry for all the support to this research.

**Statements & Declarations:**

**Funding:** This work was supported by Embrapa (Research project: Utilização de *Bacillus* e *Trichoderma* para controle do Mal-do-Panamá e promoção de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira, grant number: 43.13.12.007.00.00) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for funding this research: C.F.B.S. thanks proc. 444339/2014-0; M.A.S.L. thanks proc. 307033/2021-0; S.C.M. acknowledges the support of CNPq through a post-doctoral grant (166165/2020-4) and J.E.A.S. acknowledges the support of CNPq through a doctoral grant (141827/2017-3).

#### **4 EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS DE *Bacillus* sp. LPPC170 CONTRA FITOPATÓGENOS DA PÓS-COLHEITA DA BANANA (*Colletotrichum musae* e *Lasiodiplodia brasiliensis*)**

##### **RESUMO**

Fungos dos gêneros *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia* são fitopatógenos causadores de doenças na fase de pós-colheita de diversos frutos tropicais. O desenvolvimento de estratégias alternativas para reduzir e/ou substituir o uso de defensivos químicos no manejo dessas doenças tem se tornado um grande desafio na atualidade. Neste estudo, foi avaliada a atividade antagonista dos compostos orgânicos voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. LPP170, em co-cultivo, frente a dois fitopatógenos: *Colletotrichum musae* LPPC389 e *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82. Os COVs foram identificados por análise de cromatografia gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM). Nos experimentos *in vitro*, os COVs da cepa bacteriana LPPC170 inibiram o crescimento micelial dos fitopatógenos LPPC389 e BAN82 em 78,20 % e 35,77 %, respectivamente. A ação dos COVs de LPPC170 causaram danos nas estruturas vegetativas (hifas e micélio) dos fitopatógenos, observadas a partir de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados de GC-MS foram submetidos a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), revelando que as principais variáveis associadas a cepa bacteriana LPPC170 na cultura axênica e co-cultivo são da classe de ácidos carboxílicos de cadeia curta como ácido propanoico, ácido butanoico, ácido 2-metilbutanoico, ácido 3-metilbutanoico, ácido pentanoico, (*E*) ácido 2-metilbut-2-enoico e ácido acético. O potencial antifúngico dos padrões químicos foi testado *in vitro*, contra os dois isolados fúngicos: LPPC389 e BAN82, demonstrando que esses COVs estão, diretamente, associados a inibição do crescimento micelial desses fitopatógenos. Dentro desse contexto, o isolado LPPC170 apresenta um forte potencial como biocontrolador, assim como os seus COVs podem constituir princípios ativos de produtos para o controle de fitopatógenos causadores de doenças na pós-colheita dos frutos de banana.

**Palavras-chave:** Antracnose, *Colletotrichum musae*, Compostos voláteis, *Lasiodiplodia brasiliensis*, *Musa* spp., Podridão da coroa.

## 4.1 Introdução

Doenças na fase de pós-colheita tem causado danos na quantidade e qualidade dos produtos e prejuízos econômicos em todo o mundo. Nos países em desenvolvimento, as perdas pós-colheita de frutas e hortaliças são em torno de 30-40% da produção (Fao, 2011; Nicastro e Carillo, 2021). Parte desses problemas são provocados por fungos fitopatogênicos como os dos gêneros *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia* (Spagnol, *et al.*, 2018; Contarino, *et al.*, 2019). Estes patógenos são responsáveis por ocasionar a antracnose e podridão da coroa em frutos, respectivamente, acelerando o seu amadurecimento e consequentemente reduzindo a vida útil pós-colheita (Vilaplana, Hurtado e Chamorro, 2018).

Os fungicidas são essenciais para garantir a segurança alimentar em todo mundo, no entanto, é cada vez mais conhecido que o controle de doenças a partir do uso exclusivo de agrotóxicos não é a forma mais segura (Hassan *et al.*, 2021). Os microrganismos são muito evoluídos do ponto de vista biológico, e possuem facilidade para desenvolver mecanismos de defesa contra moléculas antimicrobianas, adquirindo resistência a essas substâncias ao longo do tempo (Davies e Davies, 2010; Garcia *et al.*, 2022). Além disso, os problemas de contaminação do meio ambiente, dos alimentos e mananciais causam grandes impactos para a saúde humana, além de provocar a morte da microbiota do solo, a redução da biodiversidade, dentre outros (Noumavo, *et al.*, 2016; Gao, *et al.*, 2017; Gao, *et al.*, 2018). Desta forma, o desenvolvimento de alternativas para reduzir e/ou substituir o uso de agrotóxicos nos cultivos agrícolas está se tornando um grande desafio na atualidade (Bhattacharyya e Jha, 2012; Fadiji *et al.*, 2022). A implantação de uma agricultura mais sustentável, sem agredir o meio ambiente e garantir segurança alimentar para uma população de 7 bilhões de pessoas, é uma tarefa de extrema importância para a ciência desse século (Chen, *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2021).

Dentro desse contexto, o método do controle biológico vem despontando como alternativa segura e eficiente para reduzir e/ou substituir os defensivos no manejo das doenças na agricultura (Bhattacharyya e Jha, 2012). Uma única cepa de micro-organismo benéfica (antagonista) pode ser utilizada para controlar vários fitopatógenos, promover a melhoria da qualidade do solo, o crescimento e produtividade das plantas, além de não apresentar toxicidade para o meio ambiente (Gao, *et al.*, 2017). Dentre os agentes de biocontrole, os microrganismos presentes na rizosfera constituem a primeira linha de defesa da planta contra ataques de fitopatógenos (Beneduzi, Ambrosini e Passaglia, 2012). Através dessa associação, espécies de plantas conseguem sobreviver as infecções pelos patógenos, sem a necessidade do uso de defensivos. Para tanto, se torna importante entender quais os micro-organismos que são

capazes de desenvolver antagonismo aos fitopatógenos, além dos mecanismos químicos e biológicos envolvidos (Mendes, *et al.*, 2011; Carrión, *et al.*, 2019).

O fator enzimático é a principal arma utilizada pelos micro-organismos no confronto direto entre as espécies (Mendes, *et al.*, 2011). No entanto, existem outras formas de comunicação química que os micro-organismos utilizam para delimitar os espaços, e manter as cepas fitopatogênicas distantes. O primeiro mecanismo de defesa é a emissão de compostos orgânicos voláteis (COVs) pelo antagonista na rizosfera. Esses COVs são liberados no ambiente e conseguem facilmente se dissipar podendo atingir um raio de ação abaixo e acima do solo (Cappellari, Chiappero e Banchio, 2019). Os micro-organismos produzem COVs para comunicação química. Entretanto, muitas destas moléculas são de extrema importância para a aplicação biotecnológica, já que apresentam atividade antimicrobiana e de promoção de crescimento de plantas (Morath, Hung e Bennett, 2012). A análise e caracterização estrutural de COVs emitidos por micro-organismos em experimentos de co-cultivo e avaliação da atividade antifúngica frente aos fitopatógenos da fase de pós-colheita da banana foram estudadas nesse trabalho. Os resultados revelaram que o uso da rizobactéria *Bacillus* sp. LPPC170, proveniente da rizosfera de bananeiras foi capaz de atuar como agente biocontrolador da antracnose e da podridão da coroa, podendo ser uma estratégia simples e moderna no manejo destas doenças na fase de pós-colheita da banana.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Origem e cultivo dos micro-organismos

O isolado de *Bacillus* sp. LPPC170 foi obtido a partir da rizosfera de bananeira (*Musa* spp.), e pertence a coleção de trabalho do Laboratório de Microbiologia dos solos, da Embrapa Agroindústria Tropical-CE. A cepa bacteriana (LPPC170) foi preservada em meio de cultura caldo nutriente (extrato de carne 1,0 g/L; extrato de levedura 2,0 g/L; peptona 5,0 g/L e cloreto de sódio 5,0 g/L) contendo 30% de glicerol, à temperatura de -70 °C. A cultura foi ativada em caldo nutriente por 24 h e transferida para placas de Petri, contendo o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) e posteriormente incubada na temperatura de  $28 \pm 2$  °C, por 48 h.

O fungo *C. musae* LPPC389 foi isolado de frutos infectados de banana, sendo obtido em supermercado no município de Fortaleza-Ceará. Enquanto o fungo *L. brasiliensis* BAN82 foi obtido a partir de frutos infectados, coletados em área de produção de bananas no município de Assu-RN. O isolamento dos fungos foi realizado no Laboratório de Patologia Pós-colheita da Embrapa Agroindústria Tropical, e as cepas foram preservadas pelo método de

Castellani em meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) inclinado, à temperatura de  $28 \pm 2$  °C. A ativação das cepas fúngicas foi realizada a partir de repiques em placas de petri, contendo meio BDA, e incubado na temperatura de 28 °C por um período 7 dias, com fotoperíodo de 12 h.

#### **4.2.2 Identificação molecular dos micro-organismos**

A identificação molecular da bactéria LPPC170 foi descrita anteriormente por Santos e colaboradores (2023a).

Para extração de DNA do isolado de *C. musae* LPPC389, utilizou-se o cultivo monospórico preparado previamente em meio de cultura BDA. Na sequência, discos de micélio do isolado foram cultivados em caldo BD (Batata e dextrose) por 3 dias sob agitação mecânica de 70 rpm. A extração do DNA foi realizada baseada no método CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio), com a adaptação do protocolo de Murray & Thompson (1980). O DNA extraído foi avaliado e quantificado com a utilização de NanoDrop 2000. Fragmentos das regiões gênicas espaço interno transcrito (ITS), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glutamina sintetase (GS), actina (ACT) e  $\beta$ -tubulina (TUB2) do isolado LPPC389 foram amplificados por PCR com os respectivos primers: ITS4/ITS5; GDF1/GDR1; GSF1/GSR1; ACT512F/ACT783R; Bt2a/Bt2b. Os produtos das PCRs foram avaliados utilizando-se eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados no transluminador. Após avaliação dos produtos das PCRs, o DNA amplificado foi purificado com a utilização do Kit (Promega) Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System.

Os fragmentos amplificados e purificados foram sequenciados nas direções senso e antisenso. O BioEdit foi utilizado para montagem das sequências contigs e alinhamentos múltiplos. Sequências de referências foram baixadas através da base de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Su *et al.*, 2011; Bhunjun *et al.*, 2021;). Foram feitos os alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas tipos de espécies filogenéticas do Complexo *Gloeosporioides* juntamente com o isolado obtido, utilizando-se o programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente e concatenados. Para inferência filogenética do alinhamento concatenado foi realizada a análise de máxima parcimônia, feita no programa Mega 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), seguida das análises de bootstrap com 1000 repetições.

A caracterização a nível de espécie do isolado *L. brasiliensis* BAN82 foi relatada por Santos *et al.* (2023b).

#### 4.2.3 Efeito antifúngico dos COVs de *Bacillus* sp. (LPPC170)

Para a análise do efeito antagonista dos constituintes voláteis (COVs) de *Bacillus* sp. (LPPC170) frente aos fitopatógenos em experimentos de co-cultivo conduziu-se o método de duplas placas utilizando o meio de cultura 523. O isolado LPPC170 foi estriado em toda a área da placa, enquanto, um disco de 5 mm de diâmetro do micélio de cada fitopatógeno foi transferido para a região central de outra placa de Petri. Em seguida, as duas placas de Petri, com as mesmas dimensões, foram unidas formando um sistema fechado (ANEXO A, FIGURA 1). As placas foram seladas com parafilme e mantidas na temperatura de  $28 \pm 2$  °C e em fotoperíodo claro de 12 h, durante um período de 4 dias para o isolado LPPC389 e 2 dias para BAN82.

Para a obtenção dos valores do efeito antifúngico dos COVs foi mensurado o crescimento radial do micélio dos patógenos na ausência do antagonista (CRA) em comparação com crescimento radial do micélio na presença da cepa bacteriana LPPC170 (CRP) (FÓRMULA 1), com auxílio de um paquímetro. As medições foram aferidas a cada 24 horas de experimento.

$$(\text{Inibição \%}) = \frac{(\text{CRN}) - (\text{CRP})}{(\text{CRN})} \times (100 \%) \quad (\text{FÓRMULA 1})$$

#### 4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise de MEV foi coletado fragmentos retangulares do crescimento micelial dos isolados fúngicos, do controle negativo (patógenos na ausência da bactéria) e do tratamento com a cepa bacteriana LPPC170, cultivados em meio de cultura 523 por um período de 4 dias. As amostras foram submersas em 1.5 mL de solução Karnovsky (50 ml de paraformaldeído a 8%, 10 ml de glutaraldeído a 25%, 940 ml de tampão fosfato 0,2 M, pH 7,3) para fixação. A solução Karnovsky foi removida e as amostras foram tratadas com tampão fosfato 0,1 M, e fixadas com tetróxido de ósmio 1%, por um período de 1 hora. Em seguida, os fragmentos dos isolados fúngicos foram lavados com água destilada, 3 vezes por 10 minutos. O processo de desidratação foi realizado aplicando sucessivas lavagens de etanol 30 % a 90 % com intervalo de 15 minutos e 3 vezes com etanol 100 % com período de 15 minutos para ser submetido ao processo de liofilização utilizando dióxido de carbono líquido e um aparelho de secagem de ponto crítico SEM 850. Em seguida, as amostras foram fixadas em suporte metálico



sobre a superfície de uma fita de carbono dupla-face. Para o processo de metalização foi aplicada uma camada condutora de ouro de aproximadamente 30 nm de espessura utilizando metalizador K650 da Emitech. As imagens foram observadas por aparelho MEV (DMS 940; ZEISS) utilizando aceleração de tensão de 15 kV.

#### **4.2.5 Coleta dos COVs por microextração em fase sólida (SPME-HS)**

A fibra divinyl benzene/carboxen/PDMS (DCP, 50/30  $\mu\text{m}$ ) 2 cm foi utilizada para a coleta dos COVs a partir da técnica de microextração em fase sólida. A coleta foi realizada em *headspace* (HS), inserindo a fibra no frasco por 30 min, a uma temperatura de 50 °C (ANEXO 1, FIGURA 2). A metodologia de captura dos COVs foi realizada de acordo com os métodos utilizados por Yuan, *et al.*, 2012a e Tahir, *et al.*, 2017. Para capturar os COVs emitidos pelos micro-organismos um *vial* de 40 mL, contendo 10 mL de meio de cultura 523 semissólido foi utilizado. O sistema de cultivo foi esterilizado a 121 °C por 15 min. Posteriormente, uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) da cultura axênica da cepa bacteriana (LPPC170) foi inoculada no sistema de cultivo. Em outro *vial*, um disco de 5 mm de diâmetro da cultura fúngica foi adicionado.

Após analisar os COVs de cada micro-organismo individualmente, a bactéria foi confrontada em sistema de co-cultivo com cada uma das cepas fúngicas. Para cultivar os dois micro-organismos no mesmo *vial* de 40 mL, o meio de cultura 523 semissólido foi vertido nas paredes do frasco (ANEXO A, FIGURA 2). Em um dos lados a cepa bacteriana foi estriada e do outro lado do *vial* um disco de 5 mm do fitopatógeno foi inoculado. Os frascos foram hermeticamente vedados e mantidos durante três dias de incubação, a temperatura de  $28 \pm 2$  °C e, em fotoperíodo claro de 12 h.

#### **4.2.6 Análise dos COVs por CG/EM**

As análises por CG/EM foram realizadas usando um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo QP 2010) equipado com uma coluna DB-5 de 30 m por 0,25 mm com espessura do filme de 0,25  $\mu\text{M}$  (Agilent J&W). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. A fibra SPME foi dessorvida a 220 °C por 5 min no modo *splitless*. A temperatura inicial do forno foi de 35 °C por 3 min, a temperatura foi aumentada gradativamente a uma taxa de 10 °C/min, até 180 °C e, posteriormente a uma taxa de 4 °C/min até 240 °C, permanecendo por 5 min. O tempo total de análise foi de 25 min.

As amostras foram ionizadas por impacto eletrônico a 70 eV à temperatura de 220 °C. Os espectros de massas foram obtidos com o *scan* programado para uma faixa de massa de 35 - 500 Da. A identificação dos compostos voláteis foi realizada utilizando o banco de dados da biblioteca de espectros de massas do NIST/EPA/NIH (NIST 11 MS), levando em consideração a fase da coluna utilizada nos experimentos, o índice de similaridades dos espectros de massas maior igual a 75%, o tempo de retenção de cada absorção através do índice de *Kovats* (IK) de padrões de uma série de *n*-alcanos C7-C30 (FÓRMULA 2).

$$IK = 100 \left[ n + (N - n) \left( \frac{\text{Log Tr}(X) - \text{Log Tr}(n)}{\text{Log Tr}(N) - \text{Log Tr}(n)} \right) \right] \quad \text{FÓRMULA 2}$$

Onde, *n* é o número de carbonos do padrão *n*-alcano adjacente menos retido, e *N* é o número de carbonos do padrão *n*-alcano adjacente mais retido; Tr (X) é o tempo de retenção do composto de interesse; Tr (n) é o tempo de retenção do alcano que antecede o composto de interesse (X) e Tr (N) é o tempo de retenção do alcano que sucede X.

#### **4.2.7 Ensaio dos COVs comerciais contra os fungos fitopatogênicos**

Os COVs comerciais foram obtidos da marca Sigma/Merck®, com grau de pureza de 98% a 99,5%. Foram utilizadas placas de Petri com uma divisória. Os dois lados da placa continham meio de cultura 523 semissólido, em um dos lados foi inoculado um disco de 5 mm da cultura fúngica e do outro lado da placa um disco de 2,5 cm de papel filtro esterilizado. Uma alíquota de 150 µL da substância comercial pura foi adicionada ao papel filtro (Fernando *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2012a) (ANEXO A, FIGURA 3). Para o controle negativo foram adicionados 150 µL de água esterilizada. O composto na forma sólida foi dissolvido em água na concentração de 1 mg/mL. No cálculo das médias de inibição utilizou-se a fórmula 1, descrita no item 2.3.

#### **4.2.8 Delineamentos experimentais**

Na análise de antagonismo dos COVs da cepa bacteriana LPCC170, o delineamento experimental foi realizado com 5 repetições (cada placa = uma repetição). Para o teste de antagonismo dos padrões e análises por SPME, o delineamento foi o inteiramente casualizado, com 3 repetições (cada repetição = uma placa teste).

#### **4.2.9 Tratamento estatístico**

O programa MetaboAnalyst, versão 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>), disponível em plataforma online, foi utilizado para obtenção das análises multivariada. Os dados foram normalizados pela média de cada amostra, foram submetidos a transformações logarítmicas generalizadas e, por fim, o autoescalamento. Os dados normalizados foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) pelo método de diferença mínima significativa de Fisher (LSD de Fisher), obtendo-se um valor de  $P < 0,05$ .

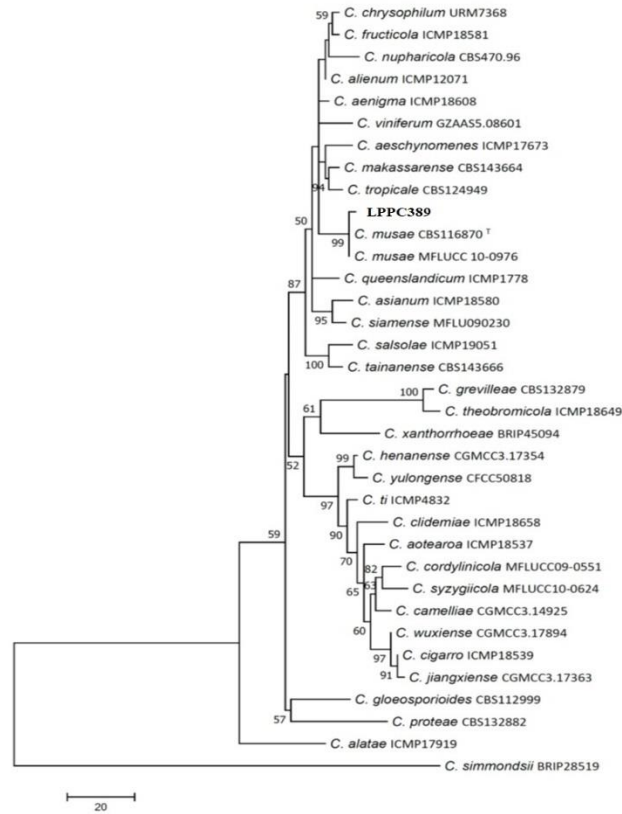
### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Identificação dos micro-organismos**

O isolado LPPC170 foi caracterizado como *Bacillus* grupo *cereus* e suas sequências 16S foram depositadas no banco de dados Genbank (número de acesso: MN565278) (Santos *et al.*, 2023a).

Para o isolado LPPC389, a análise concatenada das cinco regiões gênicas, por meio da inferência de máxima parcimônia rendeu uma árvore mais parcimoniosa (FIGURA 13), onde se pode observar a formação de um clado bem suportado com 99% de *bootstrap* entre o isolado e uma espécie filogenética previamente descrita, *Colletotrichum musae*. Possibilitando assim, identificar o isolado obtido como tal espécie, essa pertencente ao Complexo *Gloeosporioides*.

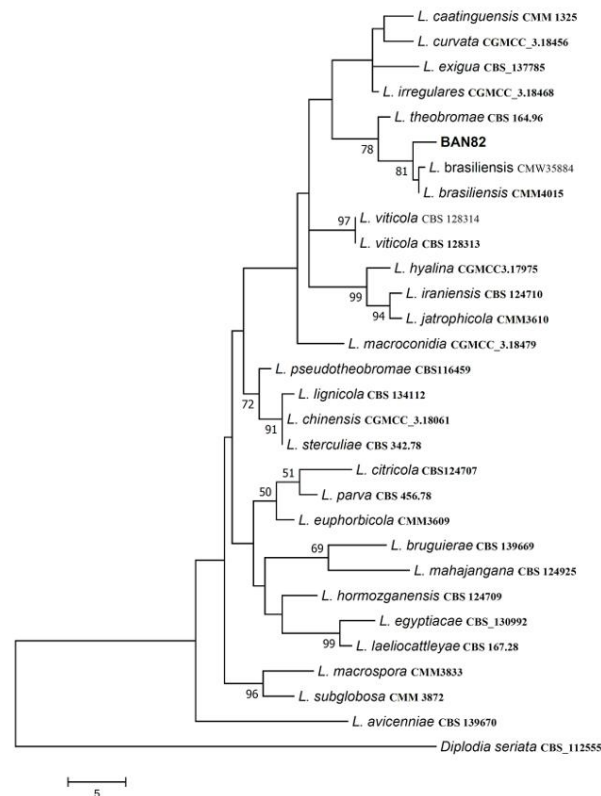
**Figura 13** - Árvore de máxima parcimônia (MP) concatenada das regiões gênicas *ITS*, *GAPDH*, *GS*, *ACT* e *TUB2*. Os valores nos ramos são de 1000 repetições de *bootstrap*. O código em negrito refere-se ao isolado deste estudo; outros códigos referem-se à sequência de *C. simmondsii* (BRIP28519) foi usada como outgroup.



Fonte: Próprio autor; Diene Silva

O fungo BAN82 foi identificado a partir da análise multigênica das três regiões, por meio da inferência de máxima parcimônia (FIGURA 14). Com as análises dos dados foi observado que o isolado BAN82 agrupou como *Lasiodiplodia brasiliensis*, apresentando um suporte de *bootstrap* de 81% (Santos *et al.*, 2023b).

**Figura 14** - Árvore de máxima parcimônia (MP) concatenada das regiões gênicas *EF-1a*, *TUB2* e *ITS*. Os valores nos ramos são de 1000 repetições de *bootstrap*. O código BAN82 em negrito refere-se ao isolado deste estudo; outros códigos em negrito referem-se as sequências tipos. Sequência de *Diplodia seriata* (CBS\_112555) foi usada como outgroup.



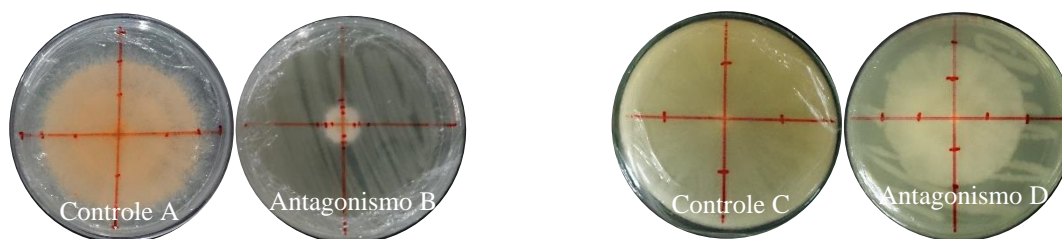
Fonte: Próprio autor; Diene Silva

#### 4.3.2 Ensaio da atividade antifúngica dos COVs de LPPC170

Os testes de antagonismo *in vitro* mostraram que os COVs da cepa de *Bacillus* LPPC170 inibiram o crescimento micelial dos fitopatógenos da banana. O isolado BAN82 (*L. brasiliensis*) se mostrou mais resistente a ação dos voláteis de LPPC170 nos ensaios em placa de Petri. Após dois dias de experimentos o controle negativo (placa contendo apenas o crescimento micelial dos isolados fúngicos) cresceu em toda a região da superfície da placa. Por outro lado, foi observado que no co-cultivo (isolados fúngicos na presença da bactéria) houve uma inibição de 35,77% do crescimento micelial do patógeno (TABELA 4). Os COVs emitidos pela cepa antagonista LPPC170 tiveram maior eficácia contra o fungo causador da antracnose da banana *C. musae* (LPPC389). A inibição do crescimento micelial desse patógeno foi de 78,20% em comparação com o controle negativo, após 4 dias de experimentos em placa de Petri.

**Tabela 4** - Efeito antagonístico dos COVs da cepa *Bacillus* LPPC170 frente ao crescimento micelial de *C. musae* LPPC389 (A e B) e *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82 (C e D) em testes in vitro. Os dados são a média de cinco repetições com  $\pm$  desvio padrão (DP). As médias nos dois testes apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste Fischer LSD ( $P < 0,05$ ).

Tratamentos	LPPC170 x <i>C. musae</i>		LPPC170 x <i>L. brasiliensis</i>	
	Crescimento micelial (cm)	Inibição (%)	Crescimento micelial (Cm)	Inibição (%)
<b>Antagonismo</b>	1,70 $\pm$ 0,45	78,20	5,78 $\pm$ 0,11	35,77
<b>Controle</b>	7,82 $\pm$ 0,20		9,00 $\pm$ 0,00	
<b>t-teste</b>	p<0,05		P<0,05	

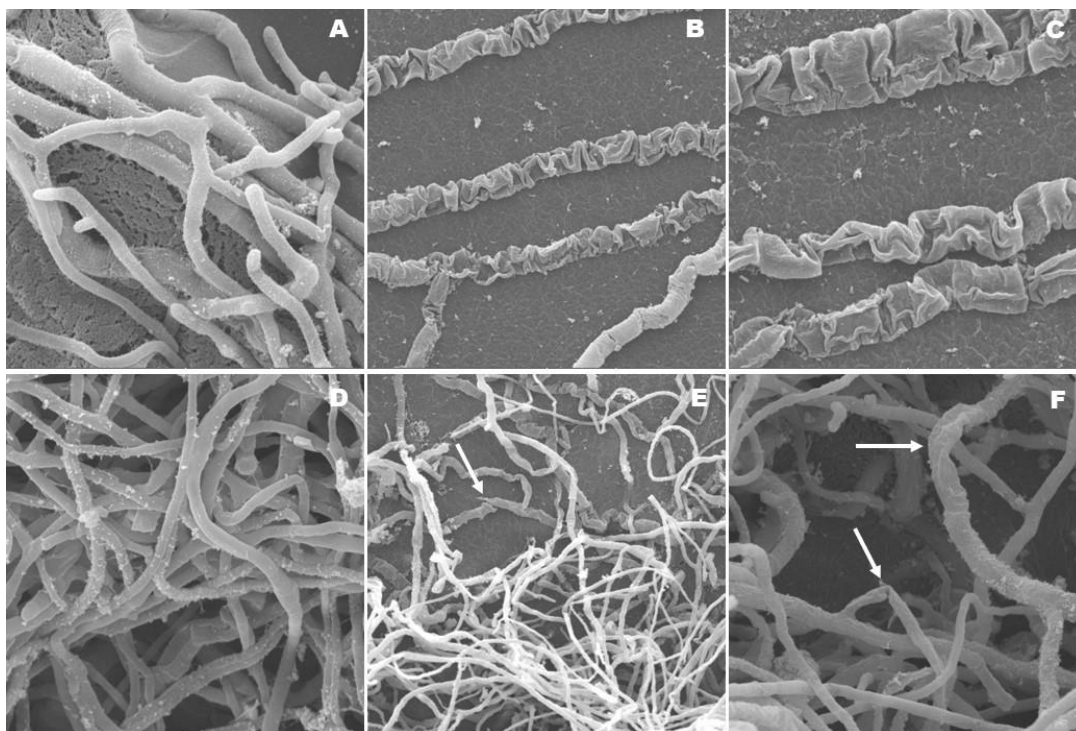


Fonte: Próprio autor

#### 4.3.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

As estruturas morfológicas (vegetativas) dos patógenos fúngicos LPPC389 e BAN82 foram observadas após a exposição aos COVs da cepa bacteriana LPPC170. As figuras 15A e D demonstram as estruturas vegetativas dos fungos na ausência da cepa bacteriana. As hifas estão completamente intactas e apresentam aparência aveludada, volumosa e hidratadas. Nas figuras 15B, C, E e F, observam-se as estruturas vegetativas dos fungos após 4 dias de exposição aos COVs da bactéria LPPC170, as imagens revelam a aparência das paredes externas das hifas. As paredes celulares das hifas foram rompidas e desidratadas, as aparências aveludadas das hifas desapareceram mostrando uma estrutura mais rugosa, severamente danificadas pela ação dos COVs.

**Figura 15** - Microscopia Eletrônica de Varredura de (A) LPPC389 na ausência do antagonista, (B e C) tratamento com a cepa bacteriana LPPC170, (D) BAN82 na ausência do antagonista, (E e F) tratamento com a cepa bacteriana LPPC170. As imagens foram observadas após 4 dias de incubação a  $28 \pm 2$  °C.



Fonte: Próprio autor; Celli Muniz

#### 4.3.4 Identificação dos COVs por HS-GCMS

Vinte e sete COVs foram identificados na cultura axênica da cepa bacteriana LPPC170, a partir das análises por CGEM. Os compostos das classes dos álcoois e ácidos carboxílicos estavam presentes majoritariamente. De acordo com os valores relativos de área os COVs ácido 3-metilbutanoico (15), ácido 2-metilbutanoico (18), 2-metilpropanol (4) e hexanol (20) foram emitidos em maior quantidade.

Na cultura axênica do isolado fúngico *C. musae* LPPC389 em meio de cultura 523 foram identificados 16 COVs, caracterizados como aldeído (1), ésteres (2), cetonas (3), terpenos (4) e álcoois (6). Os COVs acetato de etila (2), 2-metilpropanol (4), 3-hidroxibutan-2-ona (8), 3-metilbutanol, e 2-metilbutanol (10) foram produzidos em comum com a cultura da cepa *Bacillus* sp. LPPC170 (TABELA 5). No entanto, para o fitopatógeno LPPC389 observou-se a presença de quatro compostos terpênicos:  $\alpha$ -tujeno (29),  $\alpha$ -felandreno (40),  $\gamma$ -terpineno (41) e *trans*- $\beta$ -ocimeno (42). Nove diferentes compostos foram identificados no co-cultivo entre a cepa LPPC170 e o isolado fúngico LPPC389. Na sua maioria, foram identificados COVs das classes dos ésteres (6), cetonas (2) e álcoois (1), e caracterizados como ácido acético (3), 5-metil-2-hexanona (19), pentanoato de etila (24), 3-hidroxibutanoato de etila (26), hexanoato de

etila (28), isobutirato de 3-metilbutila (39), octanoato de etila (51), undecan-2-ona (54) e undecan-2-ol (55).

Na análise por CG/EM do meio de cultivo contendo apenas o fitopatógeno, um total de 15 COVs foram identificados, dos quais os álcoois (6) e ésteres (6) revelaram-se como os constituintes majoritários (TABELA 5). No experimento de co-cultivo entre a cepa bacteriana LPPC170 e o isolado *L. brasiliensis* BAN82, observou-se a presença de 11 novos compostos, que foram caracterizados como 2-metilbutanoato de butila (16), acetato de 3-metilbutila (22), heptan-2-ona (23), pentanoato de etila (24), 2-metilpropanoato de butila (27), 3-hidroxi-butanoato de etila (28), butanoato de 2-metilpropila (32), butanoato de 3-metilbutila (43), 2-nonanol (47), benzenoato de etila (52) e undecan-2-ol (55).

**Tabela 5** - COVs identificados por análises de CG-EM nas culturas axênicas de *Bacillus* LPPC170, *C. musae* LPPC389 e *L. brasiliensis* BAN82 e na co-cultura de LPPC170 x LPPC389 e LPPC170 x BAN82. Abundância relativa (%) dos valores de área. Os dados são a média de três repetições com  $\pm$  desvio padrão (DP).

N	COVs	KI	Cultura axênica			Co-cultivo	
			Abundância relativa (%)			Abundância relativa (%)	
			LPPC170	LPPC389	BAN82	LPPC389	BAN82
1	(E)-Penta-1,3-dieno		1.87 $\pm$ 0.31			0.45 $\pm$ 0.30	0.04 $\pm$ 0.01
2	Acetato de etila	612	0.54 $\pm$ 0.08	0.64 $\pm$ 0.22	1.60 $\pm$ 0.47	2.91 $\pm$ 1.88	3.07 $\pm$ 0.27
3	Ácido acético	609				1.37 $\pm$ 0.01	
4	2-Metilpropanol	626	6.66 $\pm$ 0.73	1.92 $\pm$ 0.36	3.35 $\pm$ 0.48	3.24 $\pm$ 0.18	2.25 $\pm$ 0.09
5	Butanol	664	3.26 $\pm$ 0.15			0.51 $\pm$ 0.05	
6	Ácido propanóico	687	0.47 $\pm$ 0.04				
7	Tioacetato de metila	699	0.55 $\pm$ 0.07			0.1 $\pm$ 0.02	
8	3-Hidroxi-butan-2-ona	708	1.56 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.24		0.7 $\pm$ 0.16	
9	3-Metilbutanol	735	2.3 $\pm$ 0.59	16.65 $\pm$ 3.95	22.78 $\pm$ 2.81	6.73 $\pm$ 0.58	12.60 $\pm$ 0.14
10	2-Metilbutanol	739	0.20 $\pm$ 0.05	5.25 $\pm$ 1,01	4.24 $\pm$ 0.91	1.92 $\pm$ 0.12	3.06 $\pm$ 0.40
11	Isobutirato de etila	760	4.83 $\pm$ 0.97		0.81 $\pm$ 0.15	1.99 $\pm$ 0.17	1.35 $\pm$ 0.12
12	Pentanol	768	1.77 $\pm$ 0.12			0.22 $\pm$ 0.07	0.16 $\pm$ 0.06
13	Ácido butanoico	782	2.16 $\pm$ 0.71			0.77 $\pm$ 0.40	0.41 $\pm$ 0.05
14	Butanoato de etila	798			1.86 $\pm$ 0.24		6.03 $\pm$ 1.26
15	Ácido 3-metilbutanoico	847	20.94 $\pm$ 1.72			7.83 $\pm$ 1.27	0.92 $\pm$ 0.22
16	2-Metilbutanoato de butila	852					0.46 $\pm$ 0.21
17	3-Metilbutanoato de etila	855			1.07 $\pm$ 0.31		2.67 $\pm$ 0.89
18	Ácido-2-Metilbutanoico	857	14.89 $\pm$ 2.65			4.74 $\pm$ 1.22	1.02 $\pm$ 0.05
19	5-Metil-hexan-2-ona	861				0.52 $\pm$ 0.05	
20	Hexanol	869	5.51 $\pm$ 0.42		0.18 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.53	0.36 $\pm$ 0.16
21	Ácido pentanoico	875	1.02 $\pm$ 0.13			0.71 $\pm$ 0.28	0.08 $\pm$ 0.01
22	Acetato de 3-metilbutanol	877		0.12 $\pm$ 0.01			0.21 $\pm$ 0.01
23	Heptan-2-ona	891		0.22 $\pm$ 0.07		0.89 $\pm$ 0.21	0.69 $\pm$ 0.30
24	Pentanoato de etila	898				1.12 $\pm$ 0.06	1.85 $\pm$ 0.56
25	Heptan-2-ol	898		0.10 $\pm$ 0.02			
26	Ácido 2-metilbut-2-enoico	912	1.43 $\pm$ 0.13			1.59 $\pm$ 1.34	



27	Propanoato de 2-metilbutila	914					0.52±0.12
28	3-Hidroxi-butanoato de etila	937				2.88±0.50	1.20±0.06
29	$\alpha$ -Tujeno	941		0.16±0.02			
30	Ácido 2,2-dimetilpropanotioico	951	0.88±0.13				
31	2-Hidroxi-4-metil-pentanoato de metila	957	1.45±0.28			0.6±0.36	
32	Butanoato de 2-metilpropila	957					0.32±0.06
33	Ácido hexanóico	967	1.70±0.09				
34	Heptanol	972	2.26±0.15				0.89±0.04
35	Octen-3-ol	982			3.06±1.16		
36	Hexan-3-ona	990			0.61±0.15		0.1±0.01
37	$\beta$ -Mirceno	997			0.51±0.08		0.48±0.05
38	Hexanoato de etila	997				0.29±0.01	
39	Isobutirato de 3-metilbutila	1014			0.41±0.01	0.46±0.06	0.61±0.06
40	$\alpha$ -felandreno	1023		7.47±0.16		3.67±0.62	
41	$\gamma$ -Terpineno	1036		3.46±0.20		1.28±0.54	
42	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimeno	1054		37.54±6.97		28.86±2.00	
43	Butanoato de 3-metilbutila	1059					0.50±0.05
44	Benzeno acetaldeído	1062		2.65±1.19	4.04±1.41	3.37±2.16	
45	Octanol	1074	3.82±0.27			0.12±0.50	0.66±0.01
46	Nonan-2-ona	1097		1.85±0.24	0.27±0.03	7.07±2.40	1.47±0.71
47	Nonan-2-ol	1103		0.87±0.41		2.29±0.66	2.79±1.29
48	Ácido octanoico	1116	1.51±0.14				
49	Álcool feniletílico	1137		13.47±4.26	5.29±0.35	4.23±1.67	2.86±0.38
50	Nonanol	1176	0.30±0.05				
51	Octanoato de etila	1196				0.84±0.65	
52	Benzenoato de etila	1264					0.36±0.04
53	Decanol	1280	2.58±0.61				
54	Undecan-2-ona	1304				0.45±0.07	
55	Undecan-2-ol	1310				0.34±0.26	0.29±0.14
56	Undecanol	1353	0.85±0.36				
57	Ácido decanóico	1369	1.51±0.49			0.19±0.40	

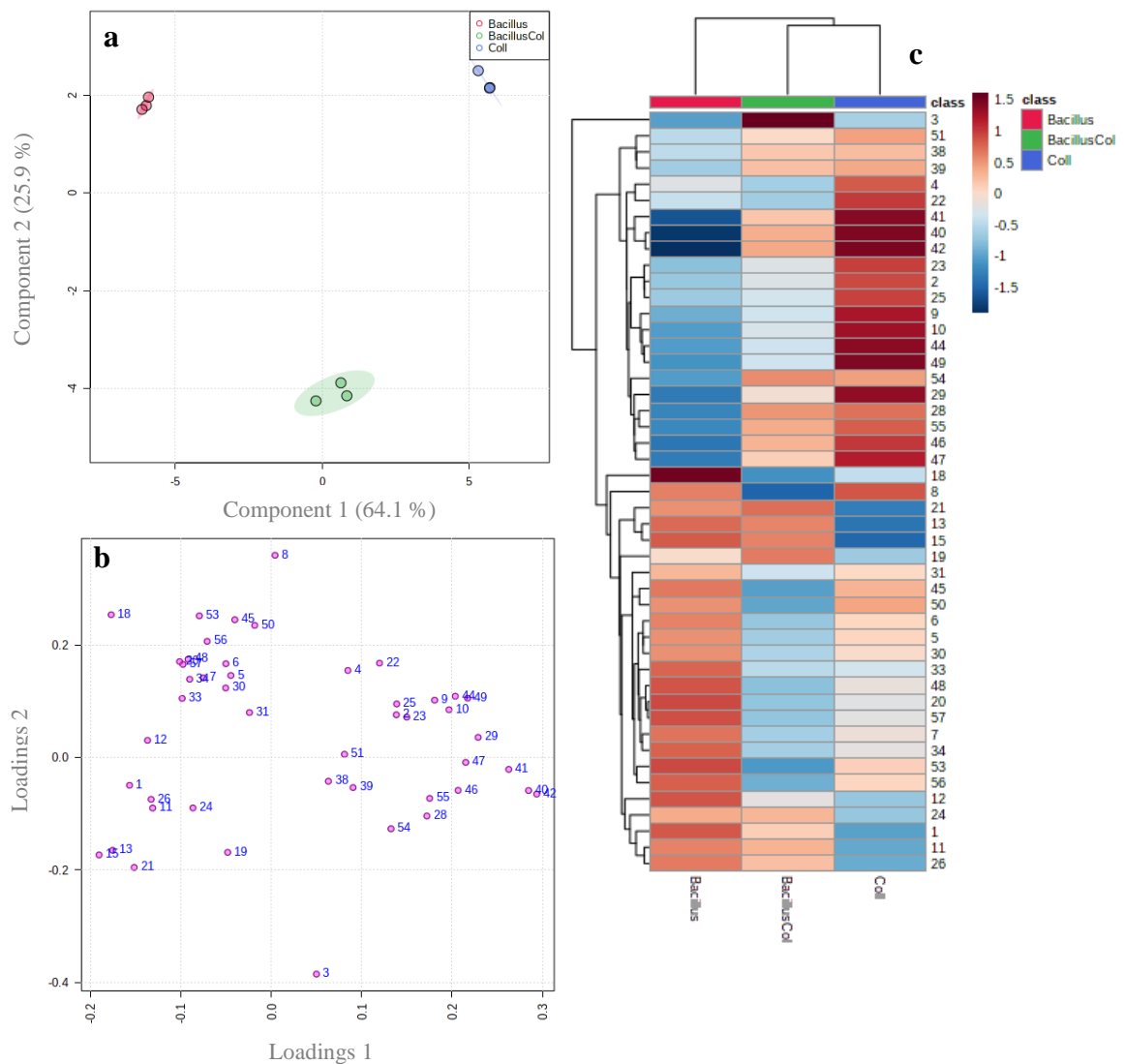
Fonte: Próprio autor

#### 4.3.5 Análises quimiométricas

Para melhor discriminar os dados obtidos a partir da análise dos COVs foi utilizado o método de análise discriminante de regressão dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Na análise por PLS-DA, as configurações de cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 e *C. musae* LPPC389 mostrou que a técnica permitiu a separação das três amostras biológicas. As duas principais componentes explicaram 90% da variância total. A análise de variância (ANOVA) usando o método LSD de Fisher mostrou um valor de P significativo (0,05). Os compostos mais

relevantes que contribuíram para a separação de cada grupo foi ácido-2-metilbutanoico (18), hexanol (20), decanol (53) e 3-hidroxi-butan-2-ona (8) para *Bacillus* LPPC170; 2-metilpropanol (4), 3-metilpropanol (9), acetato de 3-metilbutanol (22) para *C. musae* LPPC389 e ácido acético (3), 5-metil-hexan-2-ona (19), ácido 3-metilbutanoico (15) e ácido pentanoico (21) para o co-cultivo. As informações do PLS-DA associadas ao *Heatmap* possibilitou uma melhor compreensão da interação entre os dois micro-organismos no co-cultivo (FIGURA 16).

**Figura 16** - Análise PLS-DA dos valores de área obtido por CG-EM da emissão de COVs de LPPC170 (*Bacillus* sp.), LPPC389 (*C. musae*) e co-cultivo (*Bacillus* sp. x *C. musae*) em triplicatas biológicas. (a) Gráfico de escores: Cultura axênica da cepa bacteriana (vermelho), Cultura axênica da cepa fúngica do patógeno LPPC389 (azul) e co-cultivo (verde); (b) Gráfico de *loadings* em escala de correlação: Em regiões positivas: cultura axênica de cepa bacteriana e cepa fúngica. Em regiões negativas: co-cultivo. (c) Gráfico de *Heatmap* da correlação das três análises diferentes e abundância relativa de emissão de VOCs (n=3). A análise de variância (ANOVA) usando o método LSD de Fisher mostrou um valor de *p* significativo (0,05).

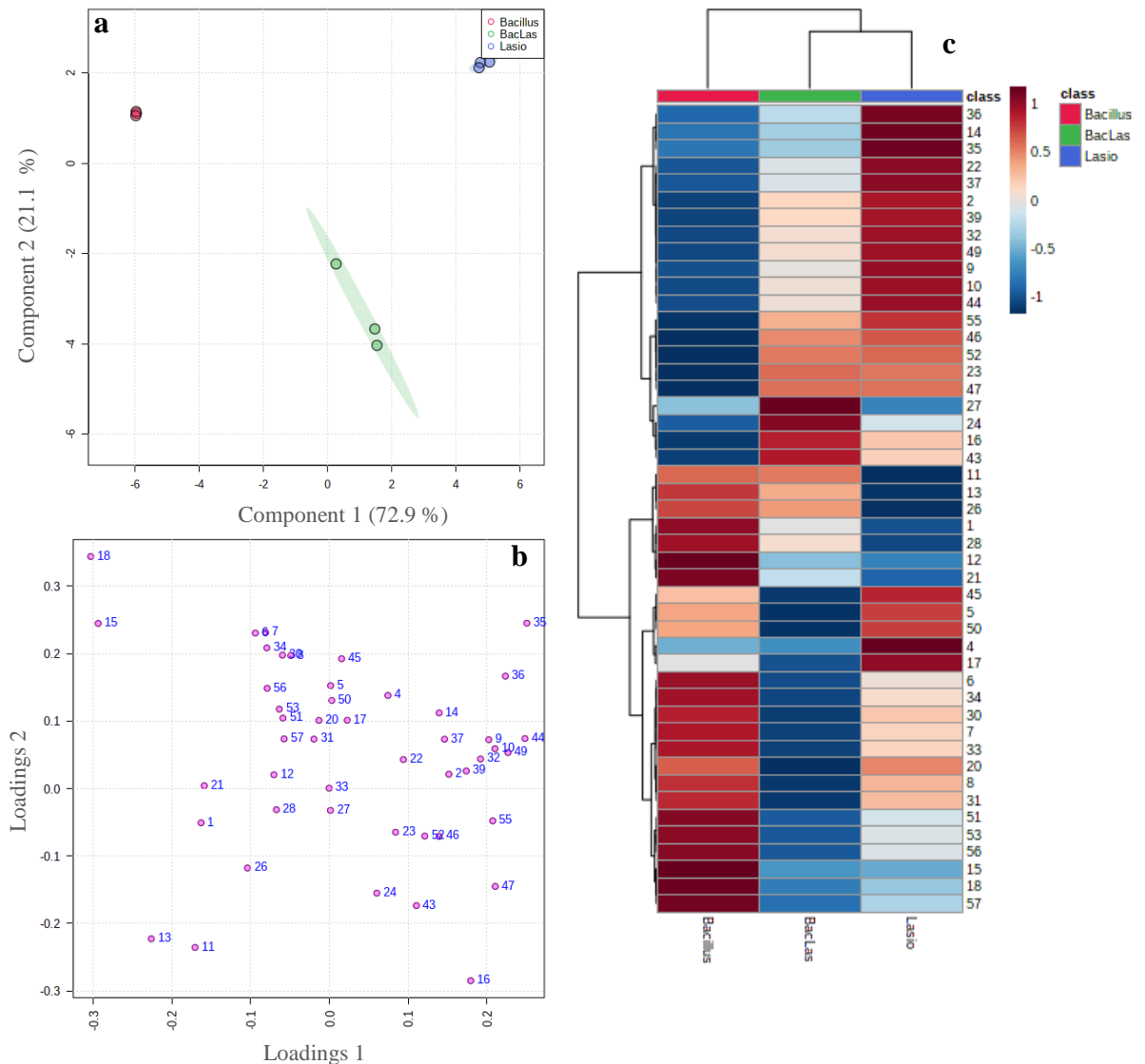


Fonte: Próprio autor

O *Heatmap* mostra que a abundância relativa da emissão de alguns COVs emitidos pela bactéria não tiveram variação significativa durante o co-cultivo. Esses compostos pertencem a classe de ácidos carboxílicos de cadeia curta; ácido 3-metilbutanoico (**15**), ácido pentanoico (**21**), ácido butanoico (**13**) além de um composto produzido somente no co-cultivo; o ácido acético (**3**).

Por outro lado, a análise PLS-DA de *Bacillus* sp. LPPC170, *L. brasiliensis* BAN82 e co-cultivo, mostrou os três sistemas biológicos separados e as duas componentes principais explicaram 94% da variância total. Os gráficos de *scores* e *loadings* junto ao *Heatmap* (FIGURA 17) revelam que no co-cultivo entre *Bacillus* sp. LPPC170 e o patógeno *L. brasiliensis* BAN82 a emissão dos COVs ácido 3-metilbutanoico (**15**) e ácido pentanoico (**21**) produzidos pela cultura axênica da bactéria, foram reduzidos durante a interação entre os microorganismos. As variáveis que mais contribuíram para a separação das amostras do co-cultivo foram os COVs 2-metilbutanoato de butila (**16**), butanoato de 3-metilbutila (**43**) e nonan-2-ol (**47**) produzidos exclusivamente na co-cultura. Os COVs isobutirato de etila (**11**) e ácido butanoico (**13**) produzidos somente por *Bacillus* sp. LPPC170 também aparecem em regiões negativas no gráfico *loadings* do PLS-DA e o *Heatmap* mostra que a abundância relativa desses compostos na co-cultura foi pouco afetada, revelando que alguns desses compostos podem estar relacionados com o mecanismo de defesa da bactéria e, conseqüentemente com a inibição do fungo.

**Figura 17** - Análise PLS-DA dos valores de área obtido por CG-EM da emissão de COVs de LPPC170 (*Bacillus* sp.), BAN82 (*L. brasiliensis*) e co-cultivo (*Bacillus* sp x *L. brasiliensis*.) (n=3). **(a)** Gráfico de escores: Cultura axênica da cepa bacteriana (vermelho), cultura axênica da cepa fúngica (lilás) e co-cultivo (verde); **(b)** Gráfico de *loadings* em escala de correlação: Em regiões positivas: COVs correlacionados a cepa bacteriana e o isolado fúngico. Em regiões negativas: COVs no co-cultivo. **(c)** Gráfico de *Heatmap* da correlação das três análises diferentes e abundância relativa de emissão de COVs (n=3). A análise de variância (ANOVA) usando o método LSD de Fisher mostrou um valor de p significativo (0,05).



Fonte: Próprio autor

#### 4.3.6 Teste de atividade antimicrobiana de padrões químicos voláteis

Na análise quimiométrica foi possível identificar que os ácidos carboxílicos foram as principais variáveis que se destacaram no grupo da cepa bacteriana LPPC170 tanto na cultura axênica como na co-cultura. Esses dados ajudaram a selecionar alguns padrões químicos (Sigma Aldrich/Merck®) com potencial de atividade antifúngica que foram testados frente as

cepas dos patógenos da pós-colheita da banana (FIGURA 18). Os padrões ácido acético (**3**), ácido propanoico (**6**), ácido butanoico (**13**), ácido 3-metilbutanoico (**15**), ácido pentanoico (**21**) se mostraram promissores na inibição do crescimento micelial de *C. musae* (LPCC389) com inibição entre 34 e 80% (TABELA 6). Os testes de variância demonstraram que houve separação significativa  $P=0.0001$  (Teste de Tukey). Por outro lado, os COVs ácido 2-metilbutanoico (**18**), (*E*) ácido 2-metilbut-2-enoico (**26**) e 3-hidroxibutanoato de etila (**28**) não apresentaram atividade significativa de acordo com a análise de variância ANOVA utilizando o teste de Tukey ( $P>0.8$ ).

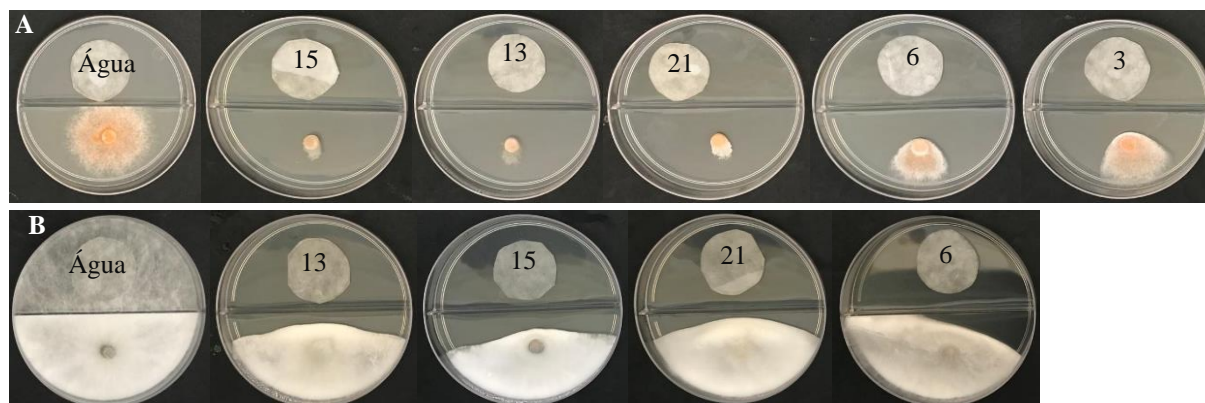
Contra o patógeno *L. brasiliensis* (BAN82) apenas o padrão ácido butanoico (**13**) mostrou diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ( $P=0.01$ ) com inibição do crescimento micelial de 22,86%. Os COVs ácido 3-metilbutanoico (**15**), propanoico (**6**) e ácido pentanoico (**21**) apresentaram inibição de 18,80, 5,73 e 7,08%, respectivamente (TABELA 6).

**Tabela 6** - Teste de atividade antifúngica de padrões comerciais de ácidos orgânicos frente aos fitopatógenos *C. musae* LPCC389 e *L. brasiliensis* BAN82. Os COVs foram testados individualmente durante 3 dias, em triplicatas (cada repetição uma placa). Foi usado um volume de 150  $\mu$ L de cada substância pura, exceto para o ácido 2-metilbut-2-enoico usado em uma concentração de 1 mg/mL. (NI=não inibiu).

Tratamentos	<i>C. musae</i> LPCC389		<i>L. brasiliensis</i> BAN82	
	Crescimento micelial (cm)/SD	Inibição (%)	Crescimento micelial (cm)	Inibição (%)
Controle negativo	4,66 $\pm$ 0,13		6,60 $\pm$ 0,00	NI
Ácido acético	3,06 $\pm$ 0,30	34,26		NI
Ácido propanoico	2,19 $\pm$ 0,05	53,12	6,22 $\pm$ 0,06	5,73
Ácido butanoico	1,61 $\pm$ 0,10	65,45	5,09 $\pm$ 0,87	22,86
Ácido 3-metilbutanoico	0,93 $\pm$ 0,12	80,00	5,36 $\pm$ 0,27	18,80
Ácido 2-metilbutanoico	4,46 $\pm$ 0,05	4,34	6,60 $\pm$ 0,00	NI
Ácido valérico	1,75 $\pm$ 0,43	62,51	6,13 $\pm$ 0,25	7,08
Ácido tíglico	4,55 $\pm$ 0,01	2,30	6,60 $\pm$ 0,00	NI
3-Hidroxibutanoato de etila	4,31 $\pm$ 0,13	7,56	6,60 $\pm$ 0,00	NI

Fonte: Próprio autor

**Figura 18** - Teste de atividade antifúngica de COVs padrões em placas divididas (n=3). **(A)** Inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum musae* (LPPC389). **(B)** Inibição do crescimento micelial de *Lasiodiplodia brasiliensis* (BAN82). Ácido 3-metilbutanoico (15), ácido butanoico (13), ácido valérico (21), ácido propanoico (6) e ácido acético (3).



Fonte: Próprio autor

#### 4.4 Discussão

A cepa *Bacillus* sp. LPPC170, nos testes *in vitro*, demonstrou ser capaz de controlar fitopatógenos causadores de doenças importantes da pós-colheita da banana, através da emissão de compostos orgânicos voláteis. Resultados semelhantes foram obtidos por Zheng *et al.*, 2013 onde os COVs dos antagonistas *B. pumilus* e *B. thuringiensis* tiveram êxito na inibição do crescimento micelial do patógeno *C. gloeosporioides* e na redução da severidade da doença nos frutos de manga. Os COVs de *B. subtilis* CF-3 apresentaram forte inibição contra *C. gloeosporioides* (Wang *et al.*, 2021). Espécies de *Bacillus* também tem mostrado eficiência no controle de outro patógeno importante na pós-colheita, o *Lasiodiplodia*. Os compostos não voláteis da cepa de *B. amyloliquefaciens* CGMCC 5569 expressaram forte inibição (> 70%) do crescimento micelial de espécies deste patógeno (Yuan *et al.*, 2012b).

A ação dos voláteis nos fitopatógenos foi constatada pela visualização em microscópio eletrônico de varredura (MEV) das estruturas vegetativas (hifas e micélio) dos fungos. *C. musae* LPPC389 sofreu maior dano quando exposto aos voláteis da cepa bacteriana LPPC170, o que resultou em maior nível de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno. Por outro lado, o isolado BAN82 demonstrou ser mais resistente a ação dos voláteis comparado ao LPPC389, o que reflete, igualmente no valor da inibição do crescimento micelial desse patógeno ser menor. O que pode ser observado neste estudo foi que os voláteis de *Bacillus* sp. LPPC170 são capazes de romper a parede celular dos patógenos, destruindo seu sistema de defesa e tornando-os mais vulneráveis à ação do antagonista (Zhao *et al.*, 2019).

A análise por CG-EM associada com a técnica da quimiometria possibilitou identificar os possíveis compostos responsáveis pela inibição dos patógenos. Dentre os 57 COVs identificados na cultura axênica e co-cultura do *Bacillus* sp. LPPC170 contra os dois isolados fúngicos, os ácidos carboxílicos de cadeia curta se destacaram. A eficácia da atividade antifúngica do ácido 3-metilbutanoico (**15**) contra *C. lindemuthianum* foi demonstrada em um relato de Martins *et al.* (2019). A ação do composto sintético inibiu 95 % do crescimento radial do micélio do patógeno. O ácido butanoico (**13**) também mostrou atividade antifúngica promissora contra outra espécie: o *C. lagenarium* (Liu *et al.*, 2008). O potencial antifúngico do ácido acético (**3**) contra diferentes espécies de *Colletotrichum* revelou que o mecanismo de inibição do crescimento micelial das cepas estavam relacionadas com a inibição da respiração dos micro-organismos (Kang, Park & Go., 2003). A literatura não relata sobre a ação antimicrobiana dos ácidos butanoico (**13**) e ácido 3-metilbutanoico (**15**) contra o fungo *Lasiodiplodia*, portanto, um estudo mais elaborado do sinergismo desses COVs frente a esse fitopatógeno se faz necessário.

Ácidos orgânicos de cadeia curta tem sido utilizado em estudos sobre bactérias resistentes a antibióticos, agindo sozinho como os ácidos butanoico e valérico (Kovanda *et al.*, 2019) ou associados a outras substâncias como é o caso do ácido acético (Castro *et al.*, 2019). Neste estudo foi possível observar através do MEV que os ácidos orgânicos agem rompendo a parede celular do micro-organismo. Esse mecanismo possibilita que outras substâncias tóxicas possam penetrar na célula do patógeno tornando a ação do antibiótico mais eficaz.

Em conclusão, os resultados obtidos nesse estudo revelam que os COVs emitidos pela cepa de *Bacillus* sp. LPPC170 tem potencial antifúngico frente a patógenos: *C. musae* LPPC389 e *L. brasiliensis* BAN82, agentes causais de doenças na pós-colheita da banana. Estudos mais elaborados mostraram que os principais compostos responsáveis pela inibição dos patógenos foram ácidos orgânicos de cadeia curta. Os ácido acético (**3**), ácido propanoico (**6**), ácido butanoico (**13**), ácido 3-metilbutanoico (**15**) e ácido pentanoico (**21**) exibiram forte efeito antifúngico contra a cepa *C. musae* LPPC389. Os ácido butanoico (**13**) e ácido 3-metilbutanoico (**15**) foram mais promissores contra a cepa *L. brasiliensis* BAN82. A cepa bacteriana LPPC170 apresenta um forte potencial como agente de biocontrole de doenças da pós-colheita da banana, assim como, os seus COVs podem fazer parte da constituição da formulação de produtos para o manejo dos agentes causadores da antracnose e a podridão peduncular.

## 5 CONCLUSÕES

As análises dos COVs em cultura axênica e nos experimentos de co-cultivo por microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), revelaram que o antagonista *Bacillus* sp. LPPC170, exerce influência sobre o metabolismo dos fungos fitopatogênicos através da emissão compostos orgânicos voláteis.

Para o experimento de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *F. kalimantanense* (LPPC130), o acetato de 2-metilbutanol e a 2-metil-4-metoxibenzamina secretados pelo fungo na monocultura, foram os dois compostos majoritários no co-cultivo, indicando que o fungo passou a metabolizar uma maior quantidade destes compostos como mecanismo de defesa. Por outro lado, o ácido acético, o butano-2,3-diol, o 2-furilmetanol, a heptan-2-ona, o metoxibenzeno, o 3-hidroxi-butanoato de etila, o 2-metilpropanoato de 3-metilbutila, a nonan-2-ona e o octanoato de etila, foram identificados apenas quando os dois microrganismos foram confrontados no co-cultivo.

De acordo com a análise quimiométrica por PLS-DA e *heatmap*, os constituintes de LPPC170 ácido butanoico, ácido 3-metilbutanoico, ácido pentanoico e ácido 2-metilbut-2-enoico se destacaram no co-cultivo, sugerindo que esses metabólitos estão diretamente associados na inibição do fitopatógeno.

Para o experimento de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *C. musae* LPPC389, também foram observadas diferenças no metabolismo dos micro-organismos. O ácido acético, 5-metilhexan-2-ona, pentanoato de etila, 3-hidroxi-butanoato de etila, hexanoato de etila, isobutirato de 3-metilbutila, octanoato de etila, undecan-2-ona e undecan-2-ol, foram observados apenas no experimento de co-cultivo. Os gráficos de PLS-DA e *heatmap* mostraram que os compostos Ácido 3-metilbutanoico, ácido pentanoico e ácido butanoico tiveram importante desempenho na cultura da bactéria no co-cultivo. Enquanto o composto ácido 2-metilbutanoico foi o principal composto na cultura axênica de LPPC170.

No experimento de co-cultivo entre *Bacillus* sp. LPPC170 versus *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82, observou-se a presença de 12 novos compostos no co-cultivo, principalmente da classe dos ésteres: 2-metilbutanoato de butila, acetato de 3-metilbutanol, heptan-2-ona, pentanoato de etila, propanoato de 2-metilbutila, 3-hidroxi-butanoato de etila, butanoato de 2-metilpropila, butanoato de 3-metilbutila, nonan-2-ol, benzenoato de etila e undecan-2-ol. De acordo com os resultados observados no PLS-DA e *heatmap* no co-cultivo o antagonista LPPC170 reduziu a emissão dos compostos Ácido 3-metilbutanoico e ácido



pentanoico, mas aumentou a produção do isobutirato de etila, ácido butanoico e ácido 2-metilbut-2-enoico sugerindo que a presença destes COVs estão associados a inibição do crescimento micelial do patógeno.

A microscopia de varredura eletrônica (MEV), revelou que o mecanismo de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos se dá através da desidratação e destruição do tecido celular das hifas fúngicas demonstrando que, mesmo sem o contato direto entre os micro-organismos, os COVs do antagonista exerceram um papel fundamental na atividade antifúngica.

Foram ainda realizados testes de atividades antifúngicas contra os três fitopatógenos utilizando padrões comerciais do ácido acético, ácido propanoico, ácido butanoico, ácido pentanoico, Ácido 3-metilbutanoico, ácido 2-metilbut-2-enoico, ácido 2-metilbutanoico, butano-2,3-diol e 3-hidroxibutanoato de etila. Os resultados revelaram que os ácidos acético, propanoico, butanoico, pentanoico e 3-metilbutanoico apresentaram atividade antifúngica significativa contra as espécies *F. kalimantenense* LPPC130 e *C. musae* LPPC389, onde os ácidos butanoico, valérico e isovalérico foram mais efetivos na inibição do crescimento micelial destes fitopatógenos. No entanto, apenas os ácido butanoico e 3-metilbutanoico demonstraram atividade antifúngica contra a cepa *L. brasiliensis* BAN82.

Em conclusão, podemos sugerir que a cepa de *Bacillus* sp. LPPC170 pode ser utilizada como um ativo biológico promissor para uma possível formulação de um bioproduto para controle de doenças, especialmente aquelas que afetam as cultivares de bananas durante as fases de plantio e pós-colheita. O aprofundamento do estudo da composição química de seus compostos voláteis pode nortear a formulação de produtos com atividade antifúngica, voltado para uma química verde com baixo impacto no meio ambiente.

## REFERÊNCIAS

- ALAKOMI, H. L., SKYTТА, E., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T., LATVA-KALA, K., HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 66, p. 2001-2005, 2000.
- BENEDUZI, A., AMBROSINI, A., PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 1044-1051, 2012.
- BHATTACHARYYA, P. N., JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, p. 1327-1350, 2012.
- BHUNJUN, C. S., PHUKHAMSAKDA, C., JAYAWARDENA, R. S., JEEWON, R., PROMPUTTHA, I., HYDE, K. D. Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Yunnan, v. 107, p. 107-127, 2021.
- BROWN, N. A., SCHREVEVS, S., VAN DIJCK, P., GOLDMAN, G. H. Fungal G-protein-coupled receptors: mediators of pathogenesis and targets for disease control. **Nature Microbiology**, New York, v. 3, p. 402-414, 2018.
- CAPPELLARI, R. L., CHIAPPERO, J., BANCHIO, E. Invisible signals from the underground: A practical method to investigate the effect of microbial volatile organic compounds emitted by rhizobacteria on plant growth. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, Oxford, v. 47, p. 388-393, 2019.
- CARRIÓN, V. J., PEREZ-JARAMILLO, J., CORDOVEZ, V., TRACANNA, V., DE HOLLANDER, M., RUIZ-BUCK, D., RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, New York, v. 366, p. 606-612, 2019.
- CASTRO, V. S., VIEIRA, B. S., CUNHA-NETO, A., DE SOUZA FIGUEIREDO, E. E., CONTE-JUNIOR, C. A. Acetic Acid increased the inactivation of multi-drug resistant non-typhoidal *Salmonella* by large-scaffold antibiotic. **Indian Journal of Microbiology**, New York, v. 59, p. 508-513, 2019.
- CHAVES-LÓPEZ, C., SERIO, A., GIANOTTI, A., SACCHETTI, G., NDAGIJIMANA, M., CICCARONE, C., PAPARELLA, A. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, Toronto, v. 119, p. 487-499, 2015.
- CHEN, F., WANG, M., ZHENG, Y., LI, S., WANG, H., HAN, D., GUO, S. The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and PCR-DGGE. **Current Microbiology**, New York, v. 67, p. 177-182, 2013.

CONTARINO, R., BRIGHINA, S., FALLICO, B., CIRVILLERI, G., PARAFATI, L., RESTUCCIA, C. Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. **Food Microbiology**, Londres, v. 82, p. 70-74, 2019.

DAVIES, J., DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, D.C., v. 74, p. 417-433, 2010.

ELMANAMA, A. A., ABU-DAN, R. I., EQTIFAN, R. N., SHOMAR, A. A., RIFI, M. R. Evaluation of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Al-Shifa Hospital and their susceptibility to acetic acid. **IUG Journal of Natural Studies**, Gaza, v. 27, p. 19-25, 2019.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M. C., GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, Long Island, v. 8, p. 175-185, 1998.

FADIJI, A. E., MTHIYANE, D. M. N., ONWUDIWE, D. C., BABALOLA, O. O. Harnessing the known and unknown impact of nanotechnology on enhancing food security and reducing postharvest losses: Constraints and future prospects. **Agronomy**, Basileia, v.12, p. 1-14, 2022.

FAO. Banana market review– Preliminary results 2020. Roma, 202. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>. Acesso em: 12 Julho de 2022.

FAO. Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. Rome, 2011.

FERNANDO, W. D., RAMARATHNAM, R., KRISHNAMOORTHY, A. S., SAVCHUK, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 955-964, 2005.

FERNANDO, W. D., RAMARATHNAM, R., KRISHNAMOORTHY, A. S., SAVCHUK, S. C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, Londres, v. 37, p. 955-964, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2021) Banana market review– Preliminary results. Rome, 2020. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/en/>. Accessed 12 July 2022.

GAO, H., LI, P., XU, X., ZENG, Q., GUAN, W. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 456-471, 2018.

GAO, H., XU, X., ZENG, Q., LI, P. Optimization of headspace solid-phase microextraction for GC-MS analysis of volatile compounds produced by biocontrol strain *Bacillus subtilis* CF-3 using response surface methodology. **Food Science and Technology Research**, Basileia, v. 23, p. 583-593, 2017.

GARCIA, Í. R., DE OLIVEIRA GARCIA, F. A., PEREIRA, P. S., COUTINHO, H. D. M., SIYADATPANAH, A., NOROUZI, R., RODRIGUES, F. F. G. Microbial resistance: The

role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. **Life Sciences**, New York, v. 295, p. 1-19, 2022.

GORDON, D. Viewing and editing assembled sequences using Consed. **Current Protocols in Bioinformatics**, Medford, v. 2, p. 11-43, 2003.

HASSAN, M. M., XU, Y., ZAREEF, M., LI, H., RONG, Y., CHEN, Q. Recent advances of nanomaterial-based optical sensor for the detection of benzimidazole fungicides in food: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 61, p. 1-22, 2021.

JOHNSON, M., ZARETSKAYA, I., RAYTSELIS, Y., MEREZHUK, Y., MCGINNIS, S., MADDEN, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. W5-W9, 2008.

KADO, C. I., HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KANG, H., PARK, Y., GO, S. Growth inhibition of a phytopathogenic fungus, *Colletotrichum* species by acetic acid. **Microbiological Research**, Jena, v. 158, p. 321-326, 2003.

KOVANDA, L., ZHANG, W., WEI, X., LUO, J., WU, X., ATWILL, E. R., LIU, Y. In vitro antimicrobial activities of organic acids and their derivatives on several species of gram-negative and gram-positive bacteria. **Molecules**, Basileia, v. 24, p. 3770, 2019.

LI, Z., WANG, T., HE, C., CHENG, K., ZENG, R., SONG Y. Control of Panama disease of banana by intercropping with Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottler): cultivar differences. **BMC Plant Biology**, Londres, v. 20, p. 1-13, 2020a.

LI, X., WANG, X., SHI, X., WANG, B., LI, M., WANG, Q., ZHANG, S. Antifungal effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. **Processes**, Beijing, v. 8, p. 1-14, 2020b.

LIU, S., RUAN, W., LI, J., XU, H., WANG, J., GAO, Y., WANG, J. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 166, p. 93-102, 2008.

MANI-LÓPEZ, E., GARCÍA, H. S., LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, São Paulo, v. 45, p. 713-721, 2012.

MARTINS, S. J., FARIA, A. F., PEDROSO, M. P., CUNHA, M. G., ROCHA, M. R., MEDEIROS, F. H. V. Microbial volatiles organic compounds control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, New York, v. 131, p. 36-42, 2019.

MARYANI, N., LOMBARD, L., POERBA, Y. S., SUBANDIYAH, S., CROUS, P. W., KEMA, G. H. J. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen

*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 92, p. 155-194, 2019.

MENDES, R., KRUIJT, M., DE BRUIJN, I., DEKKERS, E., VAN DER VOORT, M., SCHNEIDER, J. H., RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, Washinton D.C., v. 332, p. 1097-1100, 2011.

MOHKAM, M., NEZAFAT, N., BERENJIAN, A., MOBASHER, M. A., GHASEMI, Y. Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, recA, rpoB gene sequencing and RAPD-PCR. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, Cham, v. 8, p. 8-18, 2016.

MORATH, S. U., HUNG, R., BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, Amsterdam, v. 26, p. 73-83, 2012.

MURRAY, M. G., THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4326, 1980.

NICASTRO, R., CARILLO, P. Food loss and waste prevention strategies from farm to fork. **Sustainability**, Basileia, v. 13, p. 1-23, 2021.

NOUMAVO, P. A., AGBODJATO, N. A., BABA-MOUSSA, F., ADJANOHOON, A., BABA-MOUSSA, L. Plant growth promoting rhizobacteria: Beneficial effects for healthy and sustainable agriculture. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 15, p. 1452-1463, 2016.

PLOETZ, R. C. *Fusarium* wilt of banana. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 105, p. 1512-1521, 2015.

RAI, B., SINGH, V. N., SINGH, D. B. *Trichoderma viride* as a mycoparasite of *Aspergillus* spp. **Plant and Soil**, New York, v. 57, p. 131-135, 1980.

RATH, M., MITCHELL, T. R., GOLD, S. E. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 208, p. 76-84, 2018.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, Hoboken, v. 73, p. 363-370, 1992.

SANTOS, J. E. Á., DE BRITO, M. V., PIMENTA, A. T. Á., DA SILVA, G. S., ZOCCOLO, G. J., MUNIZ, C. R., & DA SILVA, C. F. B. Antagonism of volatile organic compounds of the *Bacillus* sp. against *Fusarium kalimantanense*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 39, p. 1-11, 2023a.

SANTOS, J. E. Á., SILVA, D. E. M., VIEIRA, R. F. B. D. S., CARVALHO, A. M. S., SCHURT, D. A., LIMA, M. A. S., SILVA, C. F. B. First report of *Fusarium kalimantanense* causing *Fusarium* wilt on banana tree in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 107, p. 227, 2022.

- SANTOS, J. E. Á., SILVA, D. E. M., VIEIRA, R. F. B. S., CORDEIRO, M. V. M., ALMEIDA, M. M. M., LIMA, M. A. S., SILVA, C. F. B. First report of *Lasiodiplodia brasiliensis* causing crown rot on banana in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, (ja), 2023b.
- SHAFI, J., TIAN, H., JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Londres, v. 31, p. 446-459, 2017.
- SHARMA, P., KUMAR, T., YADAV, M., GILL, S. S., CHAUHAN, N. S. Plant-microbe interactions for the sustainable agriculture and food security. **Plant Gene**, Amsterdam, v. 28, p. 1-14, 2021.
- SHEN, Z., RUAN, Y., CHAO, X., ZHANG, J., LI R., SHEN, Q. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression. **Biology and Fertility of Soils**, Florence, v. 51, p. 553-562, 2015.
- SHEN, Z., XUE, C., TAYLOR, P. W., OU, Y., WANG, B., ZHAO, Y., SHEN, Q. Soil pre-fumigation could effectively improve the disease suppressiveness of biofertilizer to banana *Fusarium* wilt disease by reshaping the soil microbiome. **Biology and Fertility of Soils**, Florence, v. 54, p. 793-806, 2018.
- SHEN, Z., ZHONG, S., WANG, Y., WANG, B., MEI, X., LI, R., RUAN, Y., SHEN, Q., Induced soil microbial suppression of banana *Fusarium* wilt disease using compost and biofertilizers to improve yield and quality. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 57, p. 1-8, 2013.
- SPAGNOL, W. A., SILVEIRA JUNIOR, V., PEREIRA, E., GUIMARÃES FILHO, N. Reducing losses in the fruit and vegetable chains by the analysis of shelf-life dynamics. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.21, p. 1-10, 2018.
- SU, Y. Y., NOIREUNG, P., LIU, F., HYDE, K. D., MOSLEM, M. A., BAHKALI, A. H., CAI, L. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. **Mycoscience**, Tokyo, v. 52, p. 376-382, 2011.
- TAHIR, H. A. S., GU, Q., WU, H., NIU, Y., HUO, R., GAO, X. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, p. 1-15, 2017.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS D.G., GIBSON, T.J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- VILAPLANA, R., HURTADO, G., VALENCIA-CHAMORRO, S. Hot water dips elicit disease resistance against anthracnose caused by *Colletotrichum musae* in organic bananas (*Musa acuminata*). **LWT**, Londres, v. 95, p. 247-254, 2018.

WANG, B., YUAN, J., ZHANG, J., SHEN, Z., ZHANG, M., LI, R., & SHEN, Q. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. **Biology and Fertility of Soils**, Florence, v. 49, p. 435-446, 2013.

WANG, K., QIN, Z., WU, S., ZHAO, P., ZHEN, C., GAO, H. 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**, Washington D.C., v. 69, p. 5267-5278, 2021.

WARNER, S. A. J. **Genomic DNA isolation and lambda library construction**. Plant gene isolation: principles and practice, 1. ed. Wiley & Sons, New York, p. 51-53, 1996.

YUAN, J., RAZA, W., SHEN, Q., HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D.C., v. 78, p. 5942-5944, 2012a.

YUAN, B., WANG, Z., QIN, S., ZHAO, G. H., FENG, Y. J., WEI, L. H., JIANG, J. H. Study of the anti-sapstain fungus activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 associated with *Ginkgo biloba* and identification of its active components. **Bioresource Technology**, Barking, v. 114, p. 536-541, 2012b.

ZHAO, P., LI, P., WU, S., ZHOU, M., ZHI, R., GAO, H. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested litchi fruits. **AMB Express**, Münster, v. 9, p. 1-13, 2019.

ZHENG, M., SHI, J., SHI, J., WANG, Q., LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, Orlando, v. 65, p. 200-206, 2013.

ZHOU, Y., LIU, Y., LV, Q. Suspensions derived from anaerobically fermented tilapia offal inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in banana. **Agricultural Sciences**, [S. l] v. 9, p. 1506-1515, 2018.

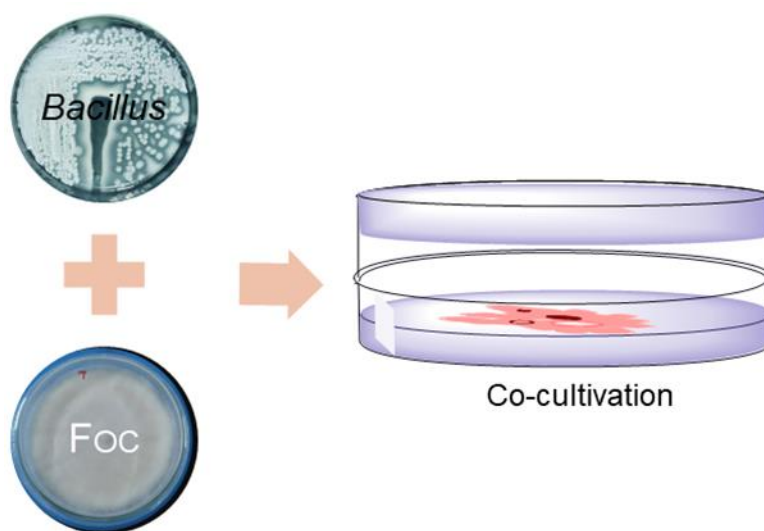
## ANEXO A – PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

**Tabela 1** - Efeito antagonístico dos COVs de diferentes cepas bacterianas contra o crescimento micelial de *F. kalimantanense* LPPC130 em testes *in vitro*. Os dados são a média aritmética de três repetições com  $\pm$  desvio padrão (SD). As médias de inibição do crescimento radial do micélio apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste Fischer LSD ( $P>0,05$ ).

Tratamentos	Antagonismo		
	Crescimento micelial de <i>F. kalimantanense</i> (mm)	Inibição (%)	Teste Fisher LSD
LPPC130*	76.49 $\pm$ 2.38		
LPPC 242	51.82 $\pm$ 6.79	32.25	<0.0001
LPPC 247	42.39 $\pm$ 1.55	44.58	<0.0001
LPPC 265	42.47 $\pm$ 1.12	44.48	<0.0001
LPPC 272	44.24 $\pm$ 2.46	42.16	<0.0001
LPPC 170	40.80 $\pm$ 2.07	46.66	<0.0001
LPPC 172	50.65 $\pm$ 3.47	33.78	<0.0001
LPPC 259	55.24 $\pm$ 3.54	27.78	<0.0001
LPPC 262	51.87 $\pm$ 3.45	32.19	<0.0001
LPPC 189	55.15 $\pm$ 2.83	27.90	<0.0001
LPPC 134	62.41 $\pm$ 4.26	18.41	<0.0012

\* Controle negativo  
Fonte: Próprio autor

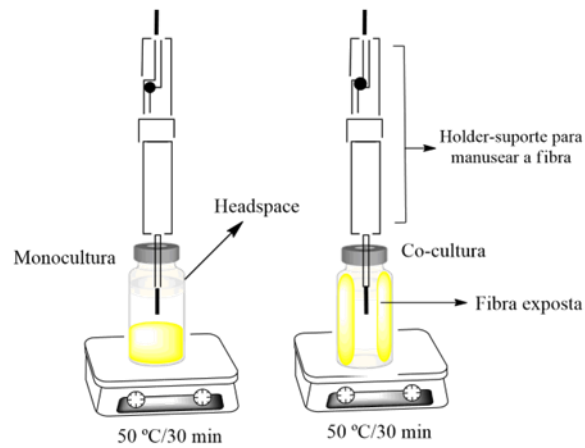
**Figura 1** - Análise do efeito antagonista dos COVs de *Bacillus* sp. (LPPC170) contra o fitopatógeno LPPC130 em experimentos de co-cultivo pelo método de dupla placa.



Fonte: Próprio autor

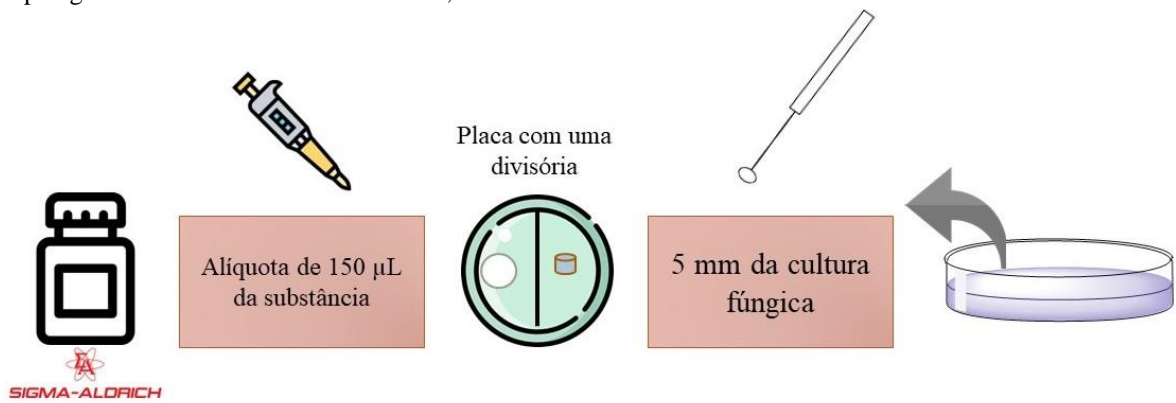


**Figura 2** - Coleta de COVs em *headspace* em cultura axênica e co-cultura.



Fonte: Próprio autor

**Figura 3** – Esquema da metodologia do teste de atividade antimicrobiana dos COVs comerciais contra os fitopatógenos *F. kalimantanense* LPPC130, *C. musae* LPPC389 e *L. brasiliensis* BAN82.



Fonte: Próprio autor

ANEXO B – ESPECTROS DE MASSAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS  
VOLÁTEIS IDENTIFICADOS DE *BACILLUS* SP. LPPC170, *C. MUSA* LPPC389 E *L.*  
*BRASILIENSES* BAN82

Figura 1 - Espectro de massas de (*E*)-penta1,3-dieno.

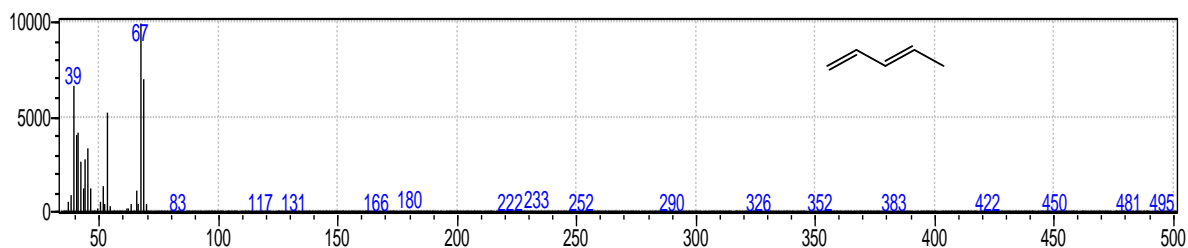


Figura 2 - Espectro de massas de acetato de etila.

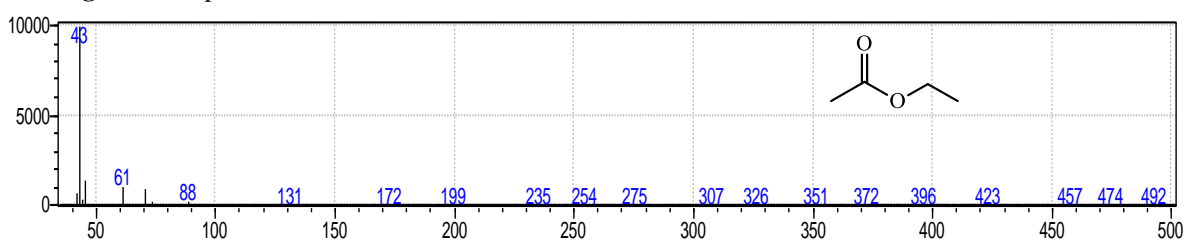


Figura 3 - Espectro de massas de ácido acético.

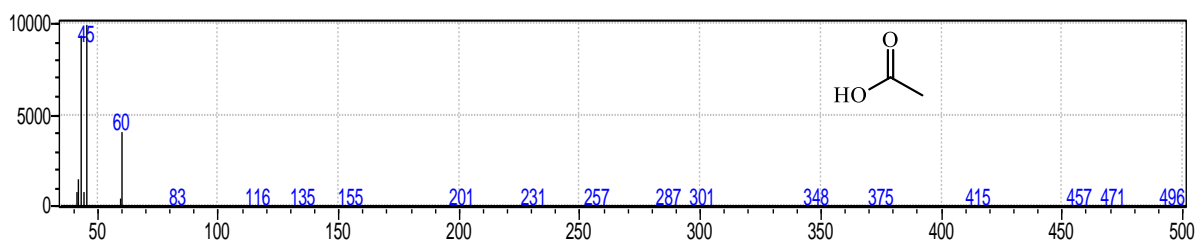


Figura 4 - Espectro de massas de 2-metilpropanol.

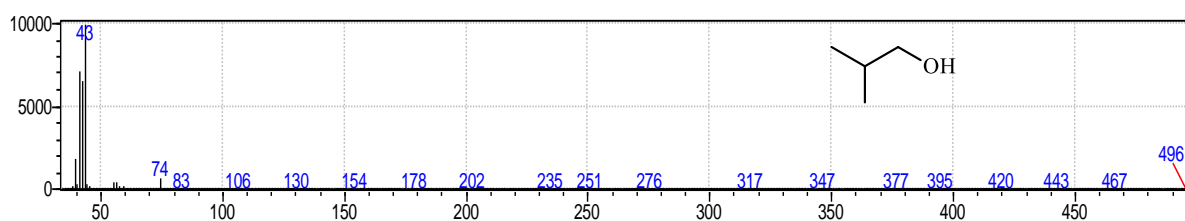
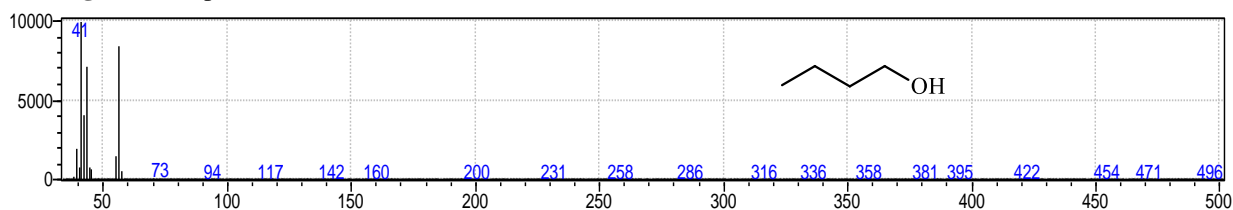
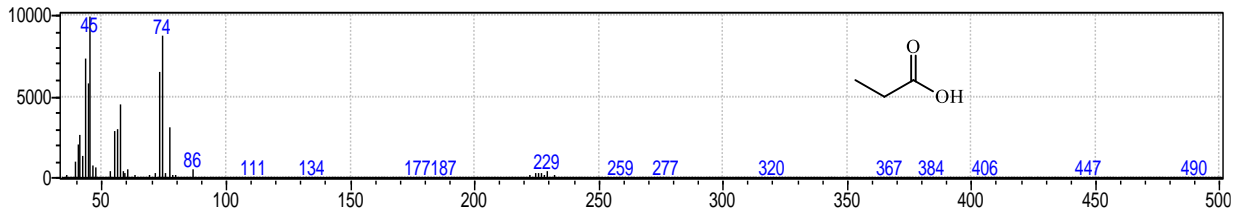
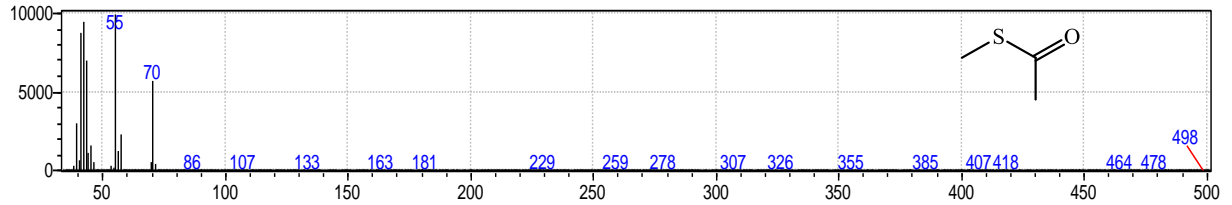
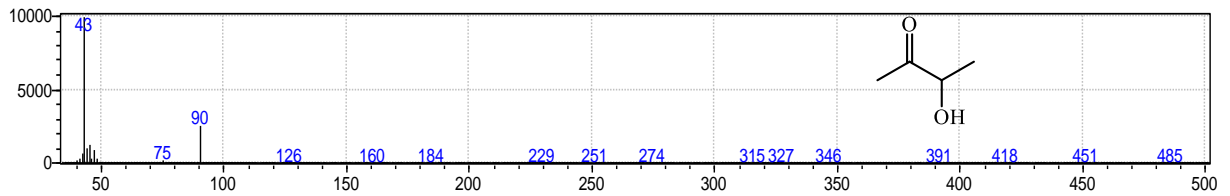
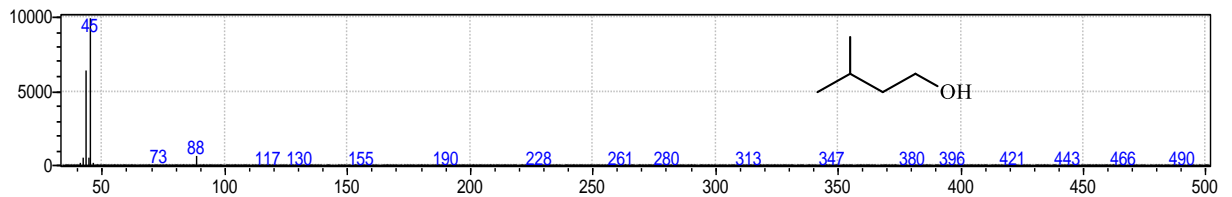
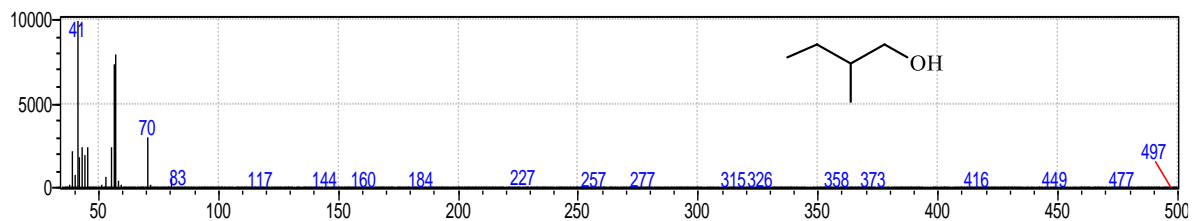
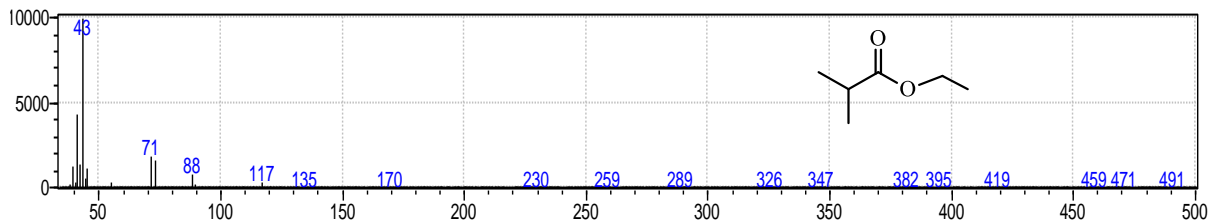
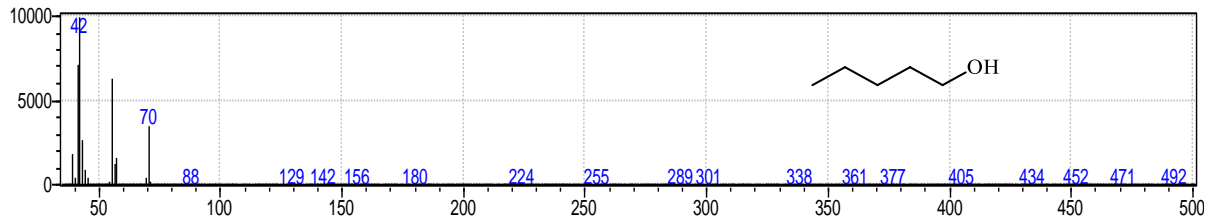
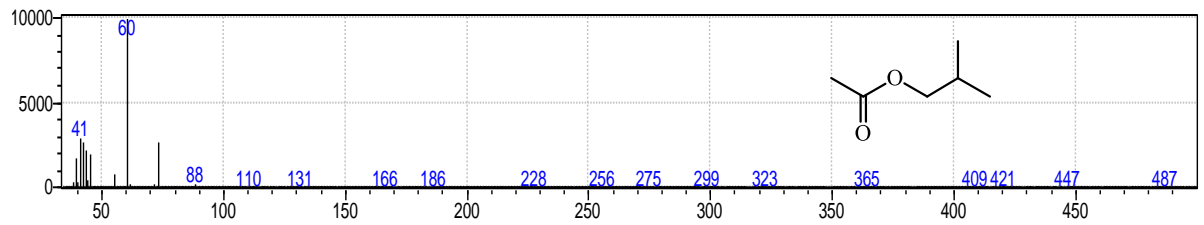
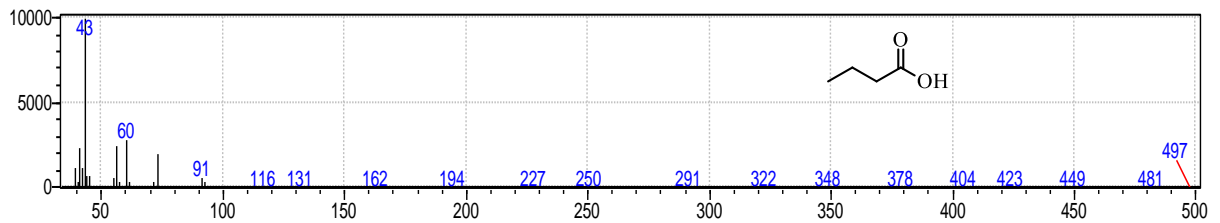
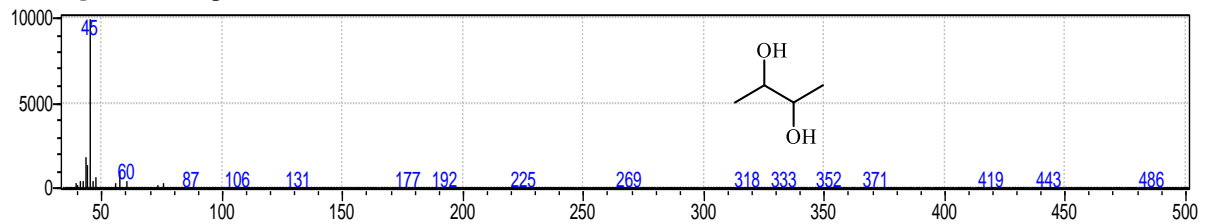
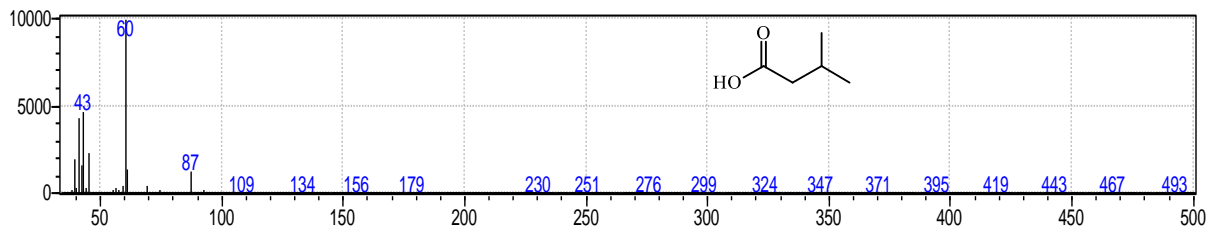
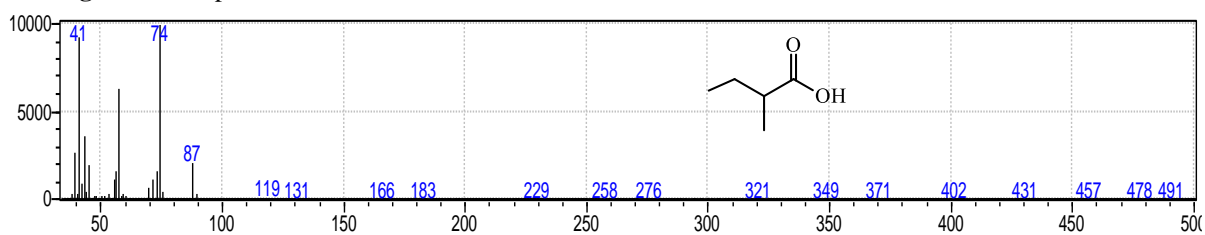
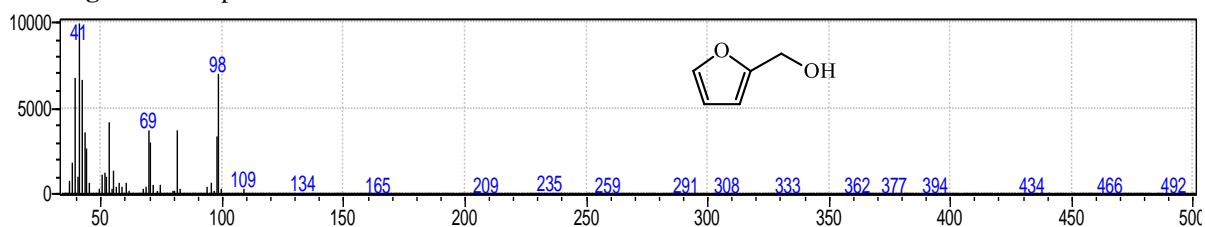
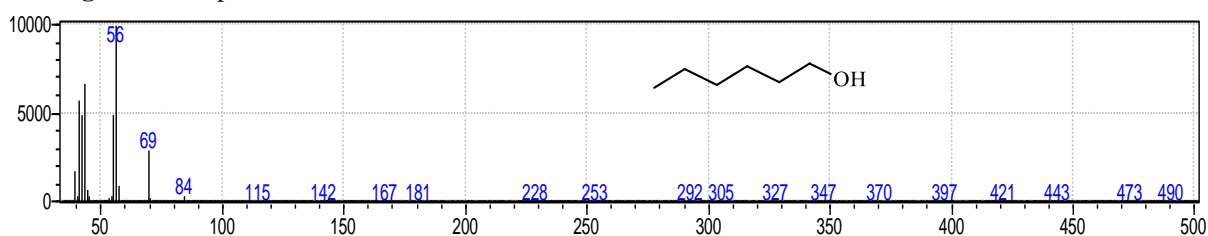
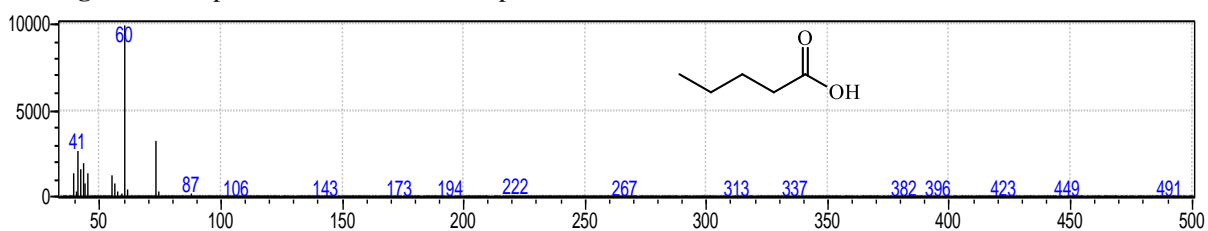
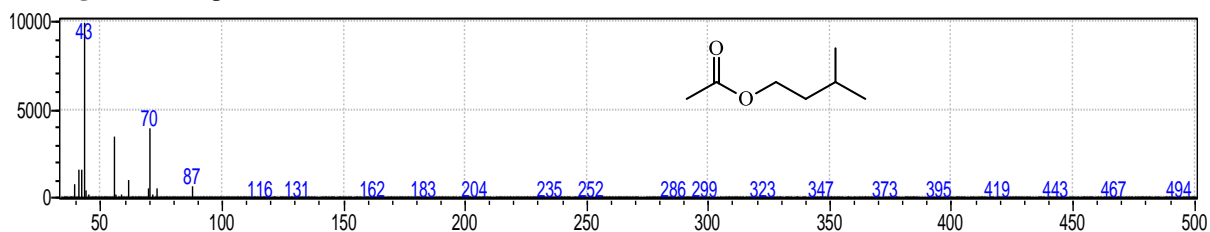
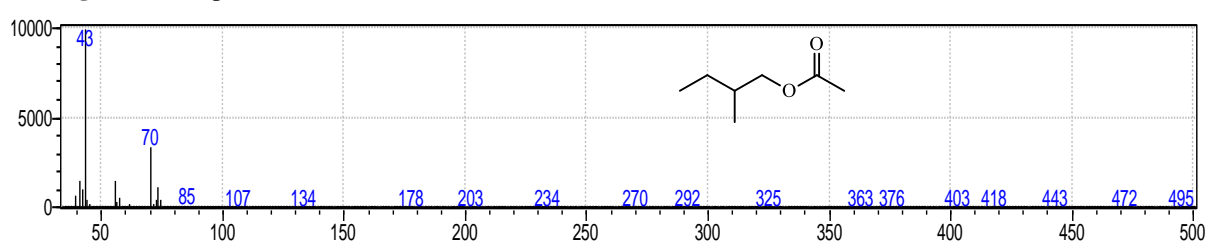


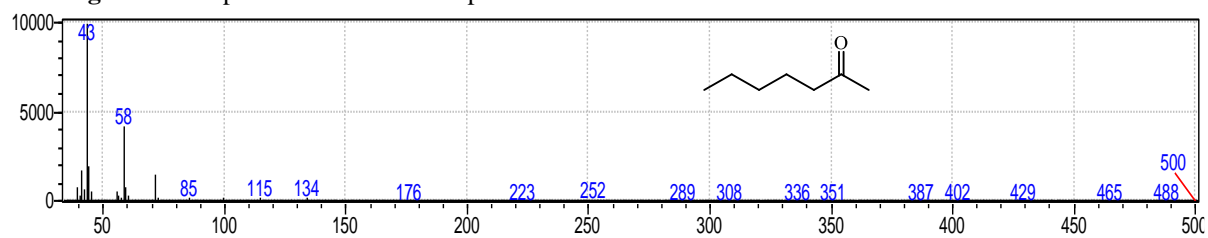
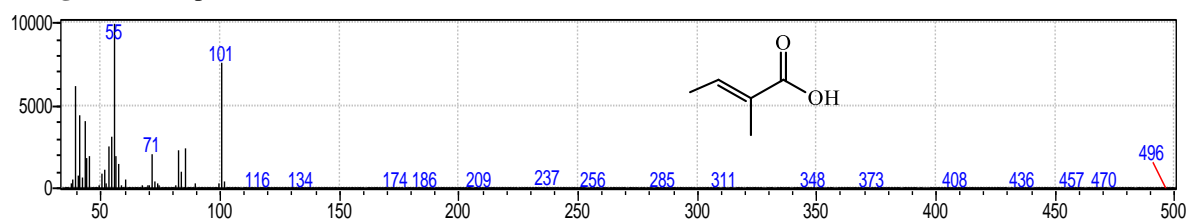
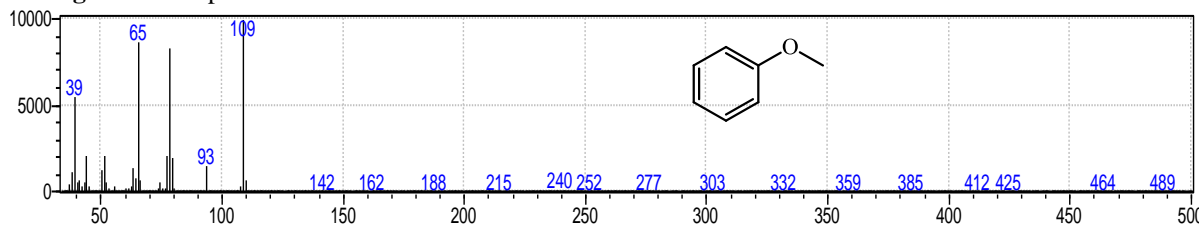
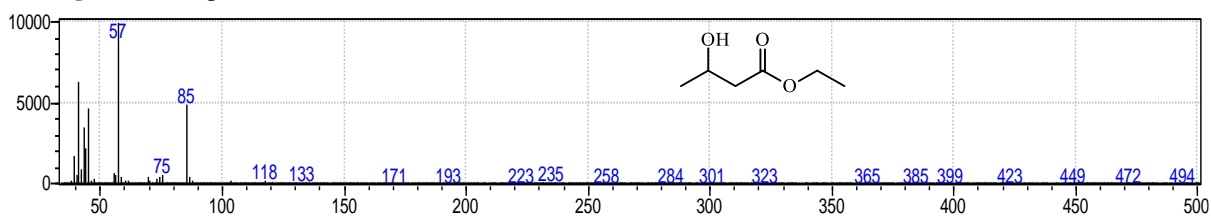
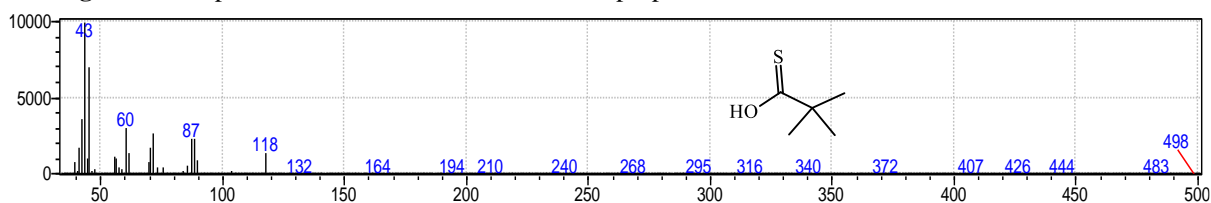
Figura 5 - Espectro de massas de butanol.

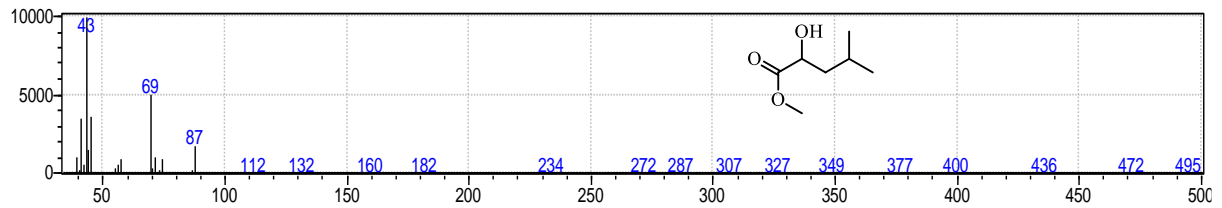
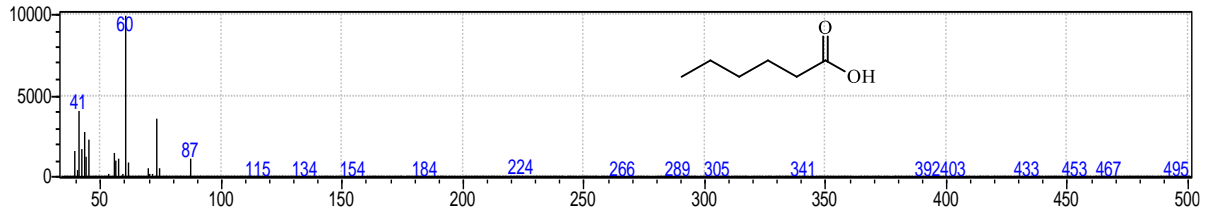
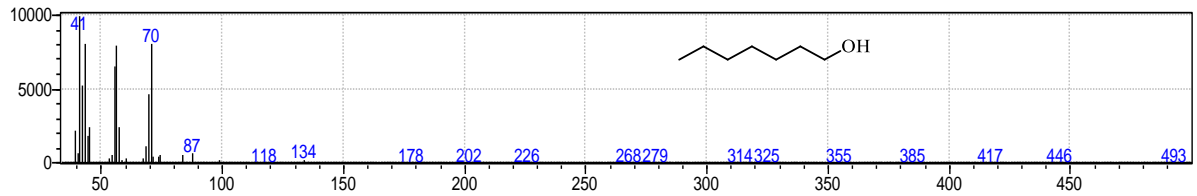
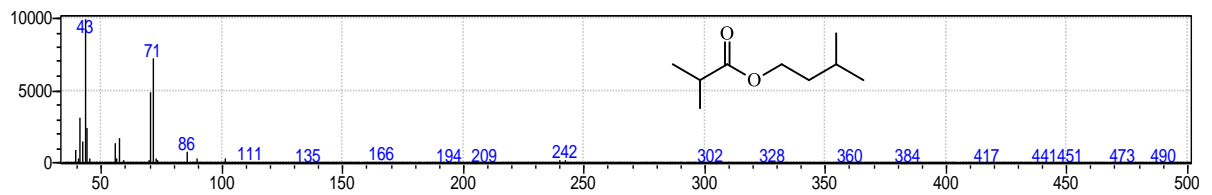
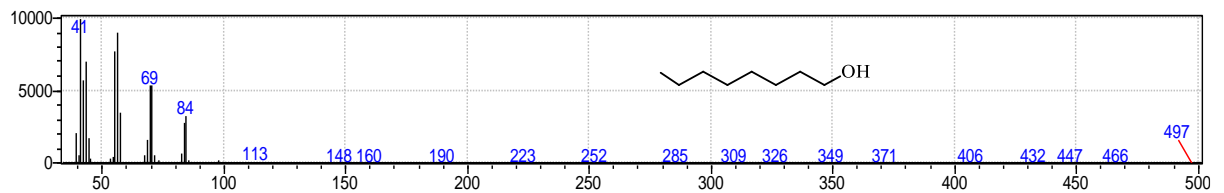
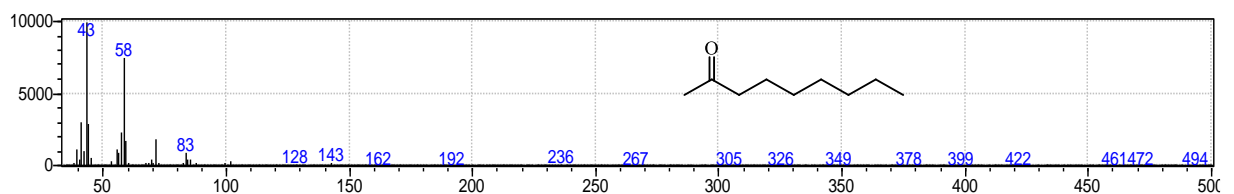


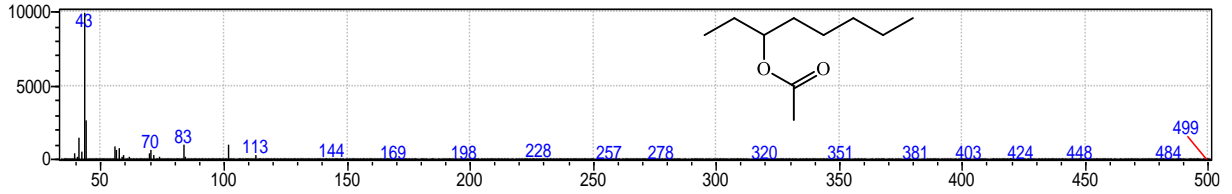
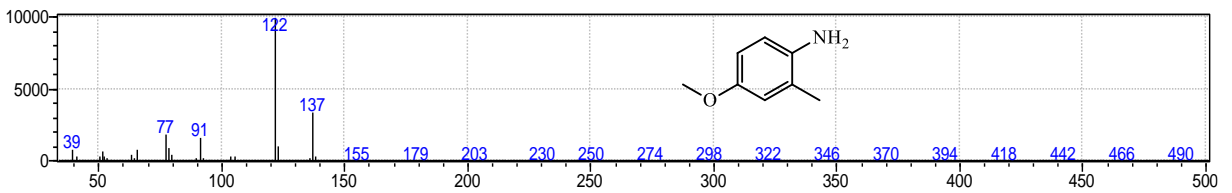
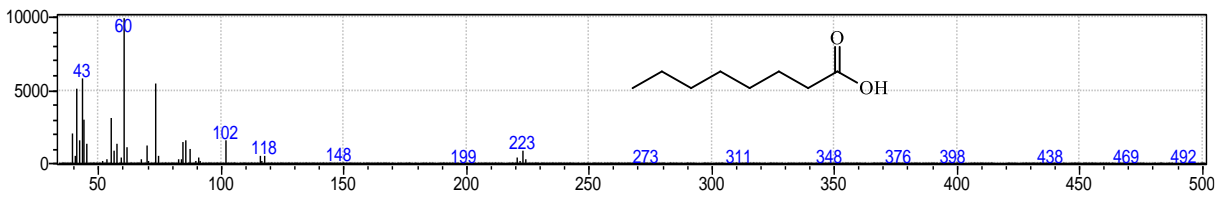
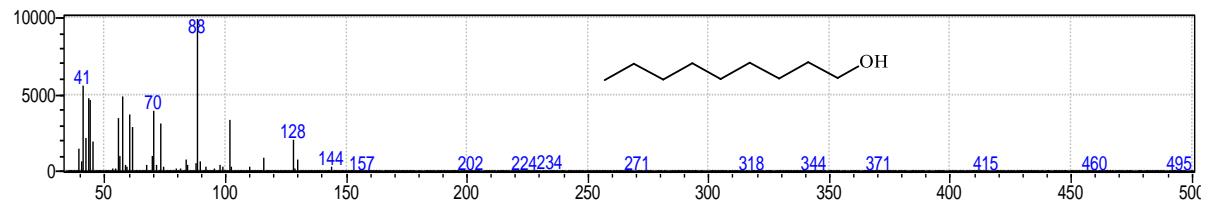
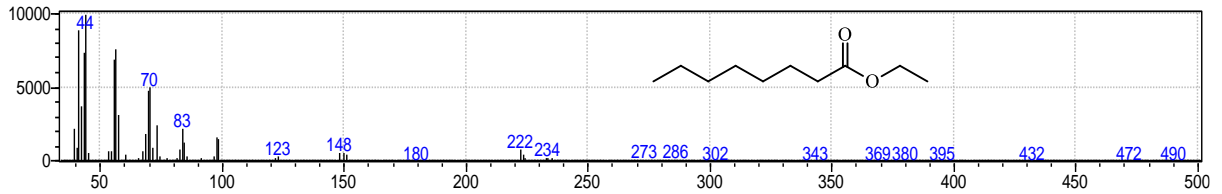
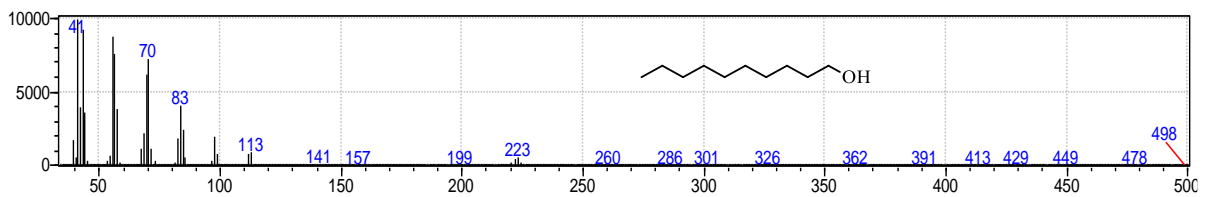
**Figura 6** - Espectro de massas do ácido propanoico.**Figura 7** - Espectro de massas de tioacetato de metila.**Figura 8** - Espectro de massas de 3-hidroxiбутан-2-ona.**Figura 9** - Espectro de massas de 3-metilbutanol.**Figura 10** - Espectro de massas de 2-metilbutanol.**Figura 11** - Espectro de massas de isobutirato de etila.

**Figura 12** - Espectro de massas de pentanol.**Figura 13** - Espectro de massas de acetato de isobutila.**Figura 14** - Espectro de massas do ácido butanoico.**Figura 15** - Espectro de massas de butano-2,3-diol.**Figura 16** - Espectro de massas do Ácido 3-metilbutanoico.

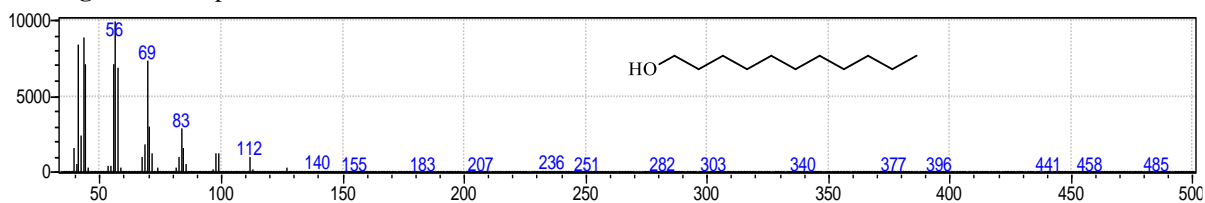
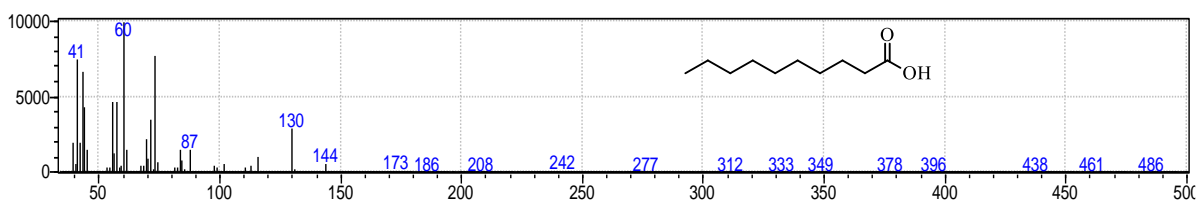
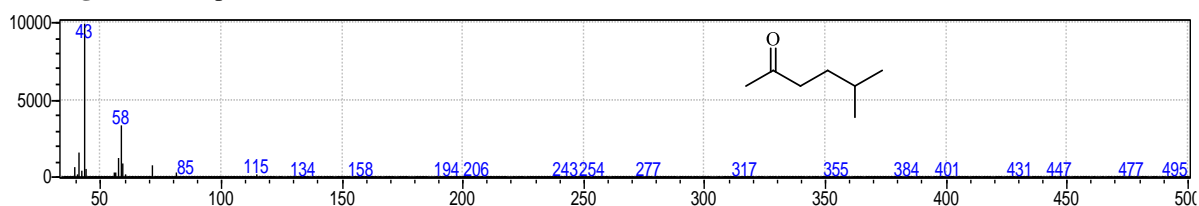
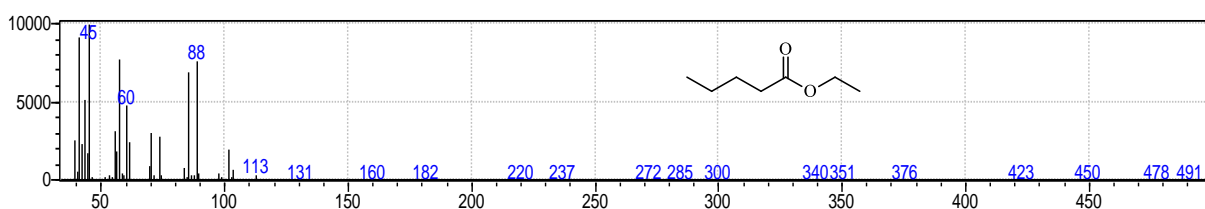
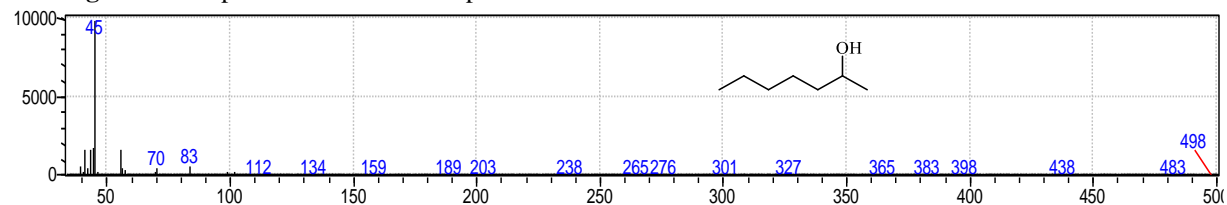
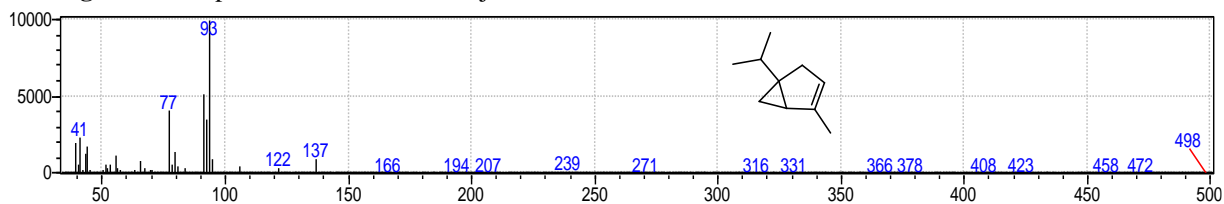
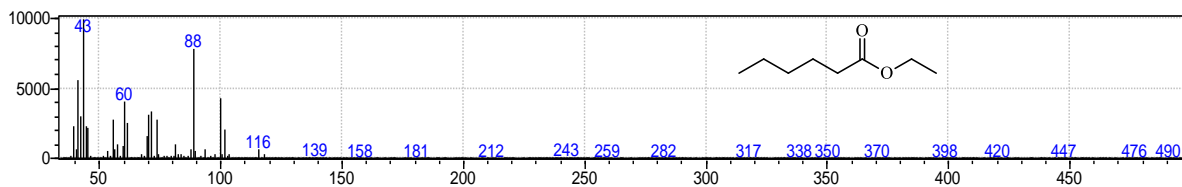
**Figura 17** - Espectro de massas do ácido 2-metilbutanóico.**Figura 18** - Espectro de massas do 2-furilmetanol.**Figura 19** - Espectro de massas do hexanol.**Figura 20** - Espectro de massas do ácido pentanoico.**Figura 21** - Espectro de massas de acetato de 3-metilbutila.**Figura 22** - Espectro de massas de acetato de 2-metilbutila.

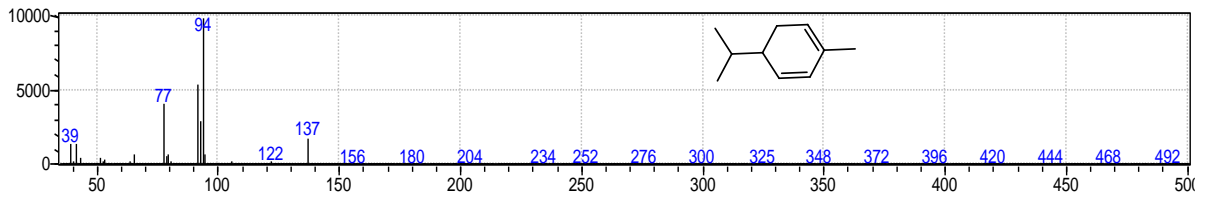
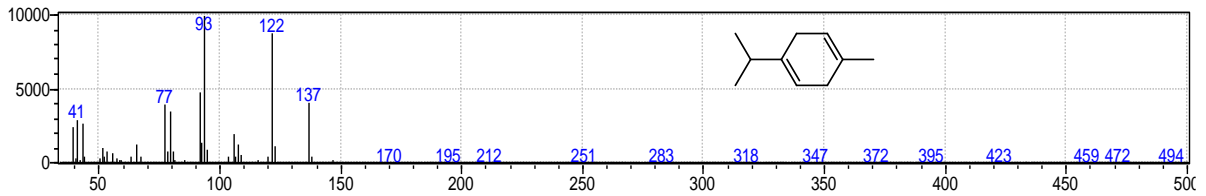
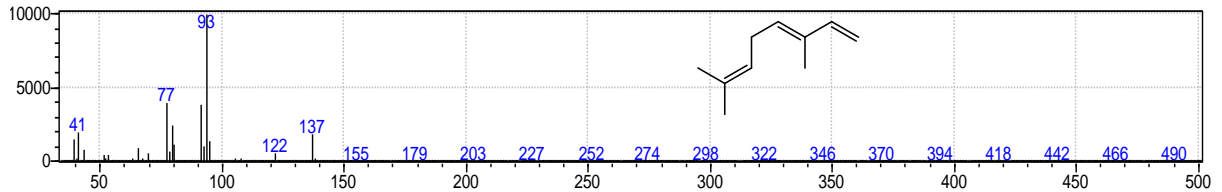
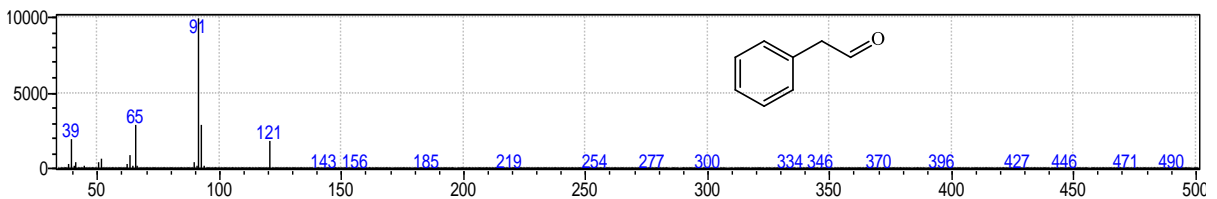
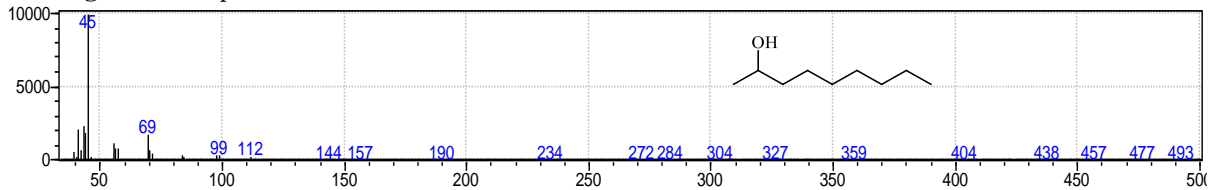
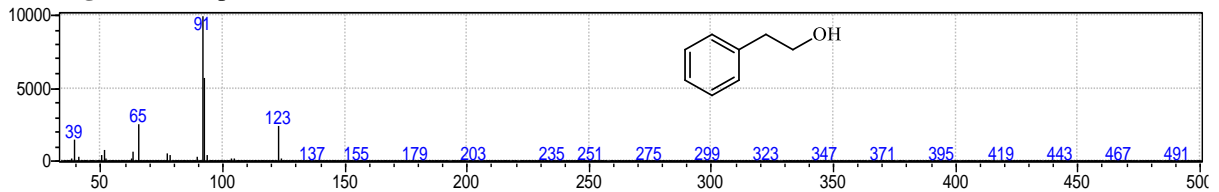
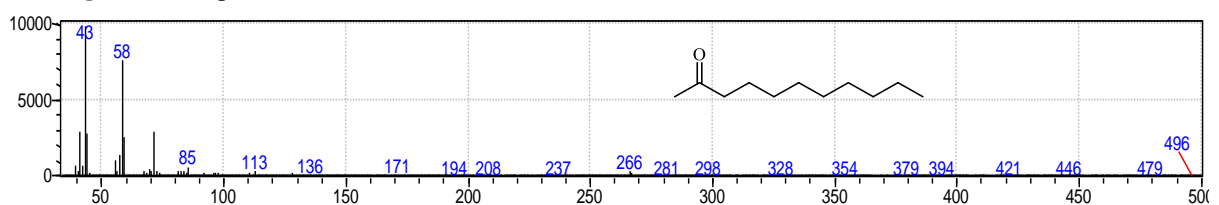
**Figura 23** - Espectro de massas de heptan-2-ona.**Figura 24** - Espectro de massas do ácido 2-metilbut-2-enoico.**Figura 25** - Espectro de massas do metoxibenzeno.**Figura 26** - Espectro de massas de 3-hidroxibutanoato de etila.**Figura 27** - Espectro de massas de ácido 2,2-dimetilpropanoico.

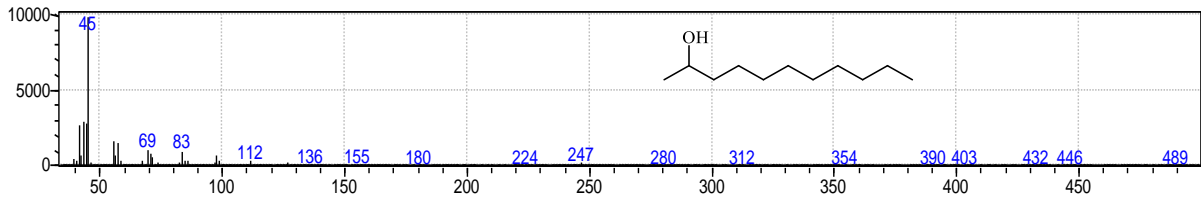
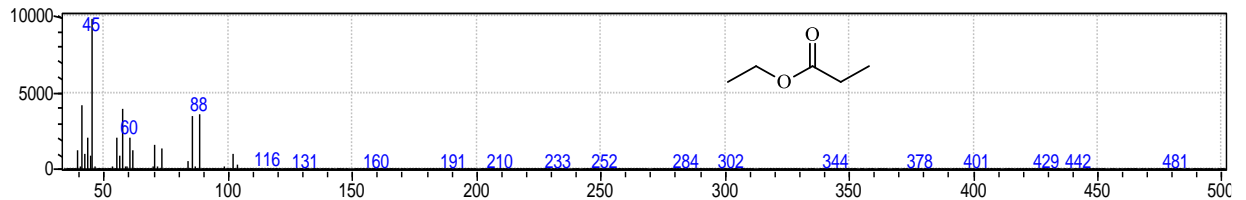
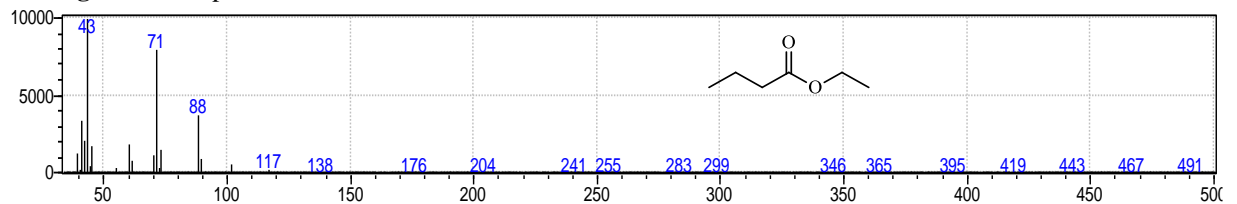
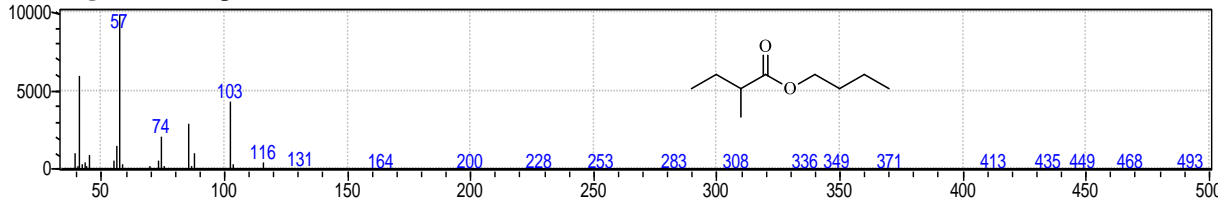
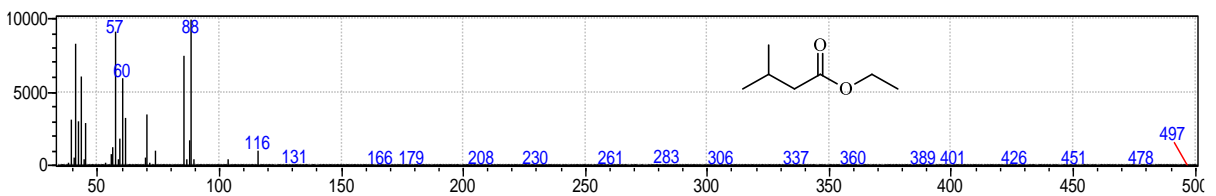
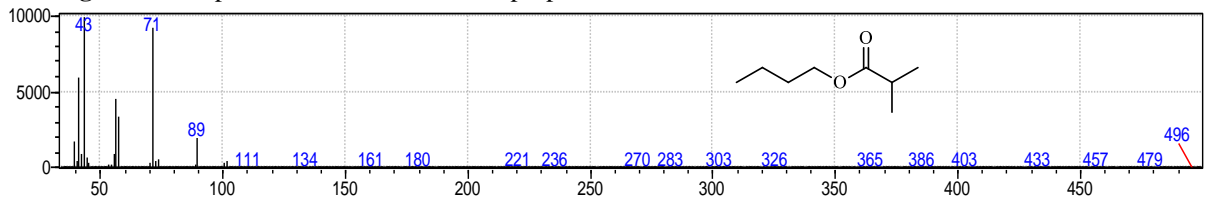
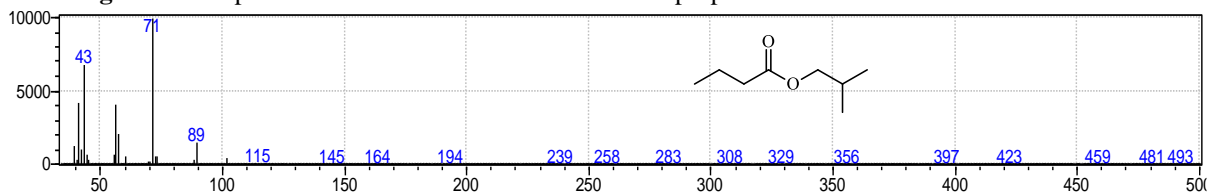
**Figura 28** - Espectro de massas de 2-hidroxi-4-metilpentanoato de metila.**Figura 29** - Espectro de massas do ácido hexanóico.**Figura 30** - Espectro de massas do heptanol.**Figura 31** - Espectro de massas de 2-metilpropanoato de 3-metilbutila.**Figura 32** - Espectro de massas do octanol.**Figura 33** - Espectro de massas do nonan-2-ona.

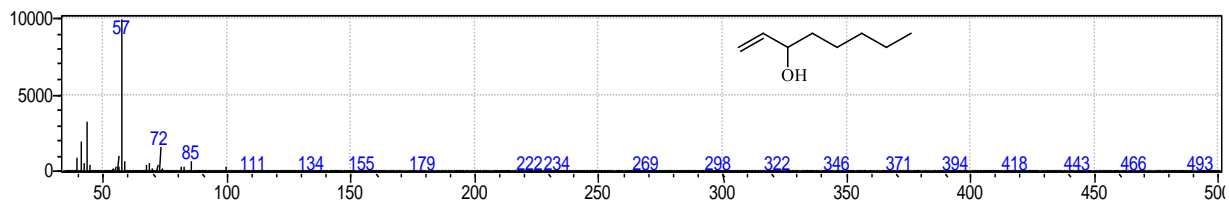
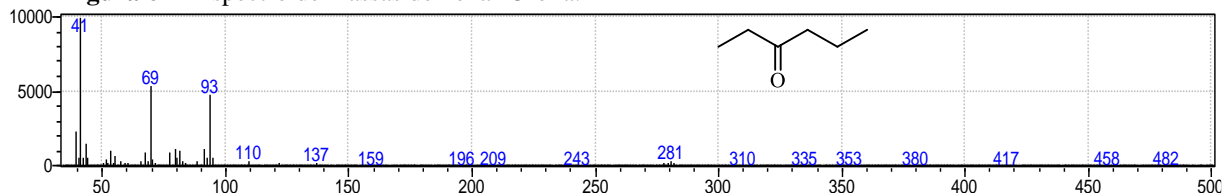
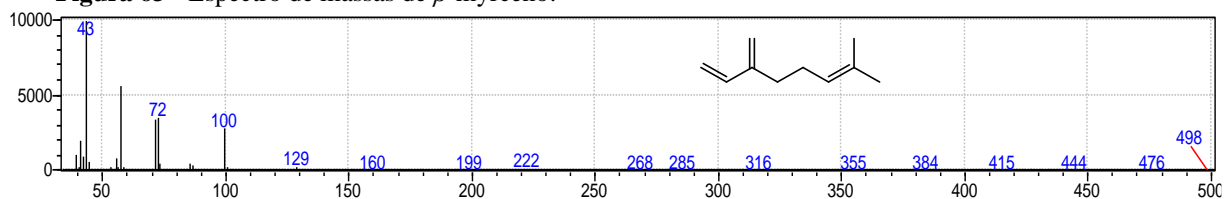
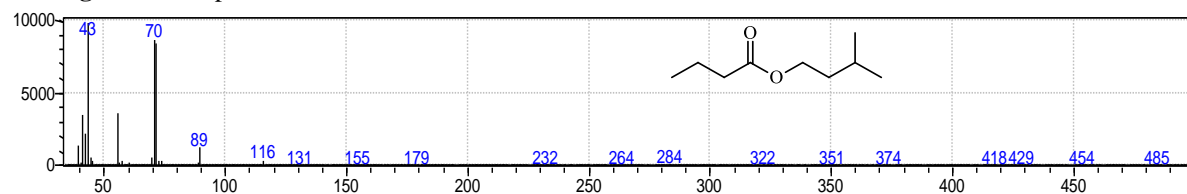
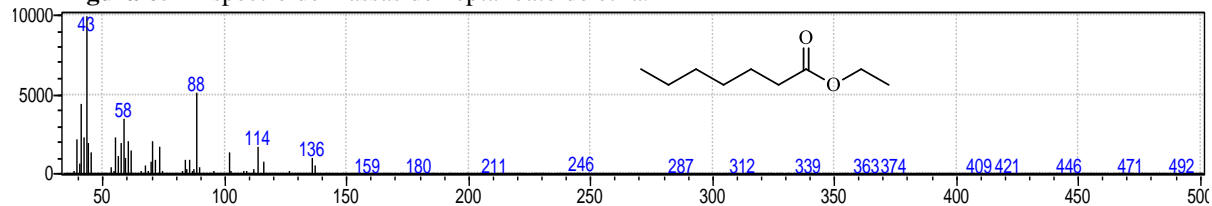
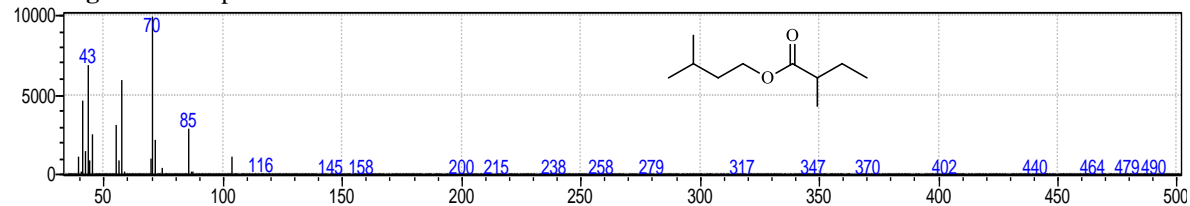
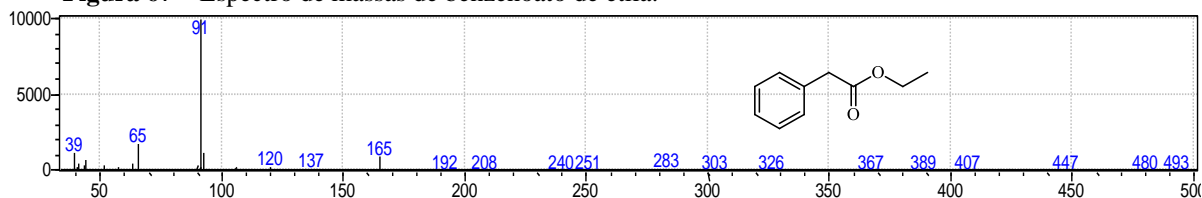
**Figura 34** - Espectro de massas de acetato de 3-octila.**Figura 35** - Espectro de massas de 2-metil-4-metoxi-benzenamina.**Figura 36** - Espectro de massas do ácido octanoico.**Figura 37** - Espectro de massas de nonanol.**Figura 38** - Espectro de massas de octanoato de etila.**Figura 39** - Espectro de massas de decanol.



**Figura 40** - Espectro de massas de undecanol.**Figura 41** - Espectro de massas do ácido decanoico.**Figura 42** - Espectro de massas de 5-metilhexan-2-ona.**Figura 43** - Espectro de massas de pentanoato de etila.**Figura 44** - Espectro de massas de heptan-2-ol.**Figura 45** - Espectro de massas de  $\alpha$ -tujeno.**Figura 46** - Espectro de massas de hexanoato de etila.

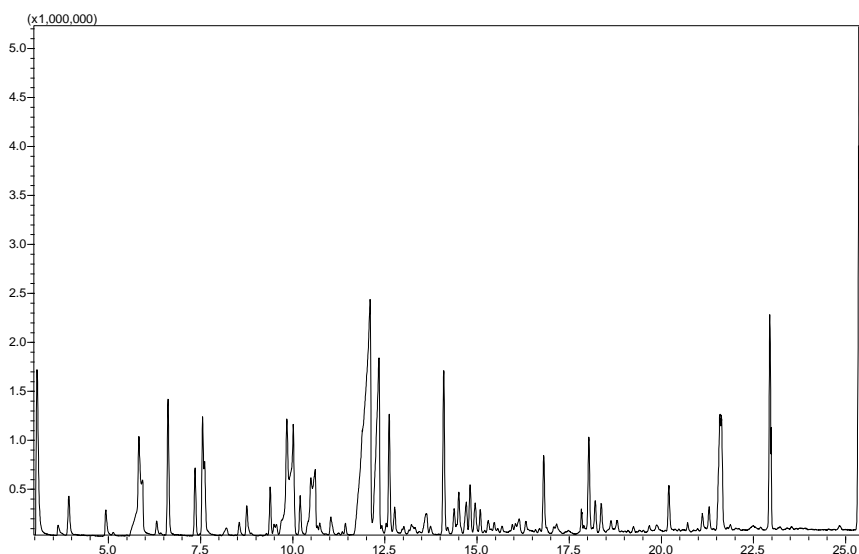
**Figura 47** - Espectro de massas de  $\alpha$ -felandreno.**Figura 48** - Espectro de massas de  $\gamma$ -terpineno.**Figura 49** - Espectro de massas de *trans*- $\beta$ -ocimeno.**Figura 50** - Espectro de massas de benzeno acetaldeído.**Figura 51** - Espectro de massas de nonan-2-ol.**Figura 52** - Espectro de massas de álcool fenilético.**Figura 53** - Espectro de massas de undecan-2-ona.

**Figura 54** - Espectro de massas de undecan-2-ol.**Figura 55** - Espectro de massas de propanoato de etila.**Figura 56** - Espectro de massas de butanoato de etila.**Figura 57** - Espectro de massas de 2-metilbutanoato de butila.**Figura 58** - Espectro de massas de 3-metilbutanoato de etila.**Figura 59** - Espectro de massas de 2-metilpropanoato de butila.**Figura 60** - Espectro de massas de butanoato de 2-metilpropila.

**Figura 61** - Espectro de massas de octen-3-ol.**Figura 62** - Espectro de massas de hexan-3-ona.**Figura 63** - Espectro de massas de  $\beta$ -myrceno.**Figura 64** - Espectro de massas de butanoato de 3-metilbutila.**Figura 65** - Espectro de massas de heptanoato de etila.**Figura 66** - Espectro de massas de 2-metilbutanoato de 3-metilbutila.**Figura 67** - Espectro de massas de benzenoato de etila.

## ANEXO C – PERFIS CROMATOGRÁFICO DAS ANÁLISES DE COVs POR GCMS

**Figura 1** - Perfil cromatográfico da análise dos COVs de *Bacillus* sp. LPPC170 em meio de cultura 523 por CG-EM.



Fonte: Próprio autor

**Tabela 1** - Tabela de identificação dos COVs de *Bacillus* sp. LPPC170.

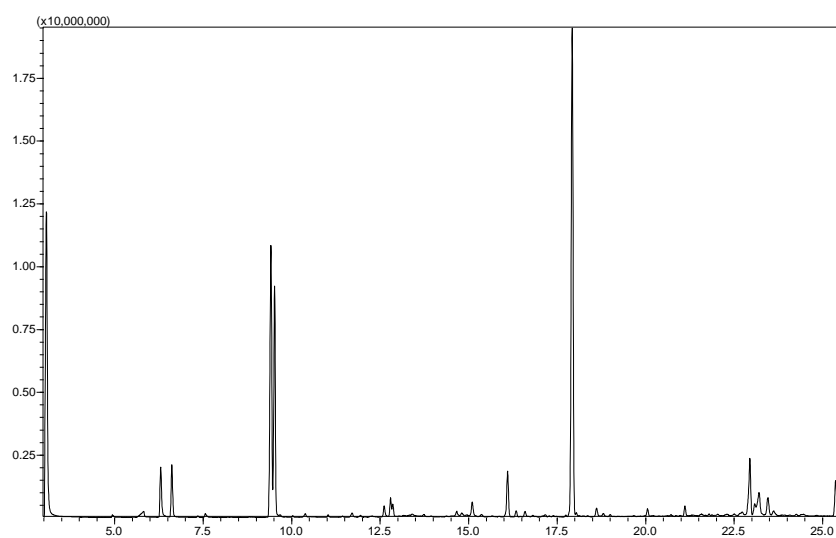
RT	Name	Formula	*CAS	*KI	KI. Lit	Area % *SD
3.92	Penta-2,3-diene, (E)-	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	2004-70-8			1.87 ±0.31
6.30	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	612	612	0.54 ±0.08
6.51	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	79-83-1	626	625	6.66 ±0.73
7.55	1-Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	71-36-3	664	664	3.26 ±0.15
8.19	Propanoic acid	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	79-09-4	687	693	0.47 ±0.04
8.55	Methyl thiolacetate	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS	1534-08-3	699	701	0.55 ±0.07
8.76	Acetoin	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	513-86-0	708	708	1.56 ±0.09
9.38	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	735	735	2.3 ±0.59
9.49	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	1565-80-6	739	738	0.20 ±0.05
9.55				742		0.28 ±0.03
9.95	Ethyl isobutyrate	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	97-62-1	760	758	4.83 ±0.97
10.20	1-Pentanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	71-41-0	768	768	1.77 ±0.12
10.497				779		1.48 ±0.30
10.60	Butanoic acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	107-92-6	782	783	2.16 ±0.71
10.73				787		0.39 ±0.09
12.09	Butanoic acid, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	504-74-2	847	845	20.94 ±1.72
12.33	Butanoic acid, 2-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	117-53-0	857	857	14.89 ±2.65
12.53				866		0.17 ±0.07
12.61	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	111-27-3	869	869	5.51 ±0.42

RT	Name	Formula	*CAS	*KI	KI. Lit	Area % *SD
12.76	Pentanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	109-52-4	875	878	1.02 ±0.13
13.61	Tiglic acid	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	81-59-1	912	912	1.43 ±0.28
14.20				943		0.16 ±0.01
14.38	Thiopivalic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> OS	55561-02-9	951	959	0.88 ±0.13
14.50	methyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	40348-72-9	957	966	1.45 ±0.28
14.71	Hexanoic acid	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	142-62-1	967	965	1.70 ±0.09
14.81	1-Heptanol	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	111-70-6	972	972	2.26 ±0.15
15.47				1002		0.39 ±0.03
15.96				1029		0.18 ±0.01
16.32				1049		0.48 ±0.01
16.81	1-Octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	111-87-5	1074	1074	3.82 ±0.27
18.20				1151		2.03 ±0.51
18.37	Octanoic acid	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	124-07-2	1161	1161	1.51 ±0.14
18.63	1-Nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	143-08-8	1176	1174	0.30 ±0.05
19.87				1257		0.61 ±0.01
20.20	1-Decanol	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O	112-30-1	1280	1275	2.58 ±0.61
21.11	1-Undecanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O	112-42-5	1353	1356	0.85 ±0.36
21.29	n-Decanoic acid	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	334-48-5	1369	1369	1.51 ±0.49

\*CAS: Chemical Abstracts Service; \*KI: Kovats retention indices; \*SD: Standard deviation

Fonte: Próprio autor

**Figura 2** - Perfil cromatográfico da análise dos COVs de *Fusarium kalimantanense* LPPC130 em meio de cultura 523 por CG-EM.



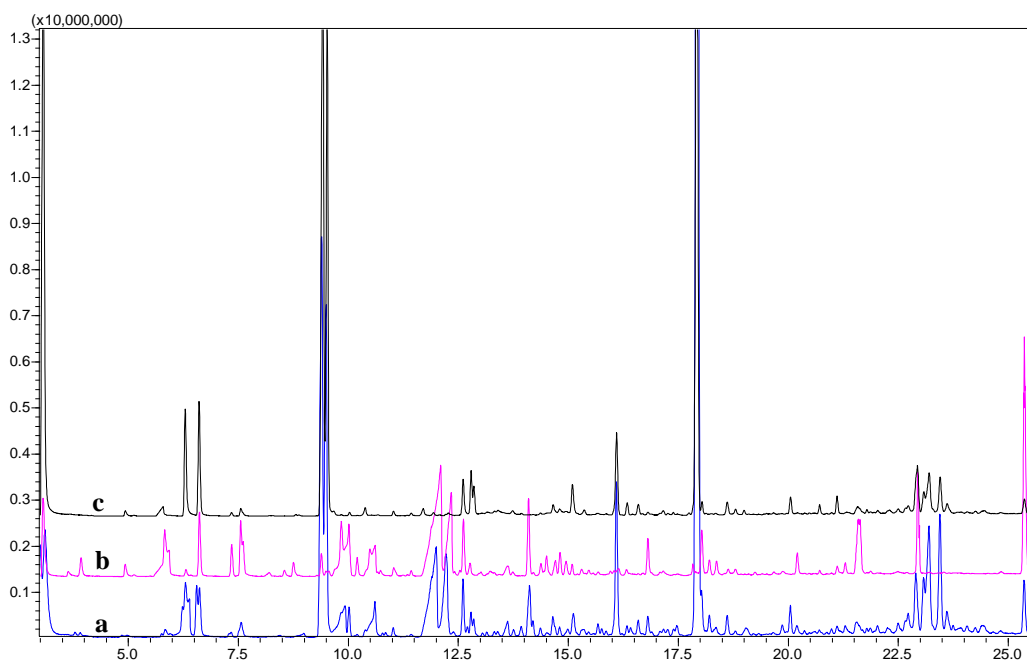
Fonte: Próprio autor

**Tabela 2** - Tabela de identificação dos COVs de *Fusarium kalimantanense* LPPC130.

RT	Name	Formula	CAS	KI	KL Lit	Area % SD
6.29	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	612	612	4.14 ±0.47
6.61	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	78-83-1	626	625	3.67 ±0.58
9.41	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	736	735	21.17 ±2.43
9.51	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	1565-80-6	740	740	13.97 ±1.82
10.38	Isobutyl acetate	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	110-19-0	775	771	0.3 ±0.05
11.71	Butanoic acid, 3-methyl	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	503-74-2	829	831	0.39 ±0.13
12.61	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	111-27-3	869	869	1.05 ±0.23
12.79	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	123-92-2	877	878	0.82 ±0.13
12.85	1-Butanol, 2-methyl-, acetate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	624-41-9	879	879	0.35 ±0.07
14.80	1-Heptanol	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	111-70-6	971	971	0.14 ±0.02
16.09				1037		3.54 ±0.24
16.34				1049		0.48 ±0.02
16.59				1063		0.48 ±0.14
17.74	3-Octanol, acetate	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	4864-61-3	1125	1123	0.14 ±0.02
17.92	Benzenamine, 4-methoxy-2-methyl-	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	102-50-1	1135		42.24 ±3.64
18.61				1175		0.55 ±0.05
18.99	Octanoic acid, ethyl ester	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	106-32-1	1196	1196	0.18 ±0.08
20.05				1270		0.54 ±0.08
21.10				1353		1.09 ±0.61
21.29				1368		0.16 ±0.08
22.50				1483		0.13 ±0.02
22.72				1506		0.25 ±0.13
23.08				1545		0.37 ±0.03
23.20				1558		1.48 ±0.08
23.45				1584		1.41 ±0.25
23.61				1601		0.31 ±0.10

Fonte: Próprio autor

**Figura 3** - (a) Perfil cromatográfico da análise dos COVs do co-cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *F. kalimantanense* LPPC130 em meio de cultura 523 por CG-EM. (b) Perfis cromatográficos das culturas axênicas de *Bacillus* sp. LPPC170 e (c) *F. kalimantanense* LPPC130.



Fonte: Próprio autor

**Tabela 3** - Tabela de identificação dos COVs do co-cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *F. kalimantanense* LPPC130. As linhas hachuradas identificam os COVs produzidos exclusivamente no co-cultivo.

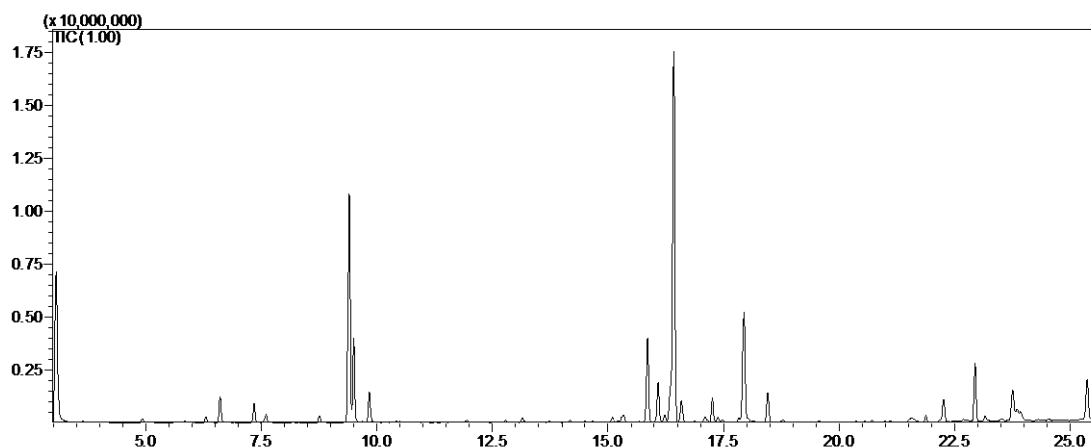
RT	Name	Formula	KI	KI lit	Area % SD
3.91	1,3-Pentadiene				0.09 ±0.10
6.30	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	612	612	0.45 ±0.03
6.41	Acetic acid	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	616	623	0.38 ±0.12
6.61	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	626	625	1.61 ±0.83
9.40	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	736	735	14.56 ±4.17
9.50	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	740	740	7.54 ±0.43
9.92	Propanoic acid, 2-methyl-	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	756	758	0.28 ±0.06
10.02	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	761	761	0.32 ±0.22
10.51	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170		779		0.39 ±0.12
10.61	Butanoic acid		783	783	0.49 ±0.14
10.79	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170		789		0.04 ±0.15
10.85	2,3-Butanediol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	792	792	0.05 ±0.10
11.99	Butanoic acid, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	842	845	2.27 ±0.23
12.22	Butanoic acid, 2-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	852	857	2.34 ±0.82
12.38	2-Furanmethanol	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	859	858	0.22 ±0.01
12.61	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	869	869	0.42 ±0.45
12.70	Pentanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	873	878	0.10 ±0.02
12.79	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	877	878	0.19 ±0.05



RT	Name	Formula	KI	KI lit	Area % SD
12.85	1-Butanol, 2-methyl-, acetate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	879	879	0.07 ±0.02
13.05	Co-cultive		887		0.065 ±0.005
13.15	2-Heptanone	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	891	891	0.05 ±0.02
13.61	Tiglic acid	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	913	912	0.33 ±0.10
13.93	Anisole	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O	929	917	0.15 ±0.06
14.11	Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	938	937	0.94 ±0.19
14.20	Methyl tiglate		942		0.09 ±0.02
14.37	Thiopivalic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> OS	950	959	0.13 ±0.01
14.51	Pentanoic acid, 2-hydroxy-4-methyl-, methyl ester	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	957	966	0.07 ±0.01
14.80	1-Heptanol	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	971	972	1.90 ±1.75
15.76	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	1018	1020	0.09 ±0.02
15.86	Co-cultive		1024		0.09 ±0.02
16.09	<i>Bacillus</i> sp. LPPC130		1036		3.34 ±0.18
16.34	<i>Bacillus</i> sp. LPPC130		1049		0.2 ±0.04
16.59	<i>Bacillus</i> sp. LPPC130		1062		0.24 ±0.03
16.81	1-Octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	1074	1074	0.18 ±0.12
17.26	2-Nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	1097	1096	0.08 ±0.01
17.39	2-Nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	1104	1102	0.06 ±0.01
17.93	Benzenamine, 4-methoxy-2-methyl-	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO	1136		52.58 ±0.26
18.21	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170		1152		0.24 ±0.05
18.61	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1175		0.40 ±0.02
19.04	Co-cultive		1199		0.25 ±0.03
19.67	Co-cultive		1243		0.6 ±0.01
19.86	Co-cultive		1257		0.16 ±0.02
20.05	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1270		0.41 ±0.10
20.20	1-Decanol	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub> O	1280	1275	0.19 ±0.04
21.10	1-Undecanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O	1353	1356	0.09 ±0.03
21.29	n-Decanoic acid	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	1369	1369	0.13 ±0.02
22.26	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1460		0.19 ±0.02
22.50	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1484		0.32 ±0.04
22.66	Co-cultive		1499		0.12 ±0.04
22.73	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1506		0.23 ±0.07
23.20	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1557		2.21 ±0.49
23.45	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1584		4.41 ±0.98
23.61	<i>F. kalimantanense</i> LPPC130		1600		0.49 ±0.09
23.94	Co-cultive		1635		0.1 ±0.06
24.06	Co-cultive		1648		0.15 ±0.02
24.43	Co-cultive		1689		0.24 ±0.01

Fonte: Próprio autor

**Figura 4** - Perfil cromatográfico da análise dos COVs de *C. musae* LPPC389 em meio de cultura 523 por CG-EM.



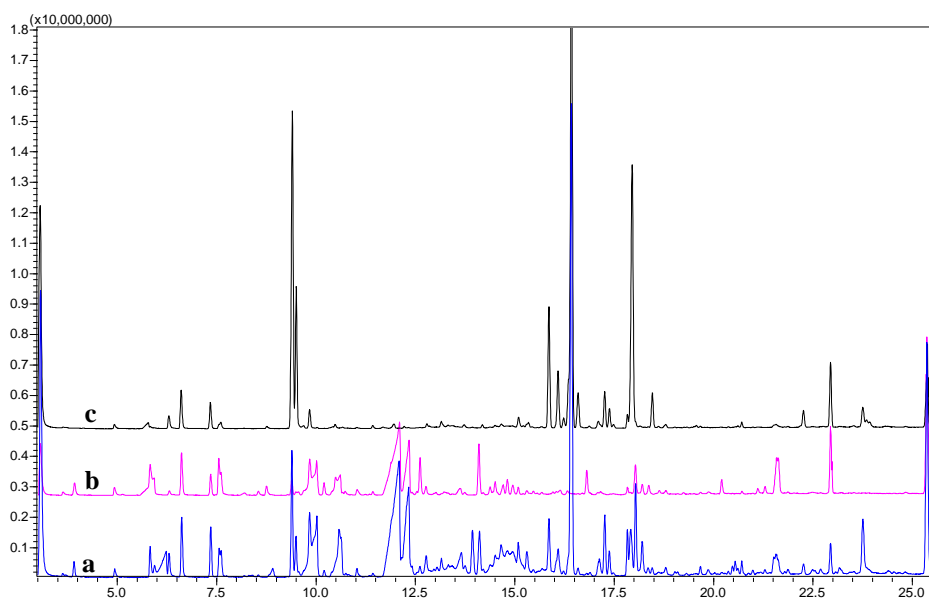
Fonte: Próprio autor

**Tabela 4** - Tabela de identificação dos COVs de *C. musae* LPPC389.

RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
6.29	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	611	612	0.64 ±0.22
6.60	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	78-83-1	625	625	1.92 ±0.36
8.75	Acetoin	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	513-86-0	708	708	0.37 ±0.24
9.39	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	735	736	16.65 ±3.95
9.49	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	1565-80-6	739	740	5.25 ±1.01
12.78	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	123-92-2	877	877	0.12 ±0.01
13.14	2-Heptanone	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	110-43-0	891	891	0.22 ±0.07
13.31	2-Heptanol	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	543-49-7	898	896	0.10 ±0.02
13.93				929		0.05 ±0.03
14.18	$\alpha$ -Thujene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	2867-05-2	941	942	0.16 ±0.02
15.85	$\alpha$ -Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99-83-2	1023	1025	7.47 ±0.16
16.08	$\gamma$ -Terpinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99-85-4	1036	1035	3.46 ±0.20
16.22				1043		0.49 ±0.02
16.42	trans- $\beta$ -Ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3779-61-1	1054	1054	37.54 ±6.98
16.59	Benzeneacetaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	122-78-1	1062	1063	2.65 ±1.19
17.25	2-Nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	821-55-6	1097	1097	1.85 ±0.24
17.37	2-Nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	628-99-9	1103	1102	0.87 ±0.41
17.94	Phenylethyl Alcohol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	60-12-8	1137	1137	13.47 ±4.26
18.45				1166		1.90 ±0.58
19.56				1236		0.10 ±0.01
22.26				1459		1.36 ±.39
23.75				1616		2.12 ±0.74
23.84				1626		0.15 ±0.07
23.92				1634		0.17 ±0.07

Fonte: Próprio autor

**Figura 5 -** (a) Perfil cromatográfico da análise dos COVs do co-cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *C. musae* LPPC389 em meio de cultura 523 por CG-EM. (b) Perfis cromatográficos das culturas axênicas de *Bacillus* sp. LPPC170 e (c) *C. musae* LPPC389.



Fonte: Próprio autor

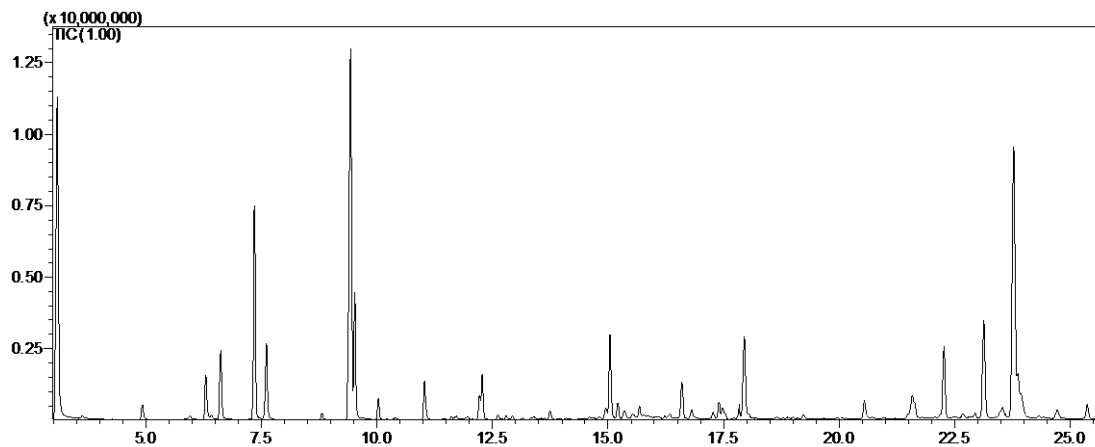
**Tabela 5 -** Tabela de identificação dos COVs do co-cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *C. musae* LPPC389. As linhas hachuradas identificam os COVs produzidos exclusivamente no co-cultivo.

RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
3.91	1,3-Pentadiene	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	2004-70-8			0.46 ±0.31
6.23	Acetic acid	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	609	610	1.37 ±0.02
6.30	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	612	612	2.92 ±1.89
6.60	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	78-83-1	626	625	3.25 ±0.19
7.56	1-Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	71-36-3	664	664	0.51 ±0.01
8.55	Methyl thiolacetate	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OS	1534-08-3	699	701	0.10 ±0.01
8.8	Acetoin	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	513-86-0	710	713	0.70 ±0.16
9.38	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	735	736	6.74 ±0.59
9.49	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	1565-80-6	740	740	1.92 ±0.12
10.02	Ethyl isobutyrate	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	97-62-1	761	762	2.00 ±0.18
10.20	1-Pentanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	71-41-0	768	768	0.22 ±0.07
10.52	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170			780		0.49 ±0.07
10.62	Butanoic acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	107-92-6	784	783	0.78 ±0.41
10.76	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170			785		0.16 ±0.01
12.09	3-Methyl-butanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	5271-38-5	847	838	7.83 ±1.40
12.33	Butanoic acid, 2-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	117-53-0	857	857	4.75 ±1.23
12.41	2-Hexanone, 5-methyl-	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	110-12-3	861	862	0.52 ±0.02
12.61	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	111-27-3	869	869	0.38 ±0.10
12.77	Pentanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	109-52-4	876	878	0.72 ±0.29

RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
13.15	2-Heptanone	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	110-43-0	892	891	0.89 ±0.21
13.31	Pentanoic acid, ethyl ester	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	539-82-2	898	900	1.12 ±0.06
13.64	Tiglic acid	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	81-59-1	914	912	1.59 ±1.43
13.93	<i>C. musae</i> LPPC389			929		1.93 ±1.14
14.09	Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	5405-41-4	937	943	2.88 ±0.60
14.38	Thiopicvalic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> OS	55561-02-9	951	959	0.22 ±0.03
14.50	Pentanoic acid, 2-hydroxy-4-methyl-, methyl ester	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	40348-72-9	957	966	0.60 ±0.02
14.80	1-Heptanol	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> O	111-70-6	971	972	0.34 ±0.50
15.37	Hexanoic acid, ethyl ester	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	123-66-0	997	997	0.29 ±0.04
15.68	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2050-01-3	1014	1013	0.46 ±0.60
15.85	α - Phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99-83-2	1023	1025	3.67 ±0.67
16.08	λ - Terpinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	99-85-4	1036	1035	1.29 ±0.01
16.22	LPPC389			1043		0.50 ±0.41
16.41	Trans - β - Ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3779-61-1	1054	1054	28.86 ±2.23
16.59	Benzeneacetaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	122-78-1	1063	1063	3.37 ±2.58
16.80	1-Octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	111-87-5	1074	1074	0.12 ±0.01
17.26	2-Nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	821-55-6	1097	1097	7.07 ±2.90
17.37	2-Nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	628-99-9	1103	1102	2.29 ±0.79
17.91	Phenylethyl Alcohol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	60-12-8	1135	1137	4.24 ±1.80
18.04	Co-cultive			1142		4.64 ±0.02
18.20	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170			1152		2.67 ±1.62
18.35	Octanoic acid	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	124 - 07 - 2	1160	1161	0.22 ±0.01
18.45	<i>C. musae</i> LPPC389			1166		0.43 ±0.18
18.99	Octanoic acid, ethyl ester	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	106-32-1	1196	1196	0.84 ±0.57
19.86	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170			1257		0.46 ±0.27
20.54	2-Undecanone	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	112 - 12 - 9	1304	1300	0.45 ±0.09
20.61	2-Undecanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O	1653 - 30 - 1	1310	1311	0.34 ±0.28
21.29	n-Decanoic acid	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	334 - 48 - 5	1368	1369	0.19 ±0.02
22.25	<i>C. musae</i> LPPC389			1459		1.01 ±0.49
23.75	<i>C. musae</i> LPPC389			1616		5.41 ±3.09

Fonte: Próprio autor

**Figura 6** - Perfil cromatográfico da análise dos COVs de *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82 em meio de cultura 523 por CG-EM.



Fonte: Próprio autor

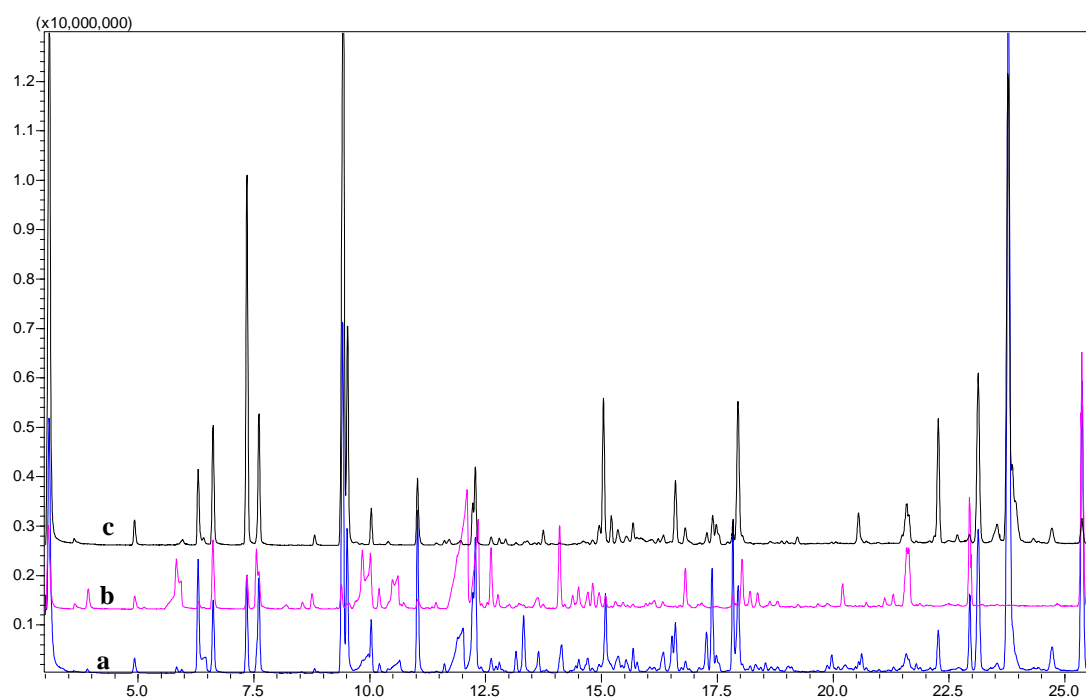
**Tabela 6** - Tabela de identificação dos COVs de *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82.

RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
6.29	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	612	612	1.60 ±0.47
6.61	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	78-83-1	626	625	3.35 ±0.48
9.42	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	737	736	22.78 ±2.81
9.51	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	1565-80-6	740	740	4.24 ±0.91
10.03	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	97-62-1	761	761	0.81 ±0.15
11.03	Butanoic acid, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	105-54-4	798	798	1.86 ±0.24
12.27	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	108-64-5	855	855	1.07 ±0.31
12.62	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	111-27-3	869	869	0.18 ±0.03
13.40				902		0.73 ±0.17
15.04	1-Octen-3-ol	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	3391-86-4	982	982	3.06 ±1.16
15.21	3-Hexanone	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	106-68-3	990	990	0.61 ±0.15
15.35	β-Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	123-35-3	996	997	0.51 ±0.08
15.68	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2050-01-3	1014	1013	0.41 ±0.01
16.34				1049		0.31 ±0.01
16.59	Benzeneacetaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	122-78-1	1063	1063	4.04 ±1.41
16.80				1074		0.41 ±0.09
17.27	2-Nonanona	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	106-30-9	1097	1097	0.27 ±0.03
17.40				1105		0.74 ±0.02
17.94	Phenylethyl Alcohol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	60-12-8	1137	1137	5.47 ±0.35
20.54				1305		1.01 ±0.09
22.26				1456		5.29 ±0.64
22.68				1501		0.23 ±0.02
23.13				1550		8.02 ±1.58
23.53				1593		0.50 ±0.15

RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
23.77				1619		27.43 ±5.78
23.85				1628		0.25 ±0.12
24.32				1675		0.14 ±0.04

Fonte: Próprio autor

**Figura 7 - (a)** Perfil cromatográfico da análise dos COVs do co-cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82 em meio de cultura 523 por CG-EM. **(b)** Perfis cromatográficos das culturas axênicas de *Bacillus* sp. LPPC170 e **(c)** *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82.



Fonte: Próprio autor

**Tabela 7** - Tabela de identificação dos COVs do co-cultivo de *Bacillus* sp. LPPC170 versus *Lasiodiplodia brasiliensis* BAN82. As linhas hachuradas identificam os COVs produzidos exclusivamente no co-cultivo.

RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
3.90	1,3-Pentadiene, (E)-	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>	2004-70-8			0.05 ± 0.02
6.29	Ethyl Acetate	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	141-78-6	612	612	3.07 ± 0.27
6.61	1-Propanol, 2-methyl-	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	78-83-1	626	625	2.267 ± 0.09
9.40	1-Butanol, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	123-51-3	736	736	12.60 ± 0.10
9.50	1-Butanol, 2-methyl-, (S)-	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	1565-80-6	740	740	3.07 ± 0.40
10.02	Propanoic acid, 2-methyl-, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	97-62-1	761	761	1.35 ± 0.12
10.20	1-Pentanol	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	71-41-0	768	768	0.16 ± 0.07
10.54	Butanoic acid	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	107-92-6	781	784	0.41 ± 0.05
11.03	Butanoic acid, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	105-54-4	798	798	6.00 ± 1.27
11.61	Co-cultive			825		0.25 ± 0.01
11.91	Butanoic acid, 3-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	504-74-2	839	845	1.01 ± 0.23
12.12	Butanoic acid, 2-methyl-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	117-53-0	848	857	1.03 ± 0.01
12.22	Butyl 2-methylbutanoate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	7452-79-1	852	851	0.45 ± 0.21
12.28	Butanoic acid, 3-methyl-, ethyl ester	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	108-64-5	855	855	2.05 ± 0.90
12.61	1-Hexanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	111-27-3	869	869	0.36 ± 0.16
12.72	Pentanoic acid	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	109-52-4	874	878	0.08 ± 0.01
12.79	1-Butanol, 3-methyl-, acetate	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	123-92-2	877	877	0.21 ± 0.01
13.15	2-Heptanone	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O	110-43-0	892	892	0.69 ± 0.37
13.31	Pentanoic acid, ethyl ester	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	539-82-2	898	900	1.85 ± 0.62
13.63	Propanoic acid, 2-methyl-, butyl ester	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	97-87-0	914	911	0.52 ± 0.14
14.10	Butanoic acid, 3-hydroxy-, ethyl ester	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	5405-41-4	938	937	1.2 ± 0.07
14.50	Butanoic acid, 2-methylpropyl ester	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	539-90-2	957	958	0.32 ± 0.07
14.80	1-Heptanol	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	111-27-3	971	869	0.1 ± 0.04
15.20	3-Hexanone	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O	106-68-3	990	990	0.1 ± 0.01
15.35	<i>b</i> -Myrcene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	123-35-3	996	997	0.49 ± 0.06
15.68	Propanoic acid, 2-methyl-, 3-methylbutyl ester	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	2050 01 3	1014	1013	0.61 ± 0.06
15.76	Co-cultive			1019		0.13 ± 0.03
16.32	<i>L. brasiliensis</i> BAN82			1049		0.64 ± 0.08
16.52	Butanoic acid, 3-methylbutyl ester	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	106-27-4	1059	1060	0.50 ± 0.06
16.59	Benzeneacetaldehyde	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O	122-78-1	1063	1063	1.1 ± 0.11
16.81	1-Octanol	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	111-87-5	1074	1074	0.24 ± 0.01
17.26	2-Nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	821-55-6	1097	1096	1.47 ± 0.84
17.38	2-Nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	628-99-9	1103	1102	2.79 ± 1.39
17.94	Phenylethyl Alcohol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	60-12-8	1137	1137	2.86 ± 0.38
18.20	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170			1152		0.14 ± 0.02
19.03	Co-cultive			1198		0.15 ± 0.04
19.87	<i>Bacillus</i> sp. LPPC170			1257		0.14 ± 0.03
19.96	Benzeneacetic acid, ethyl ester	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	101-97-3	1264	1255	0.36 ± 0.06

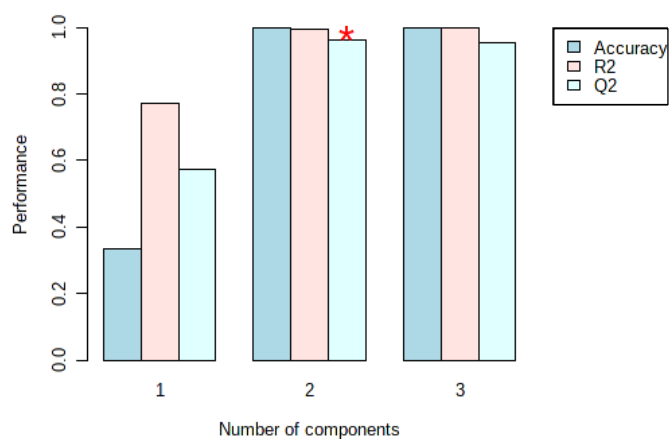
RT	Name	Formula	CAS	KI	KI. Lit	Area % SD
20.54	<i>L. brasiliensis</i> BAN82			1305		0.13 ± 0.08
20.61	2-Undecanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O	1653-30-1	1310	1311	0.29 ± 0.15
22.26	<i>L. brasiliensis</i> BAN82			1460		1.64 ± 0.60
23.12	<i>L. brasiliensis</i> BAN82			1550		8.18 ± 3.21
23.53	<i>L. brasiliensis</i> BAN82			1593		0.31 ± 0.13

Fonte: Próprio autor



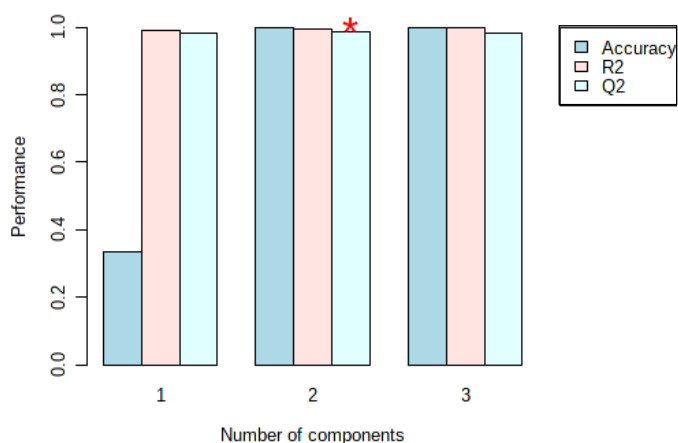
## ANEXO D – ANÁLISES DE VALIDAÇÃO CRUZADA DOS DADOS DE PLS-DA

**Figura 1** - Desempenho da classificação PLS-DA usando diferentes números de componentes das análises de CG-EM de *Bacillus* sp. LPPC170, *F. kalimantanense* LPPC130 e do co-cultivo entre as duas cepas. A análise de validação cruzada com as três primeiras componentes produziu um modelo forte com alta previsibilidade validada ( $Q^2 = 0,96$ ), valor de ajuste ( $R^2 = 0,99$ ) e precisão (exatidão = 0,99). O asterisco vermelho indica a melhor classificação.  $R^2$  e  $Q^2$ , maiores que 0,5 indicam um modelo razoavelmente ajustado com bom poder preditivo.



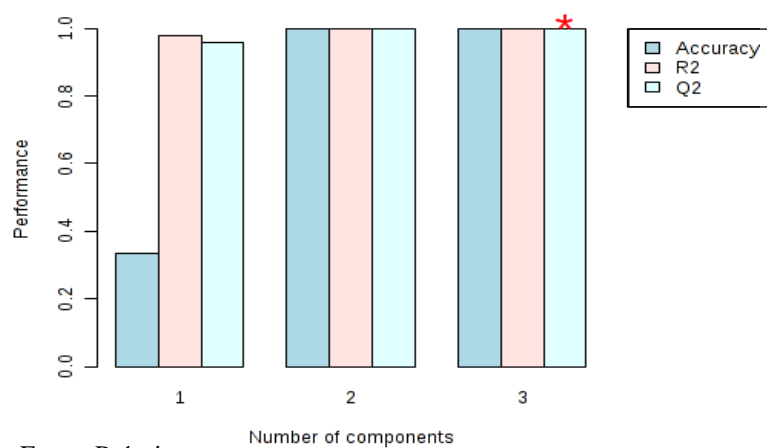
Fonte: Próprio autor

**Figura 2** - Desempenho da classificação PLS-DA usando diferentes números de componentes das análises de CG-EM de *Bacillus* sp. LPPC170, *C. musae* LPPC389 e do co-cultivo entre as duas cepas. Os valores de  $R^2$  (0,99) e  $Q^2$  (0,98) mostram qualidade de ajuste e qualidade de predição satisfatórias.



Fonte: Próprio autor

**Figura 3** - Qualidade de ajuste ( $R^2=0,99$ ) e qualidade de predição ( $Q^2=0,99$ ) do melhor desempenho da análise PLS-DA de *Bacillus* sp. LPPC170, *L. brasiliensis* BAN82 e co-cultivo. Os valores de  $R^2$  e  $Q^2$  próximo de 1 mostram um ótimo poder preditivo dos dados.



Fonte: Próprio autor