

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PANCS: PROSPECÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARA O BIOCONTROLE DE
FUNGOS E INSETOS-PRAGA**

Cinara Ramos Sales

Engenheira Agrônoma

2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PANCS: PROSPECÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO PARA O BIOCONTROLE DE
FUNGOS E INSETOS-PRAGA**

Discente: Cinara Ramos Sales

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

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

2025

S163b	Sales, Cinara Ramos Bactérias endofíticas de PANCs: Prospecção e caracterização para o biocontrole de fungos e insetos-praga / Cinara Ramos Sales. -- Jaboticabal, 2025 126 p. : il., tabs., fotos, mapas Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos 1. Controle biológico. 2. Metabolômica. 3. Agricultura sustentável. 4. Bactérias endofíticas. 5. Bioprospecção microbiana. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Impacto potencial desta pesquisa: Essa pesquisa tem o potencial de gerar impactos significativos no campo da microbiologia agrícola, ao evidenciar o papel do *Bacillus velezensis*, isolado de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs), como agente de biocontrole e promotor de crescimento vegetal. Os resultados demonstram sua capacidade de produzir metabólitos antifúngicos e compostos voláteis bioativos, eficazes contra fungos fitopatogênicos, ao longo de diferentes fases da curva de crescimento. A aplicação integrada de análises morfológicas, funcionais e ômicas (HPLC, RMN, sequenciamento 16S e metagenômica) possibilitou caracterizar a diversidade endofítica e elucidar mecanismos de ação, incluindo síntese de lipopeptídeos, enzimas hidrolíticas e VOCs. Assim, o estudo reforça o *B. velezensis* como candidato estratégico para o desenvolvimento de bioinsumos agrícolas, capazes de reduzir a dependência de agroquímicos, mitigar impactos ambientais e valorizar as PANCs como reservatórios de biodiversidade microbiana de relevância agrobiotecnológica.

Potential Impact of This Research: This research has the potential to generate significant impacts in the field of agricultural microbiology by highlighting the role of *Bacillus velezensis*, isolated from Unconventional Food Plants (UFPs), as a biocontrol agent and plant growth promoter. The results demonstrate its ability to produce antifungal metabolites and bioactive volatile compounds, effective against phytopathogenic fungi, across different stages of the growth curve. The integrated application of morphological, functional, and omics analyses (HPLC, NMR, 16S rRNA sequencing, and metagenomics) enabled the characterization of endophytic diversity and the elucidation of mechanisms of action, including the synthesis of lipopeptides, hydrolytic enzymes, and VOCs. Thus, this study reinforces *B. velezensis* as a strategic candidate for the development of agricultural bioinputs, capable of reducing dependence on agrochemicals, mitigating environmental impacts, and enhancing the value of UFPs as reservoirs of microbial biodiversity with agrobiotechnological relevance.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PANCS: PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARA O BIOCONTROLE DE FUNGOS E INSETOS-PRAGA

AUTORA: CINARA RAMOS SALES

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS**
Data: 02/06/2025 10:17:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS (Participação Presencial) Departamento de Biotecnologia Agropecuaria e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **EVERLON CID RIGOBELLO**
Data: 04/06/2025 14:24:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO (Participação Presencial) Departamento de Producao Vegetal / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **MAISA AZEVEDO BELUOMINI**
Data: 04/06/2025 07:32:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MAÍSA AZEVEDO BELUOMINI (Participação Presencial) Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **TATIANE CARLA SILVA**
Data: 11/06/2025 10:15:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pós-doutoranda TATIANE CARLA SILVA (Participação Presencial) Departamento de Ciências Farmacêuticas / FCFRP USP Ribeirão Preto/SP

Documento assinado digitalmente
 **ANDRE RODRIGUES**
Data: 11/06/2025 11:32:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES (Participação Virtual) Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB UNESP Rio Claro

Jaboticabal, 27 de maio de 2025

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Cinara Ramos Sales, nasceu no município de Serra do Ramalho-BA, em 15 de março de 1993, residiu nesse município até os 4 anos de idade, depois mudou com seus pais para cidade Barreiras – BA, onde em 2012 iniciou a graduação no curso de Engenharia Agrônoma da Universidade do estado da Bahia (UNEB), nesta foi bolsista de iniciação científica, fez parte da equipe do Laboratório de Entomologia agrícola onde desenvolveu o trabalho de conclusão de curso intitulado “Eficiência de inseticidas químicos no controle do bicudo (*Anthonomus grandis*) (Boheman, 1843) por contaminação tarsal e contato”. O estágio obrigatório foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo o trabalho desenvolvido publicado na revista “Apidologie” intitulado “Climate change can affect the spatial association between stingless bees and Mimosa scabrella in the Brazilian Atlantic Forest”. Iniciou em 2019 o mestrado em Microbiologia Agropecuária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista (FCAV-Unesp), onde desenvolveu a presente dissertação.

EPÍGRAFE

“A fé sem razão é incompleta, e a razão sem fé é vazia.”
Santa Catarina de Alexandria

DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, Luzia (in memoriam), cuja presença permanece viva em minha memória, orientando cada passo com seus ensinamentos e amor eterno.

Ao meu pai, Domingos, exemplo de força e dedicação, que sempre acreditou na minha caminhada, o regador dos meus sonhos.

Aos meus irmãos e irmãs, pelo apoio constante, amor, muitos conselhos e pela dádiva de ser a caçula dos melhores irmãos do mundo. Aos meus sobrinhos, que são motivo de imenso amor e alegria em minha vida.

À minha irmã Luziane, com quem compartilhei o cotidiano e que acompanhou de perto cada etapa desta jornada, sendo presença fundamental neste percurso e na minha vida.

Ao meu namorado, Afonso Penna, pelo amor, carinho e por estar ao meu lado nos momentos de dificuldade, oferecendo sempre apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha vida, por iluminar meus caminhos e que me permitiu mais esta conquista.

À minha família, pelo carinho, paciência e incentivo em todos os momentos. Sem vocês, essa conquista não seria possível.

A Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação no decorrer deste trabalho, apoio, ensinamentos e amizade. Sempre entusiasmada para o desenvolvimento de novas pesquisas e na busca da excelência de suas produções, sem se abalar pelas adversidades enfrentadas. Certamente a tenho como uma referência a ser seguida.

Ao técnico Dr. João Carlos Campanharo, por todo o apoio e colaboração, sem dúvidas um mentor nos aspectos práticos da microbiologia, necessários a execução deste trabalho.

A técnica Dra. Camila Cesário Fernandes, por todo o apoio dado em assuntos relacionados à área de biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes pelo fornecimento de posturas de *Spodoptera frugiperda*, sempre muito atenciosos.

A todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Microrganismo e Plantas pela ajuda em diversas etapas deste trabalho, e principalmente, por toda a amizade e companheirismo no decorrer destes anos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP/FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária, câmpus Jaboticabal.

À seção técnica da Pós-Graduação, pelo auxílio, atenção e disponibilidade.

Aos autores citados nesta dissertação, entre outros, os quais, através de suas publicações forneceram embasamento prático e teórico para elaboração, desenvolvimento e interpretação deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Código de Financiamento 001).

E a todos os demais que, direta ou indiretamente, colaboraram para a concretização deste trabalho.

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

Meus sinceros agradecimentos a todos!

SUMÁRIO

RESUMO	IV
ABSTRACT	V
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Planta alimentícia não convencional (PANC)	3
2.2. Espécies de PANCs estudadas	4
2.2.1. <i>Stachys byzantina</i> (Peixinho-da-horta)	4
2.2.2. <i>Lactuca indica</i> L. (Almeirão-roxo)	5
2.2.3. <i>Pereskia aculeata</i> (Ora-pro-nóbis)	6
2.2.4. <i>Tropaeolum majus</i> (Capuchinha)	7
2.2.5. <i>Rumex acetosa</i> L. (Azedinha)	8
2.3. Diversidade e Interações Microbianas em PANCs.....	9
2.4. Potencial biotecnológico das bactérias endofíticas.....	11
2.5. Bactérias endofíticas com atividade antifúngica	12
2.6. Bactérias endofíticas com atividade inseticida	14
2.7. Compostos voláteis com potencial bioativo	15
2.8. Microrganismos não cultiváveis	16
2.9. Microrganismos Não Cultiváveis: Perspectivas Moleculares.....	17
2.10. Abordagens ômicas na bioprospecção microbiana	18
3. REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2 – diversidade microbiana endofítica em folhas de PANCs:	
análise taxonômica, núcleo microbiano e potencial biotecnológico.....	30
RESUMO	30
1. INTRODUÇÃO	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1. Coleta do material vegetal	33
2.2. Isolamento das bactérias endofíticas	34
2.3. Preparação do material vegetal e extração de DNA total de folhas	36

2.4. Construção da biblioteca e sequenciamento	36
2.5. Bioinformática e processamento de amplicons	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1. Isolamento das bactérias endofíticas de PANCs	38
3.2. Diversidade microbiana	40
3.3. Diversidade alfa	41
3.4. Perfil taxonômico	43
3.5. Análise de agrupamento hierárquico	46
3.6. Núcleo microbiano	48
4. CONCLUSÕES	51
5. REFERÊNCIAS	52
CAPÍTULO 3 – Compostos antifúngicos difusíveis e voláteis produzidos por bacillus velezensis JBC141 antagonista contra vários fungos fitopatogênicos.....	56
RESUMO	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1. Reativação e preparo dos isolados bacterianos para bioensaios	59
2.2. Triagem de bactérias com atividade antifúngica	59
2.3. Triagem de bactérias com atividade inseticida	61
2.4. Extração e sequenciamento de DNA bacteriano	62
2.5. Atividade de enzimas hidrolíticas	62
2.5.1. Atividade de protease	63
2.5.2. Atividade de esterase e lipase	63
2.5.3. Atividade de celulase	63
2.5.4. Atividade de amilase	63
2.5.5. Atividade de fosfatase	64
2.6. Bioensaio de atividade antifúngica	64
2.7. Atividade antifúngica com e sem células vivas	65
2.8. Caracterização inicial dos extratos	66
2.9. Ação antifúngica de VOCs in vitro	66
2.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	67

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Triagem de bactérias com atividade antifúngica	67
3.2. Triagem de bactérias com atividade inseticida	70
3.3. Identificação dos isolados ativos	71
3.4. Enzimas hidrolíticas	74
3.5. Teste de cultura dupla	76
3.6. Atividade antifúngica com e sem células vivas	78
3.7. Caracterização inicial dos extratos	81
3.8. Avaliação de VOCs	86
3.9. Efeitos de <i>B. velezensis</i> sobre <i>C. erobotryae</i> por MEV	89
4. CONCLUSÕES	91
5. REFERÊNCIAS	92
CAPÍTULO 4 – Dinâmica da produção de metabólitos antifúngicos por <i>Bacillus velezensis</i> ao longo da curva de crescimento	96
RESUMO	96
1. INTRODUÇÃO	97
2. MATERIAIS E MÉTODOS	98
2.1. Curva de crescimento	98
2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	99
2.3. Eletroforese em SDS-PAGE corada com nitrato de prata	99
2.4. HPLC – High-performance liquid chromatography	100
2.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)	100
3. RESULTADOS	101
3.1. Curva de crescimento	101
3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	103
3.3. Eletroforese em SDS-PAGE corada com nitrato de prata	104
3.4. HPLC – High-performance liquid chromatography	105
3.5. Identificação de compostos bioativos (RMN)	107
4. CONCLUSÕES	109
5. REFERÊNCIAS	110

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE PANCS: PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARA O BIOCONTROLE DE FUNGOS E INSETOS-PRAGA

RESUMO - A intensificação da agricultura tem proporcionado expressivos ganhos produtivos, mas também intensificado os impactos ambientais associados ao uso excessivo de fertilizantes e pesticidas. Nesse cenário, torna-se urgente a adoção de estratégias mais sustentáveis, entre as quais se destaca o uso de microrganismos endofíticos como bioinoculantes naturais. Esses microrganismos colonizam os tecidos vegetais de forma benéfica e não patogênica, promovendo o crescimento das plantas, induzindo resistência a estresses bióticos e abióticos e atuando no controle de pragas e doenças. As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) despontam como modelos promissores para a bioprospecção de comunidades microbianas endofíticas em virtude de sua rusticidade, diversidade genética e histórico evolutivo de interações simbióticas. Neste trabalho, são abordadas cinco espécies representativas (*Stachys byzantina*, *Lactuca indica* L., *Pereskia aculeata*, *Tropaeolum majus* e *Rumex acetosa* L.), com destaque para suas características morfológicas, valor nutricional, propriedades adaptativas e papel como hospedeiras de comunidades microbianas complexas. Também são discutidos os principais mecanismos de ação das bactérias endofíticas, incluindo a produção de compostos antifúngicos e voláteis de ação bioativa, além de efeitos inseticidas e promotores de crescimento. Adicionalmente, são analisadas as contribuições de microrganismos não cultiváveis para a funcionalidade dessas comunidades e as limitações impostas pelas técnicas tradicionais de cultivo. Por fim, apresentam-se ferramentas moleculares modernas, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, metagenômica, transcriptômica e metabolômica, que possibilitam elucidar a diversidade taxonômica e funcional desses microrganismos, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de bioinsumos agrícolas inovadores e ambientalmente responsáveis.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas; Bioprospecção microbiana; Controle biológico; Metabolômica; Agricultura sustentável.

Endophytic Bacteria from Unconventional Food Plants: Prospection and Characterization for the Biocontrol of Fungi and Insect Pests

ABSTRACT - The intensification of agriculture has led to significant productivity gains but has also increased environmental impacts due to the excessive use of fertilizers and pesticides. In this context, the adoption of sustainable strategies becomes imperative, with special emphasis on the use of endophytic microorganisms as natural bioinoculants. These microorganisms colonize plant tissues in a beneficial and non-pathogenic manner, promoting plant growth, enhancing resistance to biotic and abiotic stresses, and contributing to the control of pests and diseases. Unconventional Food Plants (UFPs) emerge as promising models for the bioprospecting of endophytic microbial communities owing to their hardiness, genetic diversity, and long evolutionary history of symbiotic interactions. This chapter addresses five representative species (*Stachys byzantina*, *Lactuca indica* L., *Pereskia aculeata*, *Tropaeolum majus*, and *Rumex acetosa* L.), highlighting their morphological traits, nutritional value, adaptive properties, and role as hosts of complex microbial communities. The main mechanisms of action of endophytic bacteria are also discussed, including the production of antifungal compounds and bioactive volatiles, as well as insecticidal and plant growth-promoting effects. Additionally, the role of unculturable microorganisms in the functionality of these communities and the limitations imposed by traditional cultivation techniques are analyzed. Finally, modern molecular tools such as 16S rRNA gene sequencing, metagenomics, transcriptomics, and metabolomics are presented as approaches that allow the unveiling of the taxonomic and functional diversity of these microorganisms, providing valuable insights for the development of innovative and environmentally responsible agricultural bioinputs.

Keywords: Endophytic bacteria; Microbial bioprospecting; Biological control; Metabolomics; Sustainable agriculture.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por práticas agrícolas sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de reduzir o uso de insumos químicos e os impactos ambientais associados à agricultura convencional (Shahid et al., 2023). Nesse contexto, o controle biológico de pragas e doenças desponta como uma alternativa viável, sobretudo quando baseado no uso de microrganismos endofíticos com potencial bioativo (Morales-Cedeño et al., 2021).

Os microrganismos endofíticos colonizam tecidos vegetais de forma interna, estável e geralmente benéfica, podendo estabelecer interações de caráter simbiótico, mutualístico, comensal ou até mesmo latente. Ou seja, embora muitos endófitos exerçam funções positivas sobre o hospedeiro, como promoção do crescimento vegetal ou proteção contra fitopatógenos, é importante destacar que nem todos estabelecem relações mutualísticas estritas, havendo variação na natureza e intensidade das interações (De Silva et al., 2019).

As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs), por sua vez, representam uma categoria diversificada de espécies vegetais com potencial nutricional e ecológico amplamente subutilizado (Rodrigues et al., 2025). Embora apresentem rusticidade e adaptabilidade a diferentes condições ambientais, seu uso limitado não decorre de falta de valor agrônomo ou nutricional, mas sim da ausência de cadeias de mercado estruturadas e da baixa inserção nos sistemas agrícolas e comerciais convencionais (Ranieri et al., 2017). No Brasil, estima-se que existam cerca de 5.000 espécies classificadas como PANCs, distribuídas em diversos biomas e apresentando variabilidade genética e funcional considerável (Kinupp and Lorenzi, 2014).

Além de seu valor nutricional e ecológico, as PANCs estabelecem relações estreitas com comunidades microbianas endofíticas, que colonizam seus tecidos de forma não patogênica e, muitas vezes, funcional (Bolívar-Anillo et al., 2020). Esses microrganismos desempenham papéis fundamentais na fisiologia vegetal,

promovendo o crescimento das plantas, induzindo resistência contra fitopatógenos e produzindo metabólitos secundários com propriedades antifúngicas, antibacterianas e inseticidas (Azevedo, 2014). A bioprospecção dessas interações microbiológicas tem demonstrado grande potencial para a identificação de novos agentes de biocontrole e biofertilizantes (Muhammad et al., 2024).

Tradicionalmente centrada em microrganismos cultiváveis, a bioprospecção passou a incorporar também abordagens independentes de cultivo, considerando que grande parte da diversidade microbiana presente em ambientes naturais permanece não cultivável por métodos convencionais (Socol et al., 2022) . O avanço das ferramentas moleculares, como o sequenciamento de alto rendimento do gene 16S rRNA e o uso de abordagens como os PNA-clamps, tornou-se possível acessar de forma mais abrangente a diversidade microbiana associada às plantas, inclusive em tecidos onde predomina o DNA vegetal (Lefèvre et al., 2020; Lundberg et al., 2013), desta forma, a integração entre dados de microrganismos cultivados e não cultiváveis permite uma visão mais completa das comunidades microbianas e de suas potenciais funções.

A construção de uma biblioteca 16S associada às PANCs, integrando dados de microrganismos cultivados e não cultiváveis, amplia significativamente o conhecimento sobre essas comunidades microbianas e fornece subsídios para a seleção de bioinoculantes com potencial de aplicação sustentável (Shehata et al., 2021).

Assim, a presente tese propõe a prospecção e caracterização morfológica, molecular e funcional de bactérias endofíticas isoladas de folhas de PANCs, com foco na atividade antifúngica e inseticida. A abordagem inclui o isolamento de microrganismos cultiváveis e o uso de técnicas de sequenciamento para identificar os não cultiváveis, contribuindo para a valorização das PANCs como fontes estratégicas para inovação no setor agrícola.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Planta alimentícia não convencional (PANC)

As Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) compreendem um conjunto diversificado de espécies vegetais com partes comestíveis, muitas vezes negligenciadas pelas cadeias produtivas agrícolas (Kinupp, 2009). O termo PANC foi proposto por Valdely Ferreira Kinupp em (2007), e engloba plantas nativas ou exóticas, espontâneas ou cultivadas, geralmente associadas à agricultura familiar e ao consumo doméstico. Por falta de estudos técnico-científicos e de divulgação adequada, essas plantas são comumente confundidas com ervas simples ou “mato”, apesar de seu elevado valor nutricional e potencial agroecológico (Biondo et al., 2018; Kinupp, 2007).

As PANCs representam alternativas acessíveis e sustentáveis para o combate à fome, por serem de fácil cultivo, baixo custo e alto valor nutritivo. São ricos em fibras, vitaminas, minerais e antioxidantes, evidenciando assim uma excelente opção na alimentação humana (Kelen et al., 2015; Liberato et al., 2019; Ribeiro and Durigan, 2018). O Brasil é um dos países mais ricos do mundo em diversidade biológica, com mais de 45.000 espécies nativas em seu território, e quando se fala, especificamente, em PANCs, estima-se aproximadamente que existam mais de 5.000 espécies, adaptadas a diferentes biomas como: Cerrado, Caatinga, Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal o que reforça sua importância como recurso estratégico alimentar, contudo, ainda elas são pouco utilizadas (Kinupp and Lorenzi, 2014; Zappi et al., 2015).

Nos tópicos a seguir, serão detalhadas as espécies de PANCs utilizadas como modelo neste estudo. A partir dessas espécies, foram investigadas a composição da microbiota endofítica. Essa abordagem permitiu a identificação de microrganismos com características promissórias para aplicações no controle biológico de fitopatógenos e reforçando a importância dessas plantas como reservatórios de biodiversidade microbiana com alto valor agrobiotecnológico.

2.2. Espécies de PANCs Estudadas

2.2.1. *Stachys byzantina* (Peixinho-da-horta)

Stachys byzantina, conhecida popularmente como peixinho-da-horta, é uma planta herbácea perene pertencente à família Lamiaceae, nativa da Turquia, Armênia e Irã (Naghibi et al., 2005). Apresenta crescimento rasteiro, formando uma cobertura densa com folhas oblongo-elípticas, medindo de 5 a 10 cm de comprimento. Essas folhas são densamente recobertas de pelos finos e sedosos (Figura 1), que conferem uma textura macia e coloração que varia entre o cinza e o verde-prateado (Kinupp and Lorenzi, 2014).

Devido à sua textura singular e aparência atraente, a planta é amplamente empregada em projetos paisagísticos, especialmente em jardins sensoriais. Além de seu uso ornamental, as folhas são consumidas tradicionalmente fritas, possuindo um sabor característico semelhante ao peixe. Essa utilização gastronômica ressalta seu valor cultural e contribui para a preservação de tradições culinárias regionais, promovendo também a biodiversidade alimentar (Ranieri et al., 2017; Sartori et al., 2020). Ademais, o gênero *Stachys* é reconhecido por propriedades medicinais, sendo frequentemente utilizado como anti-inflamatório (Maleki et al., 2001).



Figura 1. Imagens de uma muda de peixinho-da-horta, além da face adaxial e abaxial de sua folha. Fonte: O autor, 2025.

2.2.2. *Lactuca indica* L. (Almeirão-roxo)

Lactuca indica L., conhecida popularmente como almeirão-roxo, é uma planta herbácea anual da família Asteraceae, originária da Ásia. Devido à sua alta adaptabilidade, encontra-se amplamente distribuída pelo Brasil, sendo frequentemente utilizada como substituta da alface em diversas comunidades tradicionais (Monge et al., 2016).

Suas folhas são organizadas em roseta basal na parte inferior e distribuídas alternadamente ao longo do caule, apresentando formatos que variam de elípticos a lanceolados, com margens inteiras ou levemente lobadas. A coloração predominante das folhas é verde-acinzentada, podendo exibir tonalidades arroxeadas, especialmente ao longo das nervuras (Figura 2) (Feitosa, 2023).

Além de seu valor ornamental, o almeirão-roxo possui propriedades nutricionais e medicinais relevantes. As folhas jovens, de sabor levemente amargo, podem ser consumidas cruas ou cozidas, enquanto o látex extraído da planta é tradicionalmente empregado no tratamento caseiro de inflamações e distúrbios gastrointestinais (Teixeira, 2018). Sua resistência a condições ambientais adversas, aliada ao alto valor nutricional, reforça a importância de sua contribuição para a segurança alimentar e práticas agrícolas sustentáveis (Monge et al., 2016).

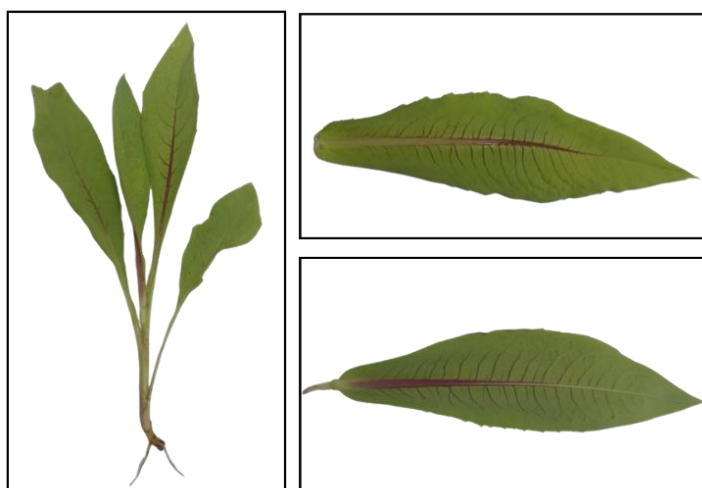


Figura 2. Imagens da muda de almeirão-roxo, além da face adaxial e abaxial de sua folha. Fonte: O autor, 2025.

2.2.3. *Pereskia aculeata* (ora-pro-nóbis)

Pereskia aculeata, popularmente conhecida como ora-pro-nóbis, é uma planta trepadeira perene da família Cactaceae. Diferentemente da maioria dos cactos, apresenta folhas verdadeiras e caules lenhosos (Cordeiro, 2020). Originária da América Tropical, distribui-se desde o México até a América do Sul, incluindo grande parte do território brasileiro, especialmente em ecossistemas associados à Mata Atlântica (Telles et al., 2017). Suas folhas são suculentas, elípticas a lanceoladas, de coloração verde, podendo apresentar tons arroxeados na face inferior (Figura 3). As flores, geralmente brancas ou creme, são perfumadas e atraem diversos polinizadores. Seus frutos são bagas globosas alaranjadas, contendo sementes pequenas e escuras (Marsaro Júnior et al., 2011).

A ora-pro-nóbis destaca-se por sua grande adaptabilidade a diferentes condições ambientais. É uma planta rústica, resistente à seca, tolerante a diversos tipos de solo e pode se desenvolver tanto sob sol pleno quanto em meia-sombra (Queiroz, 2012). Além de seu uso ornamental em cercas vivas e como planta melífera, a *Pereskia aculeata* é valorizada por suas folhas comestíveis, ricas em proteínas, vitaminas e minerais, sendo amplamente utilizada na culinária, especialmente em algumas regiões do Brasil (Telles et al., 2017).

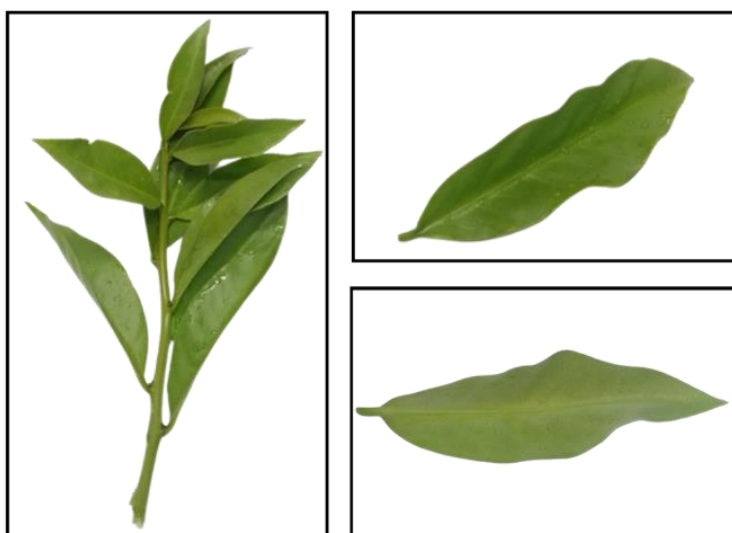


Figura 3. Imagens da muda de ora-pro-nóbis, além da face adaxial e abaxial de sua folha. Fonte: O autor, 2025.

2.2.4. *Tropaeolum majus* (capuchinha)

Tropaeolum majus L., popularmente conhecida como capuchinha, é uma planta herbácea anual da família Tropaeolaceae, tem como centros de diversidade primária Brasil, Peru, Colômbia e sul do México até a Patagonia (Pintão et al., 1995). Apresenta caules suculentos e ramificados, podendo atingir até 50 cm de altura. Suas folhas são alternas, pecioladas, orbiculares, com textura suave e coloração verde brilhante na face superior e verde-acinzentada na inferior. As flores são solitárias, axilares e vistosas, variando entre amarelo, laranja e vermelho, possuem formato campanulado e um característico esporão posterior (Figura 4). O fruto é do tipo tricoca, indeiscente, com pericarpo carnoso (Sangalli, 2003).

Destaca-se pela adaptabilidade, crescendo vigorosamente em regiões subtropicais e temperadas. Desenvolve-se bem sob sol pleno ou meia-sombra, preferindo solos bem drenados e ricos em matéria orgânica (Zardo et al., 2016). Devido à sua rusticidade, é amplamente utilizada em jardins ornamentais. Além disso, possui propriedades medicinais e culinárias reconhecidas e valorizadas tradicionalmente (Dematti and Coan, 1999).



Figura 4. Imagens da muda de capuchinha, além da face adaxial e abaxial de sua folha. Fonte: O autor, 2025.

2.2.5. *Rumex acetosa* L. (Azedinha)

Rumex acetosa L., conhecida popularmente como azedinha, é uma planta herbácea perene da família Polygonaceae, (Figura 5) nativa da Europa e amplamente cultivada em diversas regiões do mundo (Kinupp and Lorenzi, 2014). Suas folhas apresentam sabor ácido característico e são frequentemente consumidas frescas em saladas, refogadas, ou até mesmo utilizadas em bebidas como sucos e drinks. Destaca-se pelo elevado teor de antioxidantes, além de conter vitaminas, minerais, fibras e proteínas, que reforçam seu potencial nutricional (Souto, 2011). Entretanto, devido à presença significativa de ácido oxálico, recomenda-se moderação no consumo, especialmente por indivíduos propensos a distúrbios renais. (Sartori et al., 2020).

A azedinha adapta-se facilmente a diferentes condições ambientais, preferindo locais sombreados e solos úmidos próximos a cursos d'água, embora também prospere em solos mais secos (Tolrà et al., 2005). É altamente tolerante, crescendo inclusive em solos pobres em nutrientes, demonstrando notável rusticidade e adaptabilidade ecológica (Vasas et al., 2015).



Figura 5. Imagens da muda de azedinha, além da face adaxial e abaxial de sua folha.

Fonte: O autor, 2025.

Essas espécies foram selecionadas com base em sua relevância cultural, resistência ambiental e potencial de abrigar microbiotas endofíticas adaptadas a condições adversas. Além de seu valor cultural e adaptabilidade, essas PANCs também se destacam por abrigar comunidades microbianas endofíticas altamente diversificadas. A seguir, será discutida a composição dessa microbiota e sua importância para a bioprospecção de agentes com potencial agrobiotecnológico.

2.3. Diversidade Microbiana e Mecanismos de Interação em PANCs

Além do seu valor ecológico e nutricional, as PANCs são reconhecidas como importantes reservatórios de biodiversidade microbiana (Tabela 1). Pelo fato de não passarem por processos intensivos de melhoramento genético, essas plantas mantêm associações simbióticas naturais com diversos microrganismos, especialmente bactérias e fungos endofíticos (Azevedo, 2014; Bolívar-Anillo et al., 2020).

A composição da microbiota endofítica pode variar conforme a espécie vegetal, o tecido analisado e as condições ambientais nas quais a planta se desenvolve (Harrison and Griffin, 2020). Essa diversidade também pode ser influenciada por fatores como a composição química dos tecidos vegetais, que selecionam microrganismos capazes de metabolizar compostos específicos, tais como flavonoides e taninos (Cruz et al., 2021).

Compreender a diversidade microbiana é apenas o primeiro passo. Para que essas bactérias possam ser exploradas como bioinsumos, é fundamental desvendar os mecanismos pelos quais elas interagem com suas plantas hospedeiras (Mora-Ruiz et al., 2016). Essas relações podem ser mutualísticas, comensais ou latentes, refletindo a complexidade dos vínculos ecológicos. Em geral, as plantas fornecem nutrientes e um ambiente protegido, enquanto os microrganismos influenciam positivamente o metabolismo vegetal, estimulando processos fisiológicos ligados ao crescimento e à defesa (Zhu et al., 2021).

Tabela 1. Bactérias Endofíticas Isoladas de Plantas Hospedeiras Diversas.

Endófitos	Planta hospedeira	Referências
<i>Actinomicetos</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	(Abo-Zaid et al., 2021)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	(Kumar et al., 2022)
<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Glaucum</i>	(Gomes et al., 2023)
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Medicago truncatula</i>	(Kisiel and Miller, 2023)
<i>Bacillus tequilensis (PBE1)</i>	<i>Solanum</i>	(Punetha et al., 2023)
<i>Bacillus velezensis</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	(Abo Elsoud et al., 2023)
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Bhaduri et al., 2015)
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	<i>Vitis vinifera</i>	(Puranik et al., 2022)
<i>Bradyrhizobium</i> sp SUTNa-2	<i>Oryza sativa</i>	(Sohrawardy and Islam, 2022)
<i>Curtobacterium</i> sp SAK 1	<i>Glicina máxima</i>	(Mahgoub et al., 2021)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	(Sun et al., 2020)
<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(González-Ista et al., 2023)
<i>Methylobacterium</i> spp.	<i>Pinus silvestris</i>	(Rúa et al., 2016)
<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Triticum aestivum</i>	(Meinzer, 2023)
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Glicina máxima</i>	(Shahid et al., 2023)
<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Eleusina coracana</i>	(Misganaw et al., 2019)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Sorgo bicolor</i>	(Ryu et al., 2019)
<i>Pseudomonas granadensis T6</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Omomowo and Babalola, 2019)
<i>Pseudomonas harzianum</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Chandoliya et al., 2023)
<i>Pseudomonas Syringae</i>	<i>Cicer arietinum</i>	(Mitra et al., 2021)
<i>Rhizobium radiobacter</i>	<i>Vitis vinifera</i>	(Patil et al., 2017)
<i>Rhizobium larrymoorei</i> E2	<i>Oryza sativa</i>	(Omomowo and Babalola, 2019)
<i>Streptomyces lydicus</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	(Mun et al., 2020)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Zhu et al., 2020)
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Nicotiana tabacum</i>	(Eid et al., 2021)
<i>Terrae de Gordonea</i>	<i>Marina de Avicena</i>	(Omomowo and Babalola, 2023)

Entre os mecanismos de interação destacam-se:

- **Produção de compostos voláteis e metabólitos secundários**, que podem inibir diretamente o crescimento de fitopatógenos ou induzir resistência sistêmica nas plantas hospedeiras (El-Saadony et al., 2022).
- **Síntese de enzimas hidrolíticas**, como proteases e celulasas, capazes de degradar componentes das paredes celulares de fungos patogênicos, dificultando sua colonização (Kim et al., 2022).
- **Competição por nutrientes e espaço**, na qual microrganismos benéficos ocupam nichos ecológicos antes da chegada de patógenos, limitando sua proliferação. Esse efeito é intensificado pela produção de sideróforos, que restringem o acesso de fitopatógenos ao ferro (Ong et al., 2016; Bokhari et al., 2019).
- **Modulação da expressão gênica das plantas**, ativando rotas metabólicas relacionadas à produção de fitoalexinas, substâncias antimicrobianas naturalmente produzidas pelos vegetais (Meena & Kanwar, 2015).

Portanto, a integração entre diversidade microbiana e mecanismos de interação revela o vasto potencial funcional dos microrganismos endofíticos. Essa compreensão é essencial para sua aplicação em programas de bioprospecção, visando ao desenvolvimento de bioinsumos agrícolas eficazes, sustentáveis e capazes de reduzir a dependência de insumos químicos.

2.4. Potencial Biotecnológico das Bactérias Endofíticas

Os microrganismos endofíticos possuem um vasto potencial biotecnológico, com aplicações que extrapolam o controle de pragas e doenças agrícolas. Devido às suas propriedades metabólicas singulares, são capazes de produzir compostos

bioativos com aplicações relevantes na agricultura, na saúde humana e em processos de remediação ambiental (Beemelmanns et al., 2016; Hardoim et al., 2015).

No contexto agrícola, destacam-se por atuarem como agentes de biocontrole, substituindo ou complementando defensivos químicos convencionais. Além disso, contribuem para a promoção do crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios, como o ácido indolacético (AIA), e da solubilização de fosfatos, aumentando a disponibilidade de nutrientes no solo e reduzindo a dependência de fertilizantes minerais (Akintayo et al., 2023).

Sob a perspectiva ambiental, diversas bactérias isoladas de tecidos vegetais apresentam capacidade de degradar compostos orgânicos complexos, demonstrando potencial em processos de biorremediação de solos e águas contaminados por agrotóxicos e metais pesados (Azevedo, 2014; Chattopadhyay et al., 2017). Esse conjunto de atributos torna os microrganismos endofíticos aliados estratégicos no enfrentamento de desafios agrícolas complexos, como doenças fúngicas recorrentes, infestações por insetos-praga e a busca por alternativas menos agressivas ao meio ambiente.

Diversas cepas bacterianas demonstram não apenas capacidade de suprimir patógenos e pragas, mas também de modular o metabolismo vegetal por meio da síntese de metabólitos antimicrobianos, compostos entomotóxicos e voláteis de ampla difusão, consolidando-se como ferramentas promissoras para uma agricultura mais resiliente, produtiva e sustentável.

2.5. Bactérias Endofíticas com Atividade Antifúngica

As doenças de plantas afetam significativamente culturas agrícolas e espécies vegetais silvestres em todo o mundo, representando uma ameaça constante à produtividade e à segurança alimentar (Anderson et al., 2004a; Burketova et al., 2015; Reuveni and Reuveni, 1998). Estima-se que de 10 a 16% da produção global de alimentos seja perdida anualmente em decorrência dessas doenças, tanto no campo quanto no pós-colheita (Chakraborty and Newton, 2011; Ghini et al., 2008; Strange

and Scott, 2005). Diversos agentes patogênicos estão associados a esses prejuízos, incluindo fungos, bactérias, nematoides, protozoários e vírus, sendo os fungos os principais responsáveis, capazes de infectar praticamente todas as partes das plantas raízes, caules, folhas, flores e frutos (Hyde et al., 2009; Manamgoda et al., 2011).

Em países em desenvolvimento, as perdas causadas por fungos fitopatogênicos são ainda mais críticas. Ao longo da história, esses organismos estiveram envolvidos em eventos de crise alimentar, como a requeima da batata (*Phytophthora infestans*), responsável pela devastação de lavouras na Irlanda no século XIX (Strange and Scott, 2005). Outras doenças de alto impacto incluem a podridão-de-karnal no trigo (*Tilletia indica*), a brusone do arroz (*Pyricularia oryzae*), que pode comprometer até 30% da produção anual, além da ferrugem do trigo (*Puccinia graminis*), o carvão do milho (*Ustilago maydis*) e a ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) (Fisher et al., 2012). Árvores florestais também são acometidas por fungos devastadores, como *Cryphonectria parasitica*, causadora da praga do castanheiro, *Ophiostoma ulmi*, responsável pela doença do olmo holandês, e *Hymenoscyphus fraxineus*, agente da morte regressiva do freixo na Europa (Anderson et al., 2004b).

Diante da importância dos fitopatógenos fúngicos, o controle biológico por meio de bactérias endofíticas é uma área de interesse crescente devido à sua eficácia e segurança ambiental. A atividade antifúngica desses microrganismos tem sido amplamente relatada em diversas espécies vegetais (Rojas-Solís et al., 2018). Essa capacidade está relacionada à produção de lipopeptídeos (como surfactinas, iturinas e fengicinas), antibióticos, sideróforos e enzimas hidrolíticas (como quitinases, glucanases e proteases), que afetam diretamente o crescimento de fungos fitopatogênicos (Soliman et al., 2022).

Bacillus amyloliquefaciens FZB42, por exemplo, produz iturina A e fengicina, com forte efeito inibitório sobre *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (Chowdhury et al., 2015). Já *Bacillus subtilis* QST713, empregado comercialmente, apresenta eficácia contra *Botrytis cinerea* e *Alternaria solani*, destacando-se como ferramenta consolidada no manejo de doenças fúngicas (Fravel, 2005). Além disso, cepas de *Streptomyces* isoladas de ambientes vegetais também se mostraram eficazes contra

patógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Lai et al., 2024). A aplicação desses microrganismos como biofungicidas representa uma alternativa sustentável e promissora à substituição dos fungicidas sintéticos.

2.6. Bactérias Endofíticas com Atividade Inseticida

As pragas e os patógenos agrícolas estão entre os principais fatores responsáveis pela redução da produtividade global. Estima-se que causem perdas de até 21,5% no trigo, 30% no arroz, 22,5% no milho e 21,4% na soja (Savary et al., 2019). No Brasil, apenas as pragas de insetos são responsáveis por uma perda média anual de 7,7% da produção, o que equivale a cerca de 25 milhões de toneladas de alimentos e prejuízos econômicos da ordem de US\$ 17,7 bilhões (Simonato et al., 2014). Além disso, as mudanças climáticas vêm agravando esse cenário ao expandir a distribuição geográfica das pragas, aumentar sua sobrevivência durante o inverno e possibilitar mais gerações por safra, especialmente em regiões temperadas produtoras de grãos (Deutsch et al., 2018; Skendžić et al., 2021). O impacto econômico não se limita às perdas diretas, mas inclui também os custos de controle químico e os efeitos colaterais dos pesticidas sobre a saúde humana e ambiental.

Dentre as pragas de maior importância, destaca-se *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), um lepidóptero polífago que afeta principalmente milho e soja, mas também culturas como arroz, algodão e sorgo (Abbas et al., 2022). Seu ciclo de vida acelerado, alta fecundidade e crescente resistência a inseticidas químicos tornam seu manejo particularmente difícil (Tay et al., 2023). Embora o controle químico e o uso de cultivares Bt tenham sido amplamente adotados, a emergência de populações resistentes tem comprometido sua eficácia (Abbas et al., 2022).

Nesse contexto, alternativas sustentáveis, como o uso de microrganismos endofíticos com atividade inseticida, têm ganhado destaque (Sellappan et al., 2023). *Bacillus amyloliquefaciens*, por exemplo, demonstrou reduzir a taxa de crescimento e o consumo de *S. frugiperda* em plantas de milho tratadas, além de aumentar o teor de compostos fenólicos, sugerindo indução de resistência (Sellappan et al., 2022).

Alcaligenes sp. também tem mostrado potencial em melhorar o crescimento vegetal e a tolerância ao estresse biótico causado pela praga. Fungos endofíticos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* reduzem significativamente o desenvolvimento, a fecundidade e a sobrevivência de *S. frugiperda* quando colonizam internamente o tecido vegetal (Altaf et al., 2023; Ramos et al., 2020). Além disso, esses microrganismos ativam enzimas antioxidantes e de defesa nas plantas, fortalecendo a resistência ao inseto (Batool et al., 2024; Sellappan et al., 2023).

Vale ressaltar que a adoção de estratégias sustentáveis não compromete necessariamente a produtividade. Estudos mostram que uma redução de até 42% no uso de pesticidas pode ser alcançada sem impactos negativos na produção agrícola, sendo inclusive benéfica economicamente (Lechenet et al., 2017; Rödiger et al., 2024). Isso reforça a viabilidade e a importância do controle biológico no manejo integrado de pragas.

2.7. Compostos Voláteis com Potencial Bioativo

Os compostos orgânicos voláteis (VOCs, do inglês *volatile organic compounds*) sintetizados por bactérias endofíticas têm se destacado como importantes mediadores nas interações planta-microrganismo-patógeno. Essas moléculas são caracterizadas por sua baixa massa molecular e alta volatilidade, permitindo que atuem mesmo a longas distâncias, sem necessidade de contato direto com o alvo biológico (Rani et al., 2023; Rojas-Solís et al., 2018).

Os VOCs apresentam amplo espectro de atividade bioativa, com efeitos antifúngicos, antibacterianos, inseticidas, nematicidas, bem como capacidade de induzir resistência sistêmica em plantas hospedeiras (Vyas, 2021). Dentre os compostos mais frequentemente identificados destacam-se álcoois, cetonas, aldeídos, terpenos e ésteres, muitos dos quais com propriedades antimicrobianas comprovadas. Sua atuação inclui a inibição da germinação de esporos, a supressão do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos, alterações comportamentais em

insetos-praga e até a modulação de vias hormonais de defesa vegetal (Rani et al., 2023).

Estudos demonstram que cepas de *Bacillus velezensis*, *B. subtilis* e *Streptomyces sp.* são capazes de produzir VOCs com efeito inibitório sobre fungos como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum musae*, *Monilinia fructicola* e *Penicillium italicum* (Gao et al., 2017). Essas substâncias têm sido aplicadas com sucesso em sistemas pós-colheita, reduzindo significativamente a incidência de podridões em frutas como uvas, maçãs, pêssegos e bananas (Zhao et al., 2022).

Além da ação direta sobre patógenos e pragas, os VOCs também desempenham papel importante na sinalização química entre plantas e microrganismos, podendo ativar mecanismos de defesa como a resistência sistêmica adquirida (SAR) ou a resistência sistêmica induzida (ISR) (Rana et al., 2024). Essa propriedade torna os VOCs especialmente promissores para o desenvolvimento de formulações biofumigantes e produtos fitossanitários de baixo impacto ambiental (Rana et al., 2024; Tiwari et al., 2020).

A exploração do potencial dos VOCs produzidos por endófitos representa, portanto, uma das fronteiras mais promissoras da biotecnologia agrícola, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias de proteção vegetal que aliam eficácia biológica, segurança ambiental e sustentabilidade econômica.

Embora os microrganismos cultiváveis já tenham revelado aplicações promissoras, estima-se que a maior parte da diversidade microbiana vegetal ainda permaneça inacessível por métodos tradicionais de cultivo. Nesse sentido, a investigação dos microrganismos não cultiváveis abre novas fronteiras para a descoberta de funcionalidades ainda inexploradas.

2.8. Microrganismos não Cultiváveis

Embora o potencial biotecnológico dos microrganismos cultiváveis seja amplamente reconhecido, grande parte da diversidade microbiana permanece ainda

inexplorada devido às limitações associadas ao cultivo tradicional em laboratório. Essa discrepância, conhecida como "A Grande Anomalia da Contagem de Colônias" (The Great Plate Count Anomaly), evidencia a diferença significativa entre células visualizadas diretamente em microscopia e aquelas capazes de crescer em meios artificiais (Amann, 1911; Staley and Konopka, 1985).

O advento das técnicas moleculares permitiu um acesso direto ao DNA microbiano de amostras ambientais, independentemente da capacidade de cultivo. Essas abordagens têm revelado uma diversidade bacteriana até então desconhecida, incluindo numerosos filos ainda sem representantes cultivados, como o filo candidato "TM7" (Werner et al., 2012).

Para contornar as limitações tradicionais, estratégias alternativas têm sido desenvolvidas, tais como o uso de substratos ambientais específicos, co-cultivos e técnicas de diluição até extinção, facilitando o isolamento e cultivo parcial de espécies antes inacessíveis (Stewart, 2012). Além disso, a aplicação de consórcios microbianos, em que múltiplas espécies atuam conjuntamente, frequentemente resulta em desempenhos superiores em processos industriais e ambientais, incluindo biocontrole, produção de bioetanol e biorremediação (Hays et al., 2015). A integração dessas abordagens metodológicas é fundamental para explorar plenamente o potencial funcional e biotecnológico dos microrganismos não cultiváveis, especialmente no contexto das PANCs.

2.9. Microrganismos Não Cultiváveis: Perspectivas Moleculares

O desenvolvimento das abordagens moleculares independentes de cultivo revolucionou o estudo da microbiota ambiental, proporcionando acesso direto à diversidade microbiana através do sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA. Devido à sua alta variabilidade entre espécies bacterianas, este gene é amplamente utilizado para a identificação e caracterização taxonômica detalhada das comunidades microbianas (Amann et al., 1995; Woese, 1987).

Uma das técnicas mais aplicadas é o sequenciamento de amplicons, no qual regiões específicas do gene 16S rRNA são amplificadas por PCR e sequenciadas em plataformas de alto rendimento, como Illumina e Ion Torrent. Entretanto, desafios como a contaminação com DNA vegetal podem interferir na amplificação, mascarando a real diversidade bacteriana nas amostras (Lefèvre et al., 2020; Lundberg et al., 2013). Para solucionar esse problema, têm sido empregados métodos como o uso de PNA-DNA clamps, sondas específicas que bloqueiam seletivamente a amplificação do DNA hospedeiro, melhorando significativamente a detecção da microbiota-alvo (Viquez-R et al., 2020).

Complementarmente, a metagenômica, que consiste no sequenciamento direto do DNA total de uma amostra ambiental sem etapas prévias de amplificação específica, possibilita não apenas a identificação taxonômica detalhada como também análises funcionais das vias metabólicas e potenciais biológicos das comunidades microbianas (Stewart, 2012). Paralelamente, ferramentas bioinformáticas sofisticadas, como QIIME, MOTHUR, DADA2 e PICRUSt, facilitam a interpretação dos dados gerados, permitindo tanto a caracterização precisa da diversidade taxonômica quanto a predição das funcionalidades metabólicas associadas (Callahan et al., 2016; Caporaso et al., 2010).

A combinação dessas técnicas moleculares e analíticas representa uma estratégia abrangente e eficaz para a caracterização detalhada dos microrganismos não cultiváveis, oferecendo novas oportunidades para a aplicação sustentável desses recursos em áreas como agricultura, medicina e meio ambiente (Hays et al., 2015; Stewart, 2012).

2.10. Abordagens Ômicas na Bioprospecção Microbiana

A crescente complexidade na compreensão das interações planta-microrganismo impulsionou o uso de ferramentas ômicas como parte essencial da bioprospecção microbiana (Jain et al., 2024). As abordagens genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica oferecem uma visão sistêmica e

integrada do funcionamento dos microrganismos endofíticos, permitindo não apenas sua identificação, mas também a caracterização funcional de seus metabólitos e rotas metabólicas (Gupta et al., 2022; Jain et al., 2024)

As abordagens ômicas têm se mostrado fundamentais para a compreensão funcional de microrganismos endofíticos. A genômica e a metagenômica, por meio do sequenciamento de nova geração (NGS), permitem identificar genes relacionados à produção de compostos bioativos e à interação com a planta hospedeira, inclusive em microrganismos não cultiváveis (Satam et al., 2023). A transcriptômica complementa essa análise ao revelar genes expressos em situações específicas, como na presença de patógenos (Raad et al., 2019). Já a proteômica e a metabolômica possibilitam a identificação de proteínas e metabólitos secundários, como enzimas, lipopeptídeos e compostos voláteis, com potencial aplicação em bioinoculantes e agentes de biocontrole (Shen et al., 2023).

Portanto, o uso de abordagens ômicas integradas representa uma das mais promissoras estratégias para acelerar a descoberta e aplicação de bioinsumos microbianos sustentáveis, especialmente a partir de fontes alternativas como as Plantas Alimentícias Não Convencionais.

3. REFERENCIAS

ABBAS, A. *et al.* Biological Control of Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Agronomy** **2022**, Vol. **12**, Page **2704**, v. 12, n. 11, p. 2704, 31 out. 2022.

ABO ELSOUD, M. M.; HASAN, S. F.; ELHATEIR, M. M. Optimization of Indole-3-acetic acid production by *Bacillus velezensis* isolated from *Pyrus* rhizosphere and its effect on plant growth. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102714, 1 jul. 2023.

ABO-ZAID, G. *et al.* Application of Bio-Friendly Formulations of Chitinase-Producing *Streptomyces cellulosa* Actino 48 for Controlling Peanut Soil-Borne Diseases Caused by *Sclerotium rolfsii*. **Journal of Fungi** **2021**, Vol. **7**, Page **167**, v. 7, n. 3, p. 167, 25 fev. 2021.

AKINTAYO, S. O. *et al.* Characterization of antifungal properties of lipopeptide-producing *Bacillus velezensis* strains and their proteome-based response to the phytopathogens, *Diaporthe* spp. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.

ALIBRANDI, P. *et al.* Diversity and Structure of the Endophytic Bacterial Communities Associated With Three Terrestrial Orchid Species as Revealed by 16S rRNA Gene Metabarcoding. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 604964, 15 dez. 2020.

ALTAF, N. *et al.* Endophytic Colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in Maize Plants Affects the Fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Microorganisms** **2023**, Vol. **11**, Page **1067**, v. 11, n. 4, p. 1067, 19 abr. 2023.

AMANN, J. Die direkte Zählung der Wasserbakterien mittels des Ultramikroskops. **Centralbl. f. Bakteriol.**, v. 29, p. 381–384, 1911.

AMANN, R. L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, mar. 1995.

ANDERSON, P. K. *et al.* Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 10, p. 535–544, 1 out. 2004a.

_____. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 10, p. 535–544, 1 out. 2004b.

AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. *Em: Microbial diversity and biotechnology in food security*. [s.l.] Springer, 2014. p. 17–22.

BATOOL, R. *et al.* Endophytic Fungi-Mediated Defense Signaling in Maize: Unraveling the Role of WRKY36 in Regulating Immunity against *Spodoptera frugiperda*. **Physiologia Plantarum**, v. 176, n. 2, p. e14243, 1 mar. 2024.

BEEMELMANN, C. *et al.* Natural products from microbes associated with insects. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 12, n. 1, p. 314–327, 2016.

BHADURI, D. *et al.* Soil Quality and Plant-Microbe Interactions in the Rhizosphere. p. 307–335, 2015.

BIONDO, E. *et al.* Diversidade e potencial de utilização de plantas alimentícias não convencionais no Vale do Taquari, RS. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 4, n. 1, p. 61–90, 2018.

BOKHARI, A. *et al.* Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18154, 2019.

BOLÍVAR-ANILLO, H. J.; GARRIDO, C.; COLLADO, I. G. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 3, p. 721–740, 2020.

BURKETOVA, L. *et al.* Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 994–1004, 1 nov. 2015.

CALLAHAN, B. J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods** **2016 13:7**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 23 maio 2016.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods** **2010 7:5**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 11 abr. 2010.

CHAKRABORTY, S.; NEWTON, A. C. Climate change, plant diseases and food security: an overview. **Plant Pathology**, v. 60, n. 1, p. 2–14, 1 fev. 2011.

CHANDOLIYA, R.; SHARMA, S.; SHARMA, V. Role of microbial oxidative enzymes in biological control of plant pathogens. **Microbial Oxidative Enzymes: Biotechnological Applications**, p. 129–154, 31 dez. 2023.

CHATTOPADHYAY, P.; BANERJEE, G.; MUKHERJEE, S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

CHOWDHURY, S. P. *et al.* Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JUL, p. 137829, 28 jul. 2015.

CORDEIRO, S. Z. **Pereskia aculeata**.

CRUZ, T. M. *et al.* Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130078, 2021.

DEMATTI, M.; COAN, R. M. Jardins com plantas medicinais. **Jaboticabal: Funep**, 1999.

DEUTSCH, C. A. *et al.* Increase in crop losses to insect pests in a warming climate. **Science**, v. 361, n. 6405, p. 916–919, 31 ago. 2018.

EID, A. M. *et al.* Harnessing Bacterial Endophytes for Promotion of Plant Growth and Biotechnological Applications: An Overview. **Plants 2021, Vol. 10, Page 935**, v. 10, n. 5, p. 935, 7 maio 2021.

EL-SAADONY, M. T. *et al.* Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 923880, 6 out. 2022.

FEITOSA, M. **Almeirão-roxo**.

FISHER, M. C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature 2012 484:7393**, v. 484, n. 7393, p. 186–194, 11 abr. 2012.

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. Volume 43, 2005, p. 337–359, 28 jul. 2005.

GAO, Z. *et al.* Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 105, p. 27–39, 1 fev. 2017.

GHINI, R.; HAMADA, E.; BETTIOL, W. Climate change and plant diseases. **Scientia Agricola**, v. 65, n. SPEC. ISS., p. 98–107, dez. 2008.

GOMES, E. A. *et al.* Role of Phosphate Solubilizing Microbes on Phosphorous Availability and Yield Attributes of Millet. p. 195–211, 2023.

GONZÁLEZ-ISTA, N. S. *et al.* Comparison of the Rhizobacteria *Serratia* sp. H6 and *Enterobacter* sp. L7 on *Arabidopsis thaliana* Growth Promotion. **Current Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1–11, 1 abr. 2023.

GUPTA, S.; SCHILLACI, M.; ROESSNER, U. Metabolomics as an emerging tool to study plant–microbe interactions. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 6, n. 2, p. 175–183, 13 abr. 2022.

HARDOIM, P. R. *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HARRISON, J. G.; GRIFFIN, E. A. The diversity and distribution of endophytes across biomes, plant phylogeny and host tissues: how far have we come and where do we go from here? **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2107–2123, 1 jun. 2020.

HAYS, S. G. *et al.* Better together: engineering and application of microbial symbioses. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 40–49, 1 dez. 2015.

HYDE, K. *et al.* Colletotrichum—names in current use. 2009.

JAIN, A. *et al.* Omics approaches in understanding the benefits of plant-microbe interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1391059, 27 maio 2024.

KELEN, M. E. B. *et al.* Plantas alimentícias não convencionais (PANCs): hortaliças espontâneas e nativas. **Porto Alegre: UFRGS**, 2015.

KIM, J. A. *et al.* *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a Promising Agent for Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, 1 out. 2022.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS. 2007.

_____. **Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANCs): uma Riqueza Negligenciada.** [s.l.: s.n.].

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. J. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas.** [s.l.: s.n.].

KISIEL, A.; MILLER, T. Oxidative Status of Medicago truncatula Seedlings after Inoculation with Rhizobacteria of the Genus Pseudomonas, Paenibacillus and Sinorhizobium. **International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 4781**, v. 24, n. 5, p. 4781, 1 mar. 2023.

KUMAR, S. *et al.* Psychrophilic microbes: Biodiversity, beneficial role and improvement of cold stress in crop plants. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Sustainable Agriculture: Microorganisms as Biostimulants**, p. 177–198, 1 jan. 2022.

LAI, J. *et al.* Inhibitory mechanism of 4-ethyl-1,2-dimethoxybenzene produced by Streptomyces albidoflavus strain ML27 against Colletotrichum gloeosporioides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 204, p. 106086, 1 set. 2024.

LECHENET, M. *et al.* Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. **Nature Plants 2017 3:3**, v. 3, n. 3, p. 1–6, 1 mar. 2017.

LEFÈVRE, E.; GARDNER, C. M.; GUNSCH, C. K. A novel PCR-clamping assay reducing plant host DNA amplification significantly improves prokaryotic endo-microbiome community characterization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 7, p. 110, 1 jul. 2020.

LIBERATO, P. DA S.; LIMA, D. V. T. DE; SILVA, G. M. B. DA. PANCs-Plantas alimentícias não convencionais e seus benefícios nutricionais. **Environmental smoke**, v. 2, n. 2, p. 102–111, 2019.

LUNDBERG, D. S. *et al.* Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. **Nature Methods**, v. 10, n. 10, p. 999–1002, 2013.

MAHGOUB, H. A. M. *et al.* Biotechnological application of plant growth-promoting endophytic bacteria isolated from halophytic plants to ameliorate salinity tolerance of *Vicia faba* L. **Plant Biotechnology Reports** 2021 15:6, v. 15, n. 6, p. 819–843, 15 out. 2021.

MALEKI, N. *et al.* Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2–3, p. 213–218, 2001.

MANAMGODA, D. S. *et al.* *Cochliobolus*: an overview and current status of species. **Fungal Diversity** 2011 51:1, v. 51, n. 1, p. 3–42, 15 nov. 2011.

MARSARO JÚNIOR, A. L. *et al.* First report of natural infestation of *Pereskia aculeata* Mill., (Cactaceae) by *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in Brazil. 2011.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 473050, 1 jan. 2015.

MEINZER, M. A. Halophilic Genes that Impact Plant Growth in Saline Soils. 2023.

MISGANAW, G.; SIMACHEW, A.; GESSESSE, A. Endophytes of finger millet (*Eleusine coracana*) seeds. **Symbiosis**, v. 78, n. 3, p. 203–213, 15 jul. 2019.

MITRA, D. *et al.* Impacts of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Rice Growth, Development, and Stress Management With a Particular Emphasis on Strigolactone Effects on Root Development. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 52, n. 14, p. 1591–1621, 6 ago. 2021.

MONGE, M.; NORBERT KILIAN, A.; JOÃO SEMIR. Dois novos registros de *Lactuca* L. (Cichorieae, Asteraceae) na América do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, 2016.

MORALES-CEDEÑO, L. R. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126612, 1 jan. 2021.

MORA-RUIZ, M. DEL R. *et al.* Endophytic microbial diversity of the halophyte *Arthrocnemum macrostachyum* across plant compartments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 9, p. fiw145, 1 set. 2016.

MUHAMMAD, M. *et al.* Harnessing bacterial endophytes for environmental resilience and agricultural sustainability. **Journal of Environmental Management**, v. 368, p. 122201, 2024.

MUN, B. G. *et al.* *Streptomyces* sp. LH 4 promotes plant growth and resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in cucumber via modulation of enzymatic and defense pathways. **Plant and Soil**, v. 448, n. 1–2, p. 87–103, 1 mar. 2020.

NAGHIBI, F. *et al.* Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. 2005.

OMOMOWO, I. O.; BABALOLA, O. O. **Improving Cowpea production in North West Province using endophytic bacteria and fungi**, 2023. . Acesso em: 4 abr. 2025

OMOMOWO, O. I.; BABALOLA, O. O. Bacterial and Fungal Endophytes: Tiny Giants with Immense Beneficial Potential for Plant Growth and Sustainable Agricultural Productivity. **Microorganisms** 2019, Vol. 7, Page 481, v. 7, n. 11, p. 481, 23 out. 2019.

ONG, K. S. *et al.* *Burkholderia paludis* sp. nov., an antibiotic-siderophore producing novel *Burkholderia cepacia* complex species, isolated from malaysian tropical peat swamp soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. DEC, p. 229531, 21 dez. 2016.

PATIL, A. *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobium: Mechanisms and Biotechnological Prospective. p. 105–134, 2017.

PINTÃO, A. M. *et al.* In vitro and in vivo antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. **Planta Medica**, v. 61, n. 03, p. 233–236, 1995.

PUNETHA, A. *et al.* Role of hidden microbes in sustainable agriculture. **Advanced Microbial Technology for Sustainable Agriculture and Environment**, p. 103–117, 1 jan. 2023.

PURANIK, S.; SINGH, S. K.; SHUKLA, L. An Insight to Cold-Adapted Microorganisms and their Importance in Agriculture. **Survival Strategies in Coldadapted Microorganisms**, p. 379–411, 1 jan. 2022.

QUEIROZ, C. R. A. DOS A. Cultivo e composição química de *Ora-pro-nóbis* (*Pereskia aculeata* Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo. 2012.

RAAD, M. *et al.* Transcriptional reprogramming of arabidopsis thaliana defence pathways by the entomopathogen *beauveria bassiana* correlates with resistance against a fungal pathogen but not against insects. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAR, p. 438959, 29 mar. 2019.

RAMOS, Y. *et al.* Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1–6, 1 dez. 2020.

RANA, A. *et al.* Volatile organic compounds of the soil bacterium *Bacillus halotolerans* suppress pathogens and elicit defense-responsive genes in plants. **Microbiological Research**, v. 281, p. 127611, 1 abr. 2024.

RANI, A. *et al.* Bacterial volatile organic compounds as biopesticides, growth promoters and plant-defense elicitors: Current understanding and future scope. **Biotechnology Advances**, v. 63, p. 108078, 1 mar. 2023.

RANIERI, G. R. *et al.* Guia prático sobre PANCs: plantas alimentícias não convencionais. **São Paulo: Instituto Kairós**, 2017.

REUVENI, R.; REUVENI, M. Foliar-fertilizer therapy — a concept in integrated pest management. **Crop Protection**, v. 17, n. 2, p. 111–118, 1 mar. 1998.

RIBEIRO, T. P. S.; DURIGAN, M. F. B. Produtos alimentícios a base de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) como oportunidade a agroindústria. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 11, n. 01, p. 241–250, 2018.

RÖDIGER, M. *et al.* How does pesticide reduction affect labour time and profitability? A crop production case study. **Agricultural Systems**, v. 220, p. 104101, 1 out. 2024.

RODRIGUES, L. DA S. *et al.* Mineral and trace element analysis of non-conventional food plants using ICP OES and chemometric techniques. **Food Chemistry**, v. 472, p. 142854, 2025.

ROJAS-SOLÍS, D. *et al.* *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 46–52, 1 jan. 2018.

RÚA, M. A. *et al.* Associations between ectomycorrhizal fungi and bacterial needle endophytes in *Pinus radiata*: Implications for biotic selection of microbial communities. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 179406, 31 mar. 2016.

RYU, M. H. *et al.* Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. **Nature Microbiology** 2019 5:2, v. 5, n. 2, p. 314–330, 16 dez. 2019.

SANGALLI, A. CAMPUS DE DOURADOS PROGRAMA DE MESTRADO EM AGRONOMIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO VEGETAL. 2003.

SARTORI, V. C. *et al.* Plantas Alimentícias Não Convencionais-PANC: resgatando a soberania alimentar e nutricional. 2020.

SATAM, H. *et al.* Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. **Biology** 2023, Vol. 12, Page 997, v. 12, n. 7, p. 997, 13 jul. 2023.

SAVARY, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution** 2019 3:3, v. 3, n. 3, p. 430–439, 4 fev. 2019.

SELLAPPAN, R. *et al.* Maize Apoplastic Fluid Bacteria Alter Feeding Characteristics of Herbivore (*Spodoptera frugiperda*) in Maize. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1850, 1 set. 2022.

SELLAPPAN, R.; THANGAVEL, K.; UTHANDI, S. Bioprotective potential of maize apoplastic fluid bacterium (*Bacillus amyloliquefaciens*) and arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus intraradices*) against *Spodoptera frugiperda* infestation in maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 127, p. 102050, 1 set. 2023.

SHAHID, M.; KHAN, M. S.; SINGH, U. B. Pesticide-tolerant microbial consortia: Potential candidates for remediation/clean-up of pesticide-contaminated agricultural soil. **Environmental Research**, v. 236, p. 116724, 1 nov. 2023.

SHEHATA, H. R. *et al.* Niche specificity and functional diversity of the bacterial communities associated with *Ginkgo biloba* and *Panax quinquefolius*. **Scientific Reports** **2021** **11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 24 maio 2021.

SHEN, S. *et al.* Metabolomics-centered mining of plant metabolic diversity and function: Past decade and future perspectives. **Molecular Plant**, v. 16, n. 1, p. 43–63, 2 jan. 2023.

SILVA, N. I. DE *et al.* Use of endophytes as biocontrol agents. **Fungal Biology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 133–148, 1 mar. 2019.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. DE. Controle Biológico de Insetos-Praga na Soja. 2014.

SKENDŽIĆ, S. *et al.* The Impact of Climate Change on Agricultural Insect Pests. **Insects** **2021**, Vol. 12, Page 440, v. 12, n. 5, p. 440, 12 maio 2021.

SOCCOL, C. R. *et al.* Bioprospecting lipid-producing microorganisms: From metagenomic-assisted isolation techniques to industrial application and innovations. **Bioresource Technology**, v. 346, p. 126455, 2022.

SOHRAWARDY, H.; ISLAM, T. Plant Endophytes in Growth Promotion and Sustainable Management of Crop Pests. **Biostimulants for Crop Production and Sustainable Agriculture**, p. 429–454, 9 out. 2022.

SOLIMAN, S. A.; KHALEIL, M. M.; METWALLY, R. A. Evaluation of the Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. velezensis* and Characterization of the Bioactive Secondary Metabolites Produced against Plant Pathogenic Fungi. **Biology** **2022**, Vol. 11, Page 1390, v. 11, n. 10, p. 1390, 23 set. 2022.

SOUTO, A. A. **Process of obtainment of trans-resveratrol and/or emodin and nutraceutical compositions containing them**Google Patents, , 12 jul. 2011.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual review of microbiology**, v. 39, n. 1, p. 321–346, 1985.

STEWART, E. J. Growing unculturable bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151–4160, ago. 2012.

STRANGE, R. N.; SCOTT, P. R. Plant disease: A threat to global food security. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, n. Volume 43, 2005, p. 83–116, 28 jul. 2005.

SUN, Z. B. *et al.* Biology and applications of *Clonostachys rosea*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 486–495, 1 set. 2020.

TAY, W. T. *et al.* Spodoptera frugiperda: Ecology, Evolution, and Management Options of an Invasive Species. **Annual Review of Entomology**, v. 68, n. Volume 68, 2023, p. 299–317, 23 jan. 2023.

TEIXEIRA, B. A. Bioprodução de fitoquímicos em plantas alimentícias não convencionais (PANC) nas quatro estações do ano. **Orientador: Lanamar de Almeida Carlos**, v. 51, 2018.

TELLES, C. C. *et al.* **Plantas Para o Futuro-região Centro-oeste Pereskia aculeata Ora-pro-nobis**. [s.l: s.n.].

TIWARI, S. *et al.* Volatile organic compounds (VOCs): Biomarkers for quality management of horticultural commodities during storage through e-sensing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 106, p. 417–433, 1 dez. 2020.

TOLRÀ, R. P. *et al.* Aluminium-induced changes in the profiles of both organic acids and phenolic substances underlie Al tolerance in *Rumex acetosa* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, n. 3, p. 231–238, 2005.

VASAS, A.; ORBÁN-GYAPAI, O.; HOHMANN, J. The Genus *Rumex*: Review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 198–228, 2015.

VÍQUEZ-R, L. *et al.* Jumping the green wall: The use of PNA-DNA clamps to enhance microbiome sampling depth in wildlife microbiome research. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 20, p. 11779–11786, 1 out. 2020.

VYAS, P. Endophytic microbes: an array of organic volatiles and secondary metabolites. **Volatiles and Metabolites of Microbes**, p. 105–141, 1 jan. 2021.

WERNER, J. J. *et al.* Impact of training sets on classification of high-throughput bacterial 16s rRNA gene surveys. **The ISME Journal**, v. 6, n. 1, p. 94–103, 1 jan. 2012.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987.

XIAO, X. *et al.* Two cultivated legume plants reveal the enrichment process of the microbiome in the rhizocompartments. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 6, p. 1641–1651, 1 mar. 2017.

ZAPPI, D. C. *et al.* Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

ZARDO, A. *et al.* LEVANTAMENTO DE INFORMAÇÕES ETNOBOTÂNICAS, ETNOFARMACOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS REGISTRADAS NA LITERATURA SOBRE *Tropaeolum majus* L. (CHAGUINHA). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, 30 mar. 2016.

ZHAO, X. *et al.* Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 922450, 15 jul. 2022.

ZHU, D. *et al.* Recent Development of Extremophilic Bacteria and Their Application in Biorefinery. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 528448, 12 jun. 2020.

ZHU, J. *et al.* Seasonal Dynamics and Persistency of Endophyte Communities in *Kalidium schrenkianum* Shifts Under Radiation Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 778327, 16 dez. 2021.

CAPÍTULO 2 - Diversidade Microbiana Endofítica em Folhas de PANCs: Análise Taxonômica, Núcleo Microbiano e Potencial Biotecnológico

RESUMO - A crescente busca por soluções sustentáveis na agricultura tem impulsionado o interesse pela diversidade microbiana associada a plantas, especialmente às Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs). Microrganismos endofíticos presentes nas folhas dessas espécies podem desempenhar papéis-chave na promoção do crescimento vegetal e na proteção contra estresses bióticos. Este capítulo abordou a diversidade microbiana associada às faces superior e inferior das folhas de PANCs, com foco na caracterização taxonômica, avaliação da diversidade alfa e identificação do núcleo microbiano. A análise foi realizada a partir do sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA, com processamento no QIIME2 e análises complementares no MicrobiomeAnalyst. Os resultados revelaram comunidades bacterianas diversas e semelhantes entre as duas regiões foliares, tanto em termos de riqueza quanto de diversidade, com predominância de famílias como Microbacteriaceae, Caulobacteraceae, Xanthomonadaceae e Sphingomonadaceae. A composição do núcleo microbiano, identificada com base em prevalência e abundância relativa, evidenciou grupos bacterianos com potencial biotecnológico, incluindo os gêneros *Pseudonocardia*, *Mycobacterium* e *Niabella*, conhecidos pela produção de metabólitos antimicrobianos e enzimas de interesse agrícola. A análise de agrupamento hierárquico indicou maior influência da espécie vegetal na estrutura da comunidade do que da posição foliar. Estes achados reforçam o valor das PANCs como reservatórios de microrganismos promissores para o desenvolvimento de bioinsumos e práticas sustentáveis na agricultura.

Palavras-chave: Fitopatógeno; antifúngico; VOCs.

1. INTRODUÇÃO

As plantas mantêm interações íntimas com uma ampla gama de microrganismos, que colonizam seus tecidos de forma epifítica e endofítica. Entre estes, os microrganismos endofíticos, especialmente as bactérias, desempenham funções essenciais na saúde, no desenvolvimento e na adaptação das plantas ao ambiente, incluindo a promoção do crescimento vegetal, a indução de resistência sistêmica e a proteção contra patógenos e pragas (Compant et al., 2019; Hardoim et al., 2015).

A distribuição e composição das comunidades endofíticas variam conforme o tecido vegetal analisado, a espécie da planta hospedeira e as condições ambientais, sendo também influenciadas por características morfofisiológicas específicas das folhas, como a presença de tricomas, espessura da cutícula e densidade estomática (Berg et al., 2014; Maignien et al., 2014).

A diversidade microbiana associada às folhas, em especial, tem recebido crescente atenção por constituir um nicho ecológico diferenciado. A região foliar representa um microambiente dinâmico, sujeito a intensas flutuações de temperatura, radiação UV e umidade relativa, fatores que influenciam diretamente a colonização e permanência microbiana (Vorholt, 2012). Estudos têm demonstrado que diferentes partes da planta abrigam comunidades microbianas distintas, tanto em composição taxonômica quanto em diversidade funcional (Hunter et al., 2010; Kembel et al., 2014). Por exemplo, folhas localizadas na região inferior das plantas “folhas do baixeiro” geralmente apresentam condições mais estáveis de umidade, sombreamento e são mais próximas ao solo, podendo favorecer uma maior riqueza e diversidade microbiana em comparação com folhas da região superior, mais expostas a fatores ambientais adversos, como maior exposição a radiação solar, maior intensidade de vento e microclimas diferenciados (Remus-Emsermann et al., 2014).

Nesse cenário, as Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs) surgem como modelos promissores para a bioprospecção de comunidades endofíticas com potencial biotecnológico, uma vez que apresentam características marcantes de

rusticidade, adaptação a solos com baixa fertilidade e produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Bolívar-Anillo et al., 2020; Kinupp and Lorenzi, 2014). Além disso, o estudo detalhado da microbiota nativa dessas plantas pode revelar novos táxons microbianos com aplicações em biofertilização, biocontrole e desenvolvimento de formulações sustentáveis para a agricultura.

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) e ferramentas bioinformáticas robustas como o QIIME2, tornou-se possível acessar de forma abrangente a diversidade microbiana presente em tecidos vegetais, incluindo organismos não cultiváveis (Bolyen et al., 2019). Estratégias como análises de diversidade alfa e identificação do núcleo microbiano (core microbiome) permitem não apenas descrever a composição das comunidades, mas também destacar táxons recorrentes que podem desempenhar funções essenciais para a planta hospedeira (Carrión et al., 2019; Compant et al., 2021).

Nesse contexto, a caracterização da microbiota endofítica associada às regiões superior e inferior das PANCs contribui para ampliar o entendimento das interações planta-microrganismo em espécies pouco exploradas, permitindo a identificação de comunidades microbianas com potencial para utilização em estratégias de manejo agrícola sustentável.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do Material Vegetal

As folhas das PANCs utilizadas neste estudo, foram coletadas na horta experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) localizada na cidade de Jaboticabal/SP (Figura 1). As PANCs foram selecionadas com base na disponibilidade das espécies no momento da coleta.

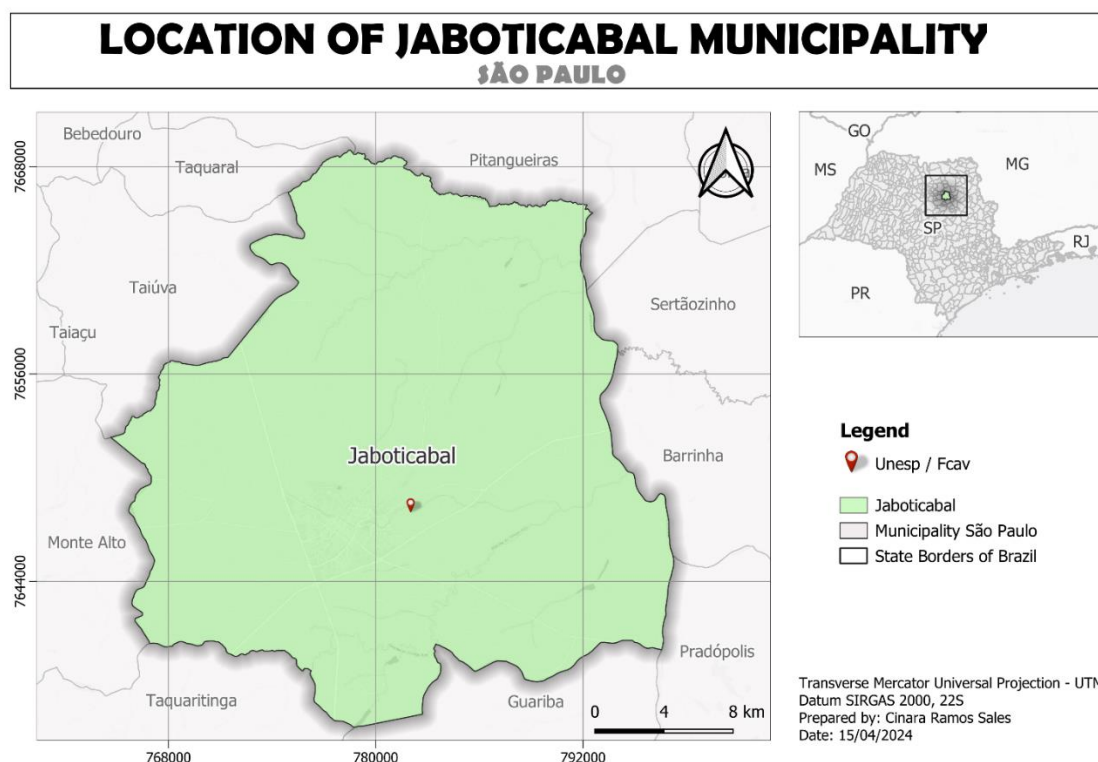


Figura 1. Mapa de localização do ponto de coleta. Limites municipais e estaduais (IBGE, 2023). Coordenadas do ponto de coleta: Horta (21°14'38.4"S 48°17'08.6"W). Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras foram identificadas com o nome científico e comum (Tabela 1) de cada planta e acondicionadas em sacos plásticos devidamente selados, evitando contaminação e perda da microbiota. Foram coletadas seis folhas da região superior e seis folhas da região inferior de cada planta (Figura 2).

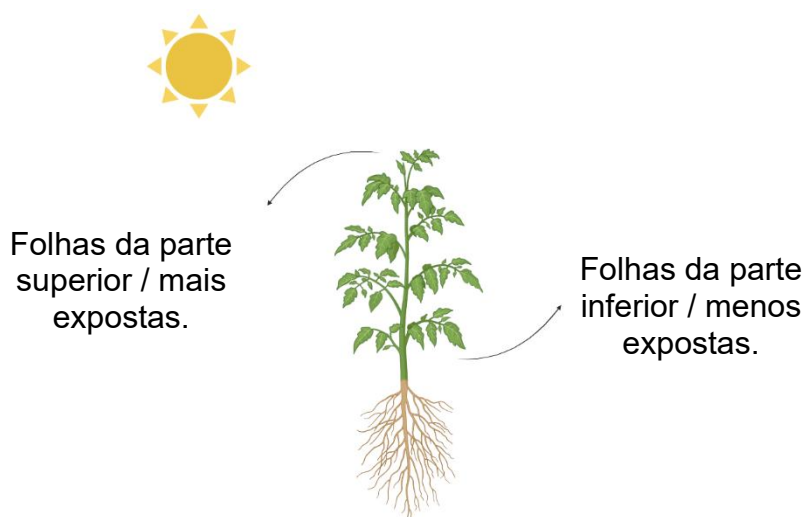


Figura 2. Representação gráfica da parte da planta onde as folhas foram coletadas.

As folhas foram transportadas em caixas térmicas para o laboratório de microbiologia logo após a coleta, assegurando a integridade e viabilidade das amostras até o processamento para o isolamento das bactérias endofíticas.

Tabela 1. Nomes comuns e científicos das PANCs coletadas para isolamento bacteriano da microbiota endofítica.

Panc	Nome comum	Nome Científico
Panc 01	Peixinho-da-horta	<i>Stachys byzantina</i>
Panc 02	Almeirão-roxo	<i>Lactuca indica L.</i>
Panc 03	Ora-pro-nóbis	<i>Pereskia aculeata</i>
Panc 04	Capuchinha	<i>Tropaeolum majus</i>
Panc 05	Azedinha	<i>Rumex acetosa L</i>

2.2. Isolamento das Bactérias Endofíticas

No laboratório, as folhas foram submetidas a um procedimento de desinfecção superficial para eliminação de microrganismos epifíticos. Inicialmente, as folhas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, as folhas foram desinfetadas utilizando uma sequência de tratamentos: imersão em álcool 70% por 1 minuto,

seguido de hipoclorito de sódio a 3% por 3 minutos, e novamente em álcool 70% por 30 segundos (Araújo et al., 2001). O excesso de álcool foi removido com três lavagens em água destilada e esterilizada. Alíquotas da água utilizada no último enxágue foram plaqueadas sobre meio LB para avaliar a eficiência da desinfecção superficial.

Após a desinfecção, as bordas das folhas foram descartadas, e fragmentos internos foram selecionados para o isolamento. Os fragmentos esterilizados na superfície foram macerados em um almofariz com um pistilo usando 5 ml de tampão PBS (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 [pH 7,4]), este homogeneizado (Figura 3) foi então utilizado no isolamento bacteriano, que ocorreu por meio de sucessivas diluições 1:10 em tampão PSB e plaqueamento de 100 μL em placas de Petri contendo os meios meio Luria Bertani (LB) e Nutrient Broth (NB) suplementados com de cicloheximida a 0,01% para prevenir o crescimento de fungos.

Posteriormente, as placas foram incubadas a 30° C até a visualização das colônias. Estas foram caracterizadas pelo aspecto morfológico, coletadas, multiplicadas em meio LB líquido, transferidas para microtubos contendo glicerol na proporção de 20% e armazenadas em ultra freezers a -80°C.

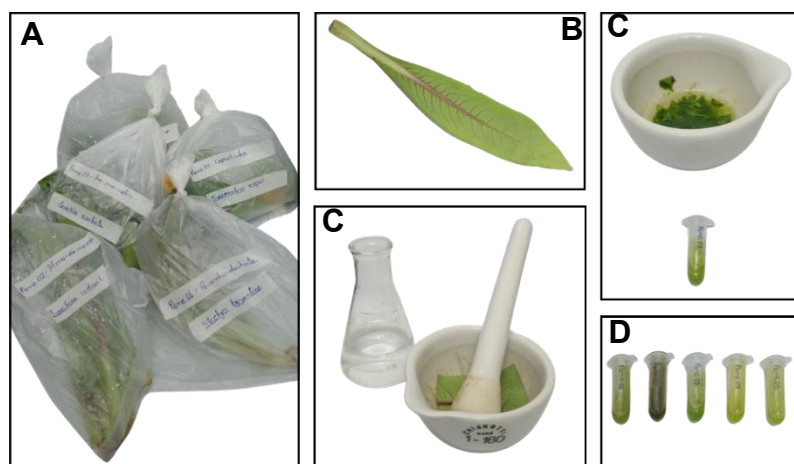


Figura 3. Representação das etapas metodológicas para isolamento de bactérias endofíticas das folhas de PANCs: **A.** coleta e acondicionamento das folhas em sacos plásticos devidamente identificados, **B.** folhas desinfestadas, **C.** maceração em almofariz com tampão PBS e **D.** diluição seriada do extrato obtido para o isolamento bacteriano em meios de cultivo.

2.3. Preparação do Material Vegetal e Extração de DNA total de folhas

Para a extração do DNA total do tecido foliar foram utilizadas as seguintes amostras de PANCS: *Stachys byzantina* (Peixinho-da-horta), *Lactuca indica* L. (Almeirão-roxo), *Pereskia aculeata* (Ora-pro-nóbis), *Tropaeolum majus* (Capuchinha) e *Rumex acetosa* L (Azedinha), as folhas da parte superior e inferior de cada planta, foram coletadas horas antes da extração na horta da FCAV. As folhas foram desinfectadas seguindo o mesmo procedimento descrito no “item 2.2”, para remoção da comunidade microbiana epifítica das superfícies foliares. As folhas foram maceradas com pistilo e cadinho em nitrogênio líquido, cerca de 100mg do material macerado foi utilizado para a extração de DNA total. O DNA total foi extraído utilizando-se o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) seguindo-se todas as recomendações do fabricante. A integridade do DNA metagenômico extraído de todas as amostras foi estimada em gel de agarose a 1%, em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). Uma alíquota de 5 µl da solução de DNA metagenômico, mais 1 µl de safer dye (Kasvi) foi submetido à eletroforese. A análise foi realizada em uma cuba (modelo Max Cell EC 360M) e tampão TBE durante aproximadamente 2h, à voltagem constante de 90 V. Os géis foram visualizados e documentados em GEL DOC Universal Hood II - BIO-RAD. A concentração de DNA foi feita no aparelho Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies) com o kit Qubit™ DNA BR Assay Kit (Invitrogen®) seguindo-se as recomendações do fabricante.

2.4. Construção da biblioteca e sequenciamento

A diversidade microbiana das folhas foi avaliada através do sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA. O preparo da biblioteca foi feito de acordo com o protocolo 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation – Illumina. Para o preparo das bibliotecas seguiu-se protocolos previamente estabelecidos com base no protocolo de amplificação em duas etapas (Souza et al., 2016; Armanhi et al., 2018 e Carvalho et al., 2021). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq com o kit MiSeq Reagent v2, nano de 300 ciclos (2x150 pares de bases). A biblioteca

de controle PhiX (Illumina, EUA) foi usada no processo de sequenciamento para garantir a qualidade durante os processos de agrupamento. O sequenciamento foi realizado no LMSeq – Laboratório Multiusuário de Sequenciamento da UNESP/FCAV.

2.5. Bioinformática e processamento de amplicons

As sequências obtidas a partir do processo de sequenciamento da região V4 do 16S rRNA foram processadas utilizando o QIIME2, versão 2023.7 (Bolyen et al., 2019). Inicialmente, a presença de sequências correspondentes aos primers foram verificadas utilizando o USEARCH11 e, a seguir, removidas utilizando a ferramenta 'cutadapt' no Qiime2. O plug-in DADA2 foi utilizado para realizar a filtragem de qualidade das leituras, a remoção de quimeras e a junção eficiente de leituras pares (overlap = 8). A taxonomia das ASVs (do inglês *Amplicon Sequence Variant*) foi atribuída empregando o banco de dados Silva 138.1 99% de identidade (Bokulich et al., 2018; Quast et al., 2013). A tabela de recursos foi filtrada visando otimizar a qualidade dos dados, onde foram removidas ASVs atribuídas como cloroplasto e mitocôndria.

A seguir, o servidor web MicrobiomeAnalyst (Dhariwal et al., 2017; Lu et al., 2023) foi utilizado para avaliar o perfil da comunidade por análises de alfa diversidade pelo índice de Shannon e ASVs Observadas (teste estatístico Mann-Whitney).

A análise de agrupamento hierárquico (Heatmap) foi realizada a partir dos dados normalizados de abundância relativa no nível taxonômico de família. As variáveis foram padronizadas utilizando *Autoscale Features*. A métrica de distância aplicada foi Minkowski e o algoritmo de agrupamento utilizado foi *Average Linkage*.

A análise do Core Microbiome foi realizada considerando o nível taxonômico de família. Foram incluídas na composição do núcleo microbiano as famílias com abundância relativa mínima de 0,01% e prevalência em, pelo menos, 20% das amostras, considerando todas as amostras em conjunto.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento das Bactérias Endofíticas de PANCs

O isolamento bacteriano realizado a partir das folhas de cinco espécies diferentes de PANCs resultou na obtenção de 112 isolados bacterianos morfológicamente distintos (Tabela 2). A ausência de crescimento microbiano nas amostras da água do último enxágue confirma a eficácia da desinfecção da superfície das folhas. O isolamento foi conduzido em meios LB e NB, onde as colônias foram inicialmente cultivadas e, posteriormente, repicadas e estocadas em meio LB para preservação.

Os isolados apresentaram uma ampla diversidade morfológica, com predominância de colônias arredondadas, bordas lisas e coloração esbranquiçada ou amarelada, variando em tamanho entre pequeno e médio (Figura 4). Isolados com crescimento irregular e rugoso também foram observados, especialmente no caso da Capuchinha e da Azedinha, onde colônias de aspecto gomoso e rugoso foram frequentes.

A diversidade observada entre os isolados bacterianos obtidos das folhas das cinco espécies de PANCs investigadas reflete o potencial biológico único desses hospedeiros vegetais. A ampla variação na morfologia das colônias, incluindo diferenças em formato, coloração e textura, indica a presença de uma comunidade microbiana heterogênea, o que é frequentemente associado a funções ecológicas complementares dentro do ambiente endofítico (Altaf et al., 2023).

Entre as espécies avaliadas, a maior quantidade de isolados foi obtida nas folhas do Almeirão-roxo (*Lactuca indica* L.) e do Peixinho-da-horta (*Stachys byzantina*). Esses resultados podem estar relacionados às características morfofisiológicas dessas plantas, como a presença de tricomas, que são estruturas capazes de proporcionar microambientes favoráveis à colonização por bactérias (Maignien et al., 2014). Além disso, variações nas concentrações de metabólitos secundários específicos podem influenciar seletivamente a colonização endofítica,

promovendo maior diversidade bacteriana em determinados hospedeiros (Wu et al., 2021).

Tabela 2. Distribuição dos isolados entre as espécies de PANC.

Espécie de PANC	Nome Científico	Números de Isolados	Porcentual (%)
Peixinho-da-horta	<i>Stachys byzantina</i>	34	30,35
Almeirão-roxo	<i>Lactuca indica L.</i>	37	33,03
Ora-pro-nóbis	<i>Pereskia aculeata</i>	3	2,68
Capuchinha	<i>Tropaeolum majus</i>	21	18,75
Azedinha	<i>Rumex acetosa L</i>	26	23,21
Total		112	100

Por outro lado, o menor número de isolados obtidos de folhas de Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) pode ser atribuído à alta concentração de compostos bioativos naturalmente produzidos por essa planta, especialmente compostos fenólicos e flavonoides, conhecidos por exercer forte atividade antimicrobiana (Cruz et al., 2021; Garcia et al., 2019). A presença desses compostos secundários pode representar uma barreira seletiva, restringindo a diversidade de bactérias capazes de colonizar efetivamente o ambiente interno dos tecidos foliares (Wu et al., 2021).

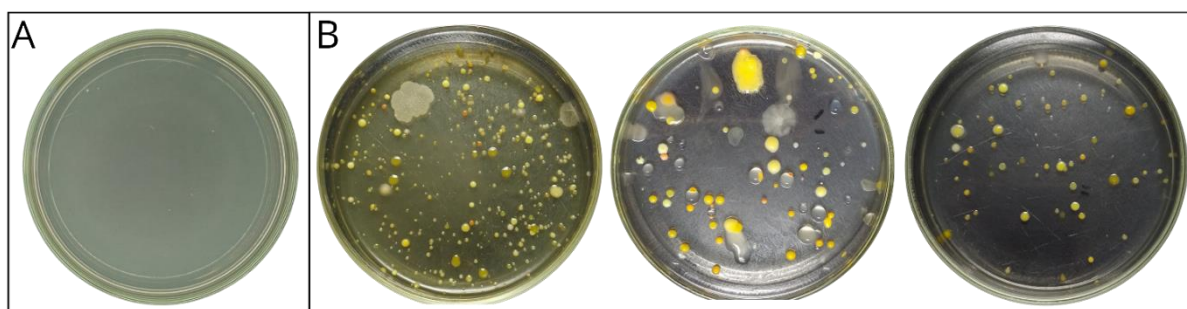


Figura 4. Diversidade morfológica do isolamento bacteriano das folhas de PANCs. **A.** Placa com meio LB sólido, com a última água do enxague das folhas, sem a presença de microrganismos. **B.** Placas das diluições, utilizadas nas coletas dos isolados bacterianos.

A diversidade observada entre os isolados sugere um alto potencial para a bioprospecção de bactérias com atividade de aplicabilidade biotecnológica. Estudos prévios indicam que a exploração de plantas não convencionais, como as PANCs, é uma estratégia eficaz para a descoberta de microrganismos com capacidade de produção de metabólitos bioativos, incluindo enzimas e compostos com atividade antifúngica e inseticida (Bolívar-Anillo et al., 2020). Trabalhos de bioprospecção, como o de Chattopadhyay et al. (2017), destacam o papel das bactérias endofíticas associadas a plantas em ambientes adversos, como fontes ricas de metabólitos secundários com aplicações no controle biológico.

Além disso, o isolamento frequente de colônias com características distintas, como textura rugosa ou gomosa observada em *Tropaeolum majus* e *Rumex acetosa* L., é de particular interesse biotecnológico. Estudos anteriores demonstraram que isolados bacterianos com morfologias semelhantes frequentemente produzem exopolissacarídeos e biofilmes, estruturas essenciais para a sobrevivência bacteriana sob condições adversas, além de desempenhar papéis importantes na promoção do crescimento vegetal e resistência ao estresse biótico e abiótico (Meneses et al., 2011; Naseem et al., 2018)

Nesse sentido, a caracterização molecular e funcional desses isolados incluindo a avaliação de suas atividades antifúngicas, inseticidas e da produção de compostos voláteis bioativos será fundamental para elucidar seus mecanismos de ação e sua aplicabilidade como bioinoculantes e agentes de biocontrole.

3.2. Diversidade Microbiana

A diversidade microbiana associada às folhas das PANCs foi investigada por meio do sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA, seguido de análise bioinformática utilizando o pipeline QIIME2. Após filtragem rigorosa para garantir a qualidade dos dados, obteve-se um total de 38.635 leituras, com média de $6.439 \pm$

3.439 leituras por indivíduo, variando entre um mínimo de 2.706 e um máximo de 11.461 leituras. As leituras foram agrupadas em 162 variantes de sequência de amplicons (ASVs), considerando uma similaridade de sequência de 99%. Observou-se que aproximadamente 12% dessas ASVs não foram caracterizadas em nível de gênero, enquanto apenas 0,6% não foram identificadas em nível de família, refletindo uma boa resolução taxonômica na caracterização das comunidades microbianas estudadas.

Para evitar a amplificação de DNA de organelas vegetais (cloroplastos e mitocôndrias), foram utilizadas sondas PNA (PNA-clamp) nas reações de PCR. No entanto, a estratégia não foi plenamente eficaz para todas as amostras. Nas espécies *Lactuca indica* (almeirão-roxo) e *Pereskia aculeata* (ora-pro-nóbis), a amplificação resultou majoritariamente em sequências de cloroplastos e mitocôndrias, com baixa recuperação de DNA bacteriano. Esses resultados indicam que a eficácia dos PNA-clamps pode variar conforme a composição genética da planta, sendo necessário otimizar protocolos para determinadas espécies.

3.3. Diversidade Alfa

A diversidade alfa foi avaliada com base nos índices de riqueza de ASVs observadas e Índice de Shannon, os quais refletem, respectivamente, o número de variantes taxonômicas e a equitatividade da distribuição dessas variantes (Gauthier and Derome, 2020). A riqueza observada de ASVs revelou valores similares entre as regiões superior e inferior das folhas, com uma média ligeiramente superior na região inferior. No entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$). Esses dados são ilustrados na Figura 5A, que demonstra a distribuição da riqueza de ASVs entre as duas regiões foliares analisadas.

De forma semelhante, o índice de Shannon, que avalia tanto a riqueza quanto a uniformidade na distribuição das espécies, também indicou uma leve tendência de maior diversidade nas folhas da região inferior, sem diferença estatística significativa entre as regiões foliares (teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$), conforme apresentado

na Figura 5B. Esses resultados sugerem que ambas as regiões foliares apresentam comunidades microbianas altamente diversificadas e relativamente equilibradas em termos de composição. A tendência observada para maior diversidade na face inferior pode estar relacionada a condições microambientais mais favoráveis, como maior umidade, menor exposição à radiação UV e maior deposição de partículas do solo, fatores previamente associados à maior colonização microbiana (Hunter et al., 2010; Vorholt, 2012).

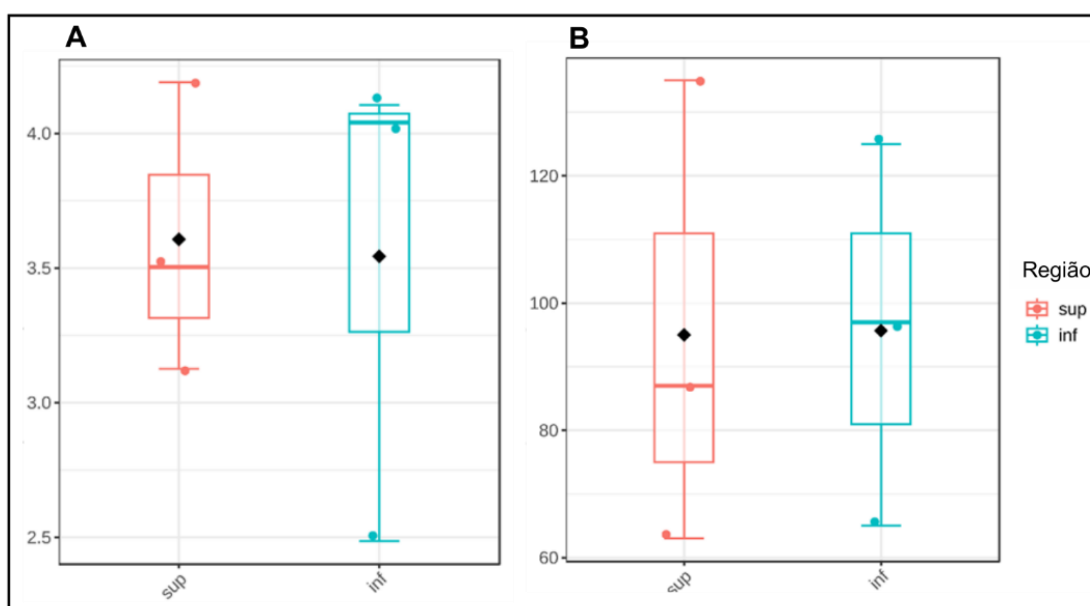


Figura 5. Diversidade alfa nas regiões foliares superior (sup) e inferior (inf). **(A)** Riqueza observada (ASVs) entre as regiões foliares; **(B)** Índice de Shannon, representando a diversidade e uniformidade das comunidades. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as regiões ($p > 0,05$).

Além disso, a ausência de diferença significativa pode indicar uma elevada capacidade adaptativa das bactérias endofíticas às diferentes microregiões das folhas, o que tem sido relatado em outros estudos com comunidades microbianas foliares (Carrión et al., 2019; Compant et al., 2021). Os dados de sequenciamento também corroboram a diversidade observada no isolamento em meio sólido, refletida na ampla variedade morfológica das colônias bacterianas isoladas.

3.4. Perfil Taxonômico

A análise da abundância relativa em nível de gênero (Figura 6) revelou uma alta diversidade bacteriana nas regiões superior e inferior das folhas das PANCs. Destacaram-se os gêneros *Leucobacter*, *Brevundimonas*, *Pseudonocardia*, *Asticcacaulis* e *Niabella*, os quais estiveram entre os mais abundantes em ambas as regiões avaliadas.

Leucobacter e *Brevundimonas* são conhecidos pela sua habilidade em colonizar ambientes vegetais, frequentemente associados à promoção do crescimento e à proteção vegetal por meio da produção de compostos antimicrobianos e enzimas degradativas (Kumar et al., 2022; Subramani and Aalbersberg, 2013). *Pseudonocardia* é reconhecido pelo seu potencial biotecnológico, incluindo produção de metabólitos secundários com atividade antibiótica, que desempenham papel importante na proteção das plantas contra patógenos (Expósito et al., 2017). Já o gênero *Niabella*, integrante da família Chitinophagaceae, é frequentemente associado à degradação de polissacarídeos complexos, sugerindo sua participação na ciclagem de nutrientes e na manutenção da saúde vegetal (McKee et al., 2021).

Apesar da diversidade microbiana relativamente homogênea entre as regiões superior e inferior das folhas, diferenças discretas na abundância relativa de gêneros específicos sugerem adaptações locais aos microambientes foliares. Essa observação complementa os dados obtidos no isolamento, que evidenciaram ampla diversidade morfológica dos isolados, sugerindo que tais comunidades bacterianas apresentam alta heterogeneidade funcional e grande potencial biotecnológico.

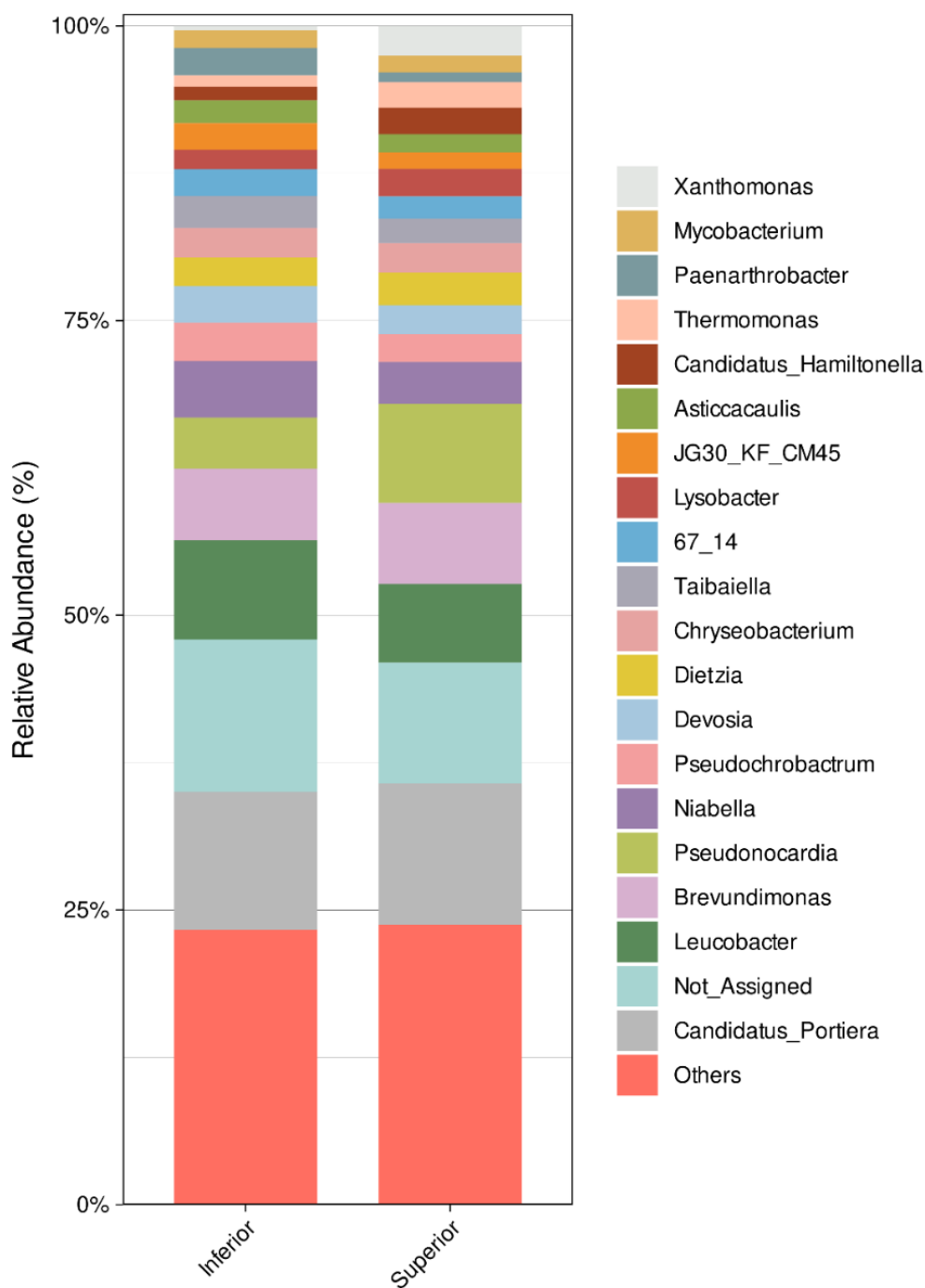


Figura 6. Abundância relativa de gêneros bacterianos endofíticos nas regiões superior e inferior das folhas das PANCs. O gráfico de barras empilhadas representa a composição da comunidade bacteriana em nível de gênero, destacando os táxons mais prevalentes e sua distribuição entre as duas regiões foliares.

Além das observações baseadas na abundância relativa de gêneros bacterianos, foi realizada uma análise comparativa entre os microrganismos obtidos

por isolamento em meio de cultivo e aqueles identificados por sequenciamento da região 16S rRNA. Enquanto 112 bactérias foram isoladas e preservadas em banco, o sequenciamento revelou 162 ASVs (Amplicon Sequence Variants), representando uma diversidade taxonômica ainda maior. Essa comparação, ilustrada na Figura 7, evidencia a complementariedade entre abordagens cultiváveis e não cultiváveis.

Ressalta-se que, embora o cultivo permita a caracterização funcional direta dos microrganismos, o sequenciamento oferece uma visão mais abrangente da diversidade microbiana, incluindo táxons de difícil cultivo ou de crescimento lento. Assim, a integração de ambas as estratégias amplia o espectro de descoberta de microrganismos com potencial biotecnológico, especialmente para aplicação como bioinoculantes e agentes de biocontrole.

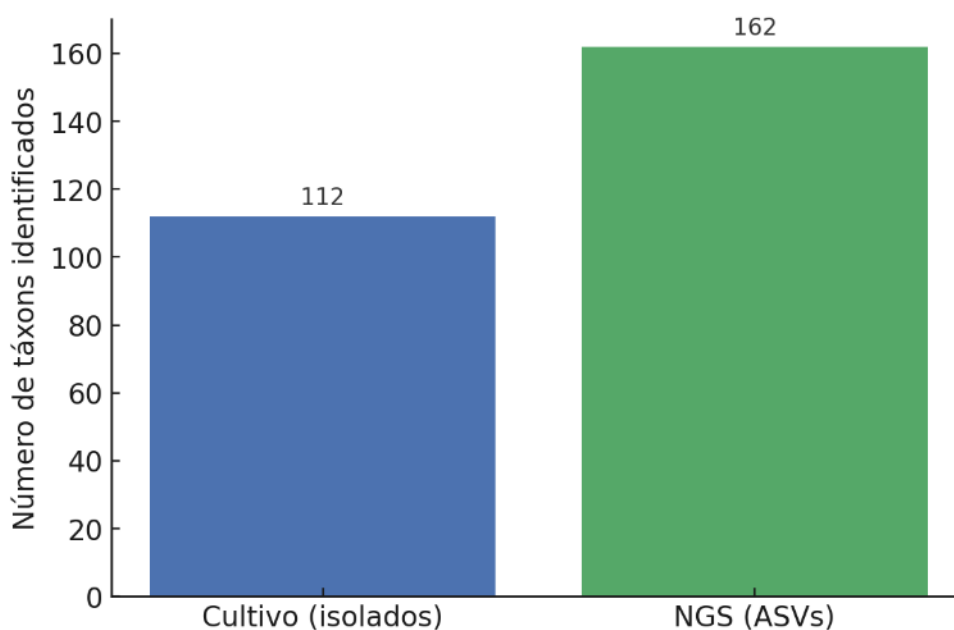


Figura 7. Comparação entre o número de isolados bacterianos cultiváveis ($n = 112$) e as unidades taxonômicas amplificadas (ASVs, $n = 162$) identificadas por sequenciamento de nova geração (NGS) do gene 16S rRNA em folhas de PANCs.

3.5. Análise de Agrupamento Hierárquico

A análise de agrupamento hierárquico baseada na abundância relativa dos gêneros bacterianos (Figura 8) revelou um claro padrão de agrupamento das amostras mais fortemente associado à espécie de planta hospedeira do que às regiões foliares avaliadas (superior e inferior). Este resultado destaca que as características intrínsecas da planta, como a composição química, tipo de exsudatos e particularidades fisiológicas, desempenham papel determinante na estruturação das comunidades microbianas endofíticas. Fatores genéticos e bioquímicos da planta hospedeira frequentemente influenciam a seleção específica de microrganismos colonizadores, promovendo comunidades microbianas exclusivas para cada espécie vegetal (McKee et al., 2021).

Apesar dessa forte influência da espécie hospedeira, diferenças discretas foram observadas entre as regiões foliares das mesmas plantas, sugerindo que condições microambientais, como exposição à radiação solar, variação de temperatura e disponibilidade de umidade, também influenciam a composição e abundância relativa de determinados grupos bacterianos. Esses fatores ambientais já foram descritos anteriormente como importantes moduladores das comunidades bacterianas em superfícies vegetais, interferindo diretamente na abundância relativa e diversidade de microrganismos adaptados a esses nichos ecológicos específicos (Remus-Emsermann et al., 2014; Vorholt, 2012).

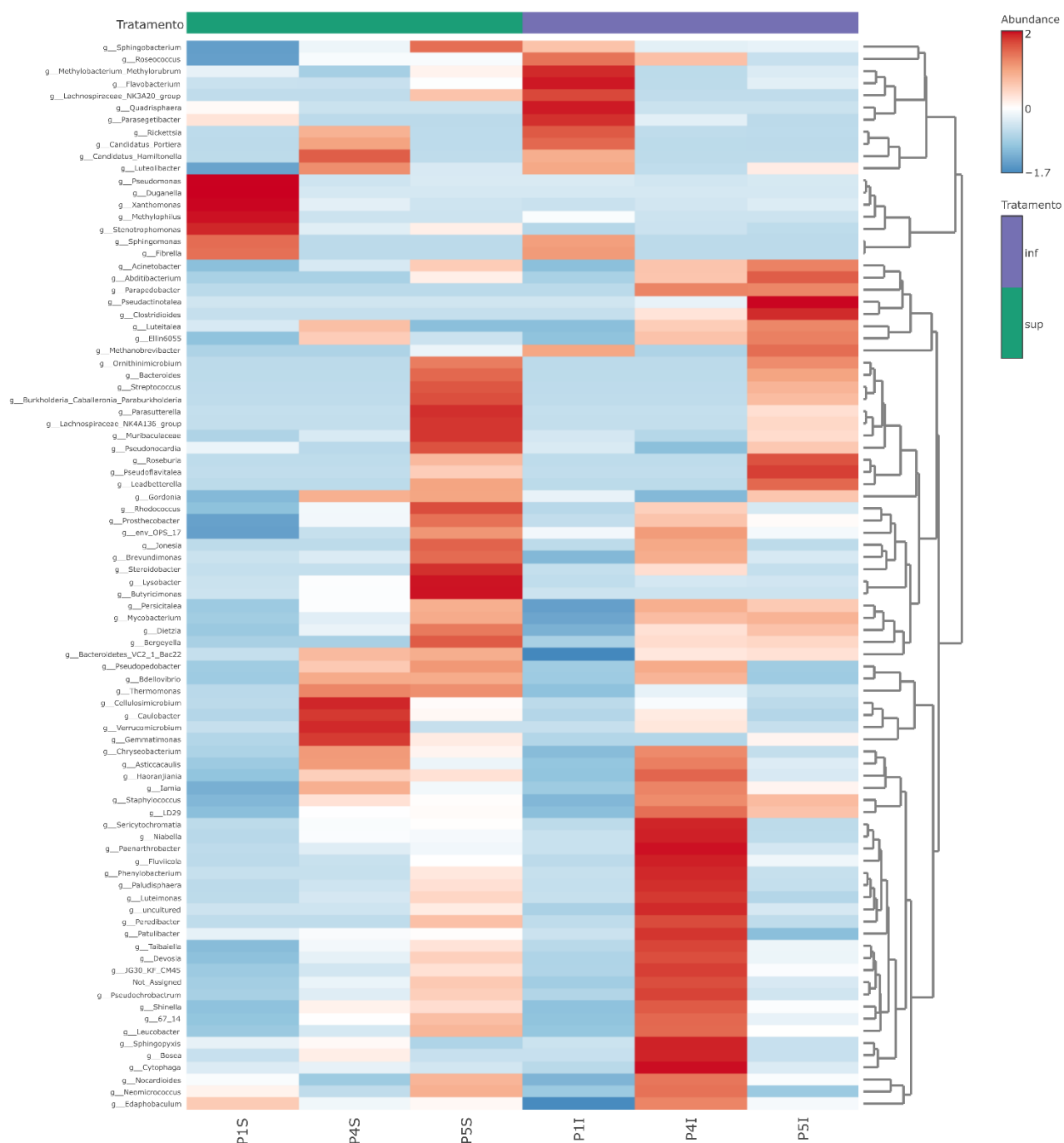


Figura 8. Agrupamento hierárquico das amostras com base em abundância relativa por gênero. Heatmap da abundância relativa de gêneros bacterianos, mostrando padrões de agrupamento mais fortemente influenciados pela identidade da planta hospedeira do que pela posição foliar (distância Minkowski, método Average Linkage)

Destacam-se gêneros como *Leucobacter*, *Pseudonocardia* e *Niabella*, consistentemente prevalentes e abundantes nas diferentes plantas analisadas, reforçando seu papel potencial em interações benéficas planta-microrganismo, incluindo promoção de crescimento e proteção contra patógenos (Trivedi et al., 2020). Esses resultados sugerem que o núcleo microbiano identificado pode desempenhar funções essenciais e comuns entre diferentes hospedeiros vegetais, o que abre possibilidades promissoras para exploração biotecnológica e formulação de bioinsumos (Hassani et al., 2018; Meng et al., 2024).

Esses achados ressaltam a importância de considerar tanto fatores específicos da planta hospedeira quanto condições microambientais locais em futuros estudos de prospecção microbiana, visando o desenvolvimento de estratégias mais eficientes e sustentáveis na agricultura.

3.6. Núcleo Microbiano

A análise revelou um conjunto de gêneros bacterianos com alta prevalência e consistência entre as amostras das folhas das PANCs, configurando o que se denomina núcleo microbiano dessas plantas (Figura 9). Esse núcleo corresponde ao grupo de microrganismos recorrentes e amplamente distribuídos entre diferentes amostras, sugerindo uma associação estável com os hospedeiros.

Os gêneros mais prevalentes foram *Leucobacter*, *Brevundimonas*, *Pseudonocardia* e *Niabella*, encontrados em mais de 70% das amostras, indicando uma forte associação desses táxons com as plantas estudadas, independentemente da região foliar considerada.

Leucobacter e *Brevundimonas* destacam-se frequentemente em estudos sobre microbiomas vegetais devido à sua capacidade de promover crescimento vegetal, produzir enzimas hidrolíticas e solubilizar nutrientes importantes como fósforo (Rathi and K N, 2021; Zhu et al., 2022). *Pseudonocardia* é um gênero reconhecidamente produtor de diversos compostos antimicrobianos e voláteis com potencial aplicação no controle biológico de fitopatógenos (Mangamuri et al., 2015). *Niabella*, por sua vez,

é associado a ambientes ricos em matéria orgânica, contribuindo possivelmente para o metabolismo e ciclagem de nutrientes na planta hospedeira (Min et al., 2024)

A alta prevalência desses gêneros sugere um papel essencial na saúde e resiliência das plantas estudadas, ressaltando sua importância como potenciais bioinoculantes em estratégias agrícolas sustentáveis. Esses resultados também indicam que as PANCs possuem comunidades microbianas estáveis e específicas, adaptadas às características únicas de suas folhas.

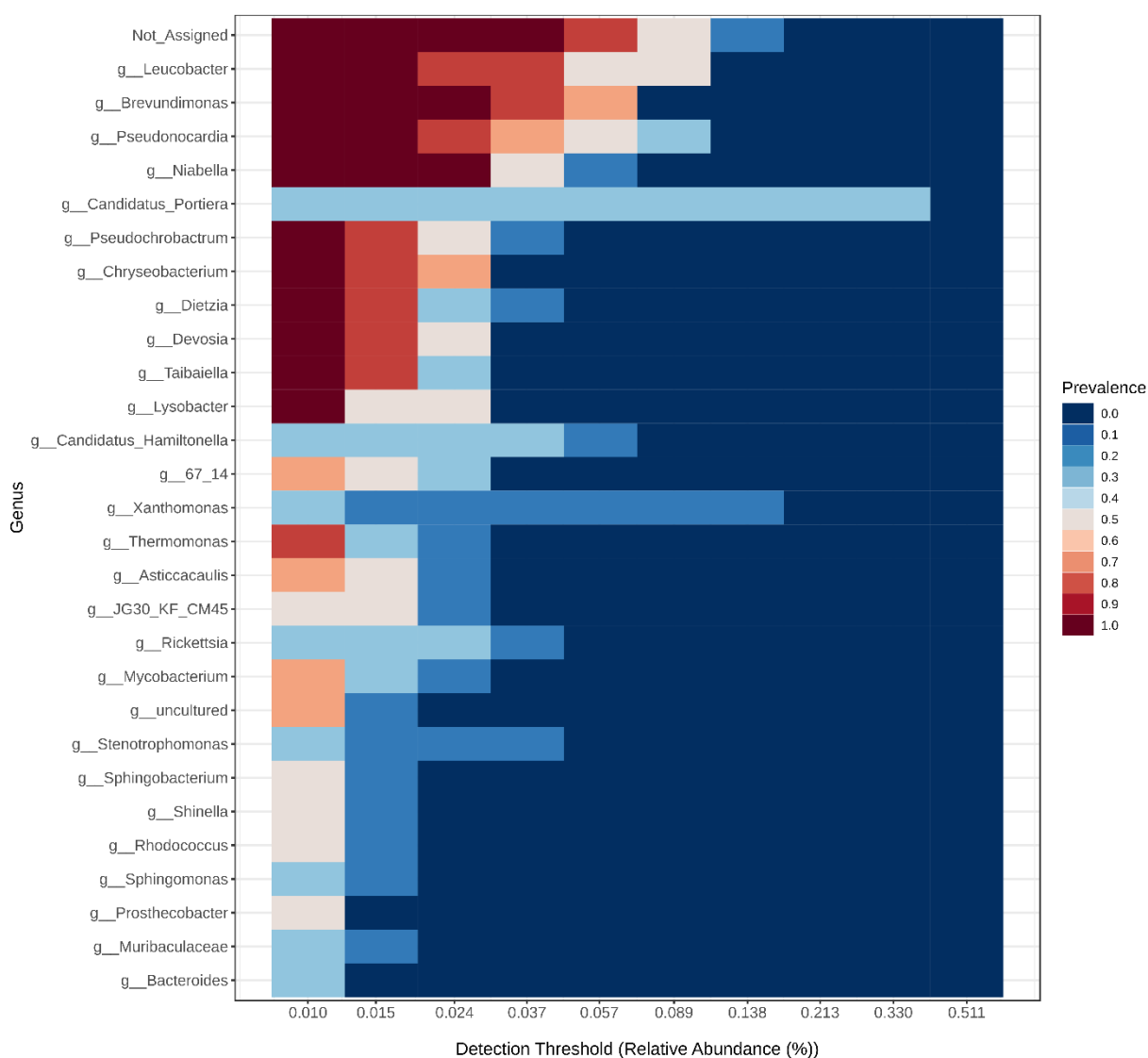


Figura 9. Núcleo microbiano total em nível de gênero. Gêneros bacterianos compartilhados em $\geq 20\%$ das amostras. *Pseudonocardia*, *Niabella* e *Leucobacter* estiveram entre os táxons mais prevalentes.

Ademais, é importante destacar que o núcleo microbiano identificado inclui gêneros frequentemente não cultiváveis ou de difícil cultivo em condições laboratoriais convencionais, ressaltando o papel crucial das técnicas moleculares avançadas para explorar a diversidade microbiana vegetal em profundidade (Suman et al., 2022; Thomas and Sekhar, 2017). A caracterização detalhada do núcleo microbiano, portanto, oferece um ponto de partida valioso para futuras investigações voltadas à exploração funcional dessas comunidades microbianas, ampliando seu potencial biotecnológico e agrícola.

Os resultados obtidos neste capítulo reforçam o papel das PANCs como fontes estratégicas para a bioprospecção de microrganismos endofíticos com potencial biotecnológico. A integração entre métodos de isolamento cultivável e a análise metataxonômica por sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA permitiu uma visão abrangente da diversidade microbiana associada às folhas de *Stachys byzantina*, *Lactuca indica* L., *Pereskia aculeata*, *Tropaeolum majus* e *Rumex acetosa* L.. A identificação de gêneros recorrentes como *Pseudonocardia*, *Leucobacter* e *Mycobacterium*, bem como de famílias como *Microbacteriaceae* e *Chitinophagaceae*, reforça a presença de táxons funcionalmente relevantes, reconhecidos por sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos, sideróforos e enzimas hidrolíticas (Carrión et al., 2019; Compant et al., 2021). A análise do núcleo microbiano revelou a consistência de determinadas linhagens bacterianas entre diferentes amostras, sugerindo uma associação estável com as plantas hospedeiras. Além disso, a ausência de atividade inseticida nos isolados, aliada à expressiva atividade antifúngica relatada nos capítulos seguintes, aponta para uma especificidade funcional desejável, especialmente no contexto do manejo seletivo que preserve insetos benéficos. Esses achados fornecem uma base sólida para a seleção racional de cepas com alto potencial de aplicação como bioinoculantes e agentes de controle biológico, contribuindo para o avanço de uma agricultura mais resiliente e sustentável.

4. CONCLUSÕES

A diversidade microbiana foliar das PANCs mostrou-se equilibrada entre os terços superior e inferior das folhas, com comunidades dominadas por famílias e gêneros bacterianos reconhecidos por seu potencial biotecnológico. A composição microbiana esteve mais associada à espécie vegetal do que à posição foliar, evidenciando o papel do hospedeiro na estruturação da microbiota. A análise integrada entre as abordagens cultivável e metataxonômica revelou a presença de táxons recorrentes e funcionalmente relevantes, como *Leucobacter*, *Pseudonocardia*, *Niabella* e *Brevundimonas*, os quais também compuseram o núcleo microbiano identificado. A recuperação de 112 isolados bacterianos com diversidade morfológica reforça a complementariedade entre as metodologias utilizadas, permitindo a seleção de cepas para testes funcionais. Esses achados destacam as PANCs como fontes estratégicas de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis com potencial aplicação em bioinoculantes e agentes de biocontrole, fortalecendo sua relevância para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

5. REFERENCIAS

- ALTAF, N. *et al.* Endophytic Colonization by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in Maize Plants Affects the Fitness of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Microorganisms** **2023**, Vol. **11**, Page **1067**, v. 11, n. 4, p. 1067, 19 abr. 2023.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 229–236, 2001.
- BERG, G. *et al.* Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 175–175, 2014.
- BOKULICH, N. A. *et al.* Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 17 maio 2018.
- BOLÍVAR-ANILLO, H. J.; GARRIDO, C.; COLLADO, I. G. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 3, p. 721–740, 2020.
- BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology** **2019 37:8**, v. 37, n. 8, p. 852–857, 24 jul. 2019.
- CARRIÓN, V. J. *et al.* Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, v. 366, n. 6465, p. 606–612, 1 nov. 2019.
- CHATTOPADHYAY, P.; BANERJEE, G.; MUKHERJEE, S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- COMPANT, S. *et al.* A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29–37, 1 set. 2019.
- _____. The plant endosphere world – bacterial life within plants. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 1812–1829, 1 abr. 2021.
- CRUZ, T. M. *et al.* Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their in vitro antioxidant and antihemolytic activities. **Food Chemistry**, v. 361, p. 130078, 2021.
- DHARIWAL, A. *et al.* MicrobiomeAnalyst: a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, 2017.

EXPÓSITO, R. G. *et al.* Current insights into the role of Rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 305316, 18 dez. 2017.

GARCIA, J. A. A. *et al.* Phytochemical profile and biological activities of “Ora-pro-nobis” leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. **Food Chemistry**, v. 294, p. 302–308, 2019.

GAUTHIER, J.; DEROME, N. Evenness-richness scatter plots: a graphical, intuitive approach to alpha diversity analysis. **bioRxiv**, p. 2020.09.23.310045, 25 set. 2020.

HARDOIM, P. R. *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HASSANI, M. A.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome** 2018 6:1, v. 6, n. 1, p. 1–17, 27 mar. 2018.

HUNTER, P. J. *et al.* Both leaf properties and microbe-microbe interactions influence within-species variation in bacterial population diversity and structure in the lettuce (*Lactuca Species*) phyllosphere. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 24, p. 8117–8125, dez. 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Geociências organização do território / malhas territoriais. Disponível em: <<https://shre.ink/b3Mr>>. Acesso em: 20 ago. 2023.

KEMBEL, S. W. *et al.* Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 38, p. 13715–13720, 23 set. 2014.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. J. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. [s.l.: s.n.].

KUMAR, S. *et al.* Psychrophilic microbes: Biodiversity, beneficial role and improvement of cold stress in crop plants. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Sustainable Agriculture: Microorganisms as Biostimulants**, p. 177–198, 1 jan. 2022.

LU, Y. *et al.* MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W310–W318, 5 jul. 2023.

MAIGNIEN, L. *et al.* Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. **mBio**, v. 5, n. 1, 21 jan. 2014.

MANGAMURI, U. K. *et al.* Bioactive Metabolites Produced by *Pseudonocardia endophytica* VUK-10 from Mangrove Sediments: Isolation, Chemical Structure

Determination and Bioactivity. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, n. 5, p. 629–636, 28 maio 2015.

MCKEE, L. S. *et al.* Polysaccharide degradation by the Bacteroidetes: mechanisms and nomenclature. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 5, p. 559–581, 1 out. 2021.

MENESES, C. H. S. G. *et al.* Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-11-0127>, v. 24, n. 12, p. 1448–1458, 8 nov. 2011.

MENG, X. R. *et al.* How the root bacterial community of *Ficus tikoua* responds to nematode infection: enrichments of nitrogen-fixing and nematode-antagonistic bacteria in the parasitized organs. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1374431, 28 jun. 2024.

MIN, J. *et al.* *Niabella defluvii* sp. nov., isolated from influent water of a wastewater treatment plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 006425, 17 jun. 2024.

NASEEM, H. *et al.* Exopolysaccharides producing rhizobacteria and their role in plant growth and drought tolerance. **Journal of Basic Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1009–1022, 1 dez. 2018.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 1 jan. 2013.

RATHI, M.; K N, Y. *Brevundimonas diminuta* MYS6 associated *Helianthus annuus* L. for enhanced copper phytoremediation. **Chemosphere**, v. 263, p. 128195, 1 jan. 2021.

REMUS-EMSERMANN, M. N. P. *et al.* Spatial distribution analyses of natural phyllosphere-colonizing bacteria on *Arabidopsis thaliana* revealed by fluorescence in situ hybridization. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 2329–2340, 1 jul. 2014.

SUBRAMANI, R.; AALBERSBERG, W. Culturable rare Actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9291–9321, 22 nov. 2013.

SUMAN, A. *et al.* Microbial Community and Function-Based Synthetic Bioinoculants: A Perspective for Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 805498, 11 mar. 2022.

THOMAS, P.; SEKHAR, A. C. Cultivation Versus Molecular Analysis of Banana (*Musa* sp.) Shoot-Tip Tissue Reveals Enormous Diversity of Normally Uncultivable Endophytic Bacteria. **Microbial Ecology**, v. 73, n. 4, p. 885–899, 1 maio 2017.

TRIVEDI, P. *et al.* Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology** **2020 18:11**, v. 18, n. 11, p. 607–621, 12 ago. 2020.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology** **2012 10:12**, v. 10, n. 12, p. 828–840, 16 nov. 2012.

WU, W. *et al.* Influence of tissue and geographic locality on culturable endophytic bacteria of *Atractylodes macrocephala*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 167, n. 11, p. 001109, 26 nov. 2021.

ZHU, J. *et al.* *Leucobacter chinensis* sp. nov., with plant growth-promoting potential isolated from field soil after seven-years continuous maize cropping. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 005417, 8 ago. 2022.

CAPÍTULO 3 – Compostos antifúngicos difusíveis e voláteis produzidos por *Bacillus velezensis* JBC141 antagonista contra vários fungos fitopatogênicos

RESUMO – Com o objetivo de desenvolver alternativas sustentáveis ao uso de fungicidas químicos no manejo de doenças agrícolas, este estudo avaliou o potencial fungicida de bactérias isoladas de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANCs). A bioprospecção resultou no isolamento de 112 bactérias endofíticas, das quais 45,5% apresentaram atividade antifúngica significativa. O isolado *B. velezensis* JBC141 destacou-se pela alta eficácia, inibindo mais de 80% do crescimento micelial de vários dos fitopatógenos fungicos avaliados, como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum eriobotryae*, este último sendo relatado pela primeira vez como sensível a esta bactéria. Ensaio confirmaram que sua atividade fungicida é mediada por compostos voláteis e metabólitos termorresistentes, mantendo-se eficaz mesmo após tratamentos térmicos (80 °C e 100 °C) e exposição à proteinase K.

A caracterização enzimática revelou atividades hidrolíticas expressivas, como proteases e celulasas, que reforçam seu mecanismo de ação. Especialmente, *C. eriobotryae* destacou-se pela alta sensibilidade em todos os tratamentos, reforçando o potencial dos metabólitos extracelulares como agentes antifúngicos em estratégias de manejo biológico sustentável. Estes resultados posicionaram *B. velezensis* JBC141 como um candidato promissor para integrar estratégias de biocontrole, promovendo maior sustentabilidade no manejo de doenças agrícolas.

Palavras-chave: Bioprospecção; Agentes de controle biológico; Biofungicida; Manejo sustentável.

1. INTRODUÇÃO

O controle de doenças fitopatogênicas é um dos grandes desafios da agricultura moderna, uma vez que doenças causadas por fungos, bactérias e vírus representam significativas perdas de produtividade em culturas agrícolas de importância econômica (Syed Ab Rahman et al., 2018). Tradicionalmente, o uso de pesticidas químicos tem sido a abordagem predominante para o manejo de doenças e pragas, contudo, o uso extensivo desses produtos tem gerado preocupações ambientais e de saúde, além de favorecer o desenvolvimento de resistência nos agentes patogênicos (Hong-Xing et al., 2017). Nesse contexto, a busca por alternativas sustentáveis torna-se uma prioridade para a agricultura, e a bioprospecção de novos microrganismos para o desenvolvimento de bioprodutos surge como uma estratégia promissora (Beemelmans et al., 2016).

A bioprospecção, definida como a exploração de recursos biológicos em busca de novos compostos bioativos, tem se mostrado uma ferramenta eficiente na identificação de novas moléculas com atividades biológicas, incluindo o controle de fitopatógenos (Imhoff et al., 2011). Diversas fontes têm sido exploradas para a bioprospecção de microrganismos, como o solo, ambientes marinhos, insetos e plantas. Dentre essas, as plantas são uma fonte especialmente rica de bactérias endofíticas, microrganismos que vivem no interior dos tecidos vegetais sem causar danos aos seus hospedeiros e que têm potencial para a produção de metabólitos secundários bioativos, incluindo compostos com ação antifúngica e inseticida (Hardoim et al., 2015).

As plantas alimentícias não convencionais (PANCs) são uma fonte promissora de novos isolados bacterianos devido à sua diversidade genética e características adaptativas. No Brasil, estima-se que existam cerca de 5.000 espécies de PANCs distribuídas por diferentes biomas, muitas das quais são subutilizadas e apresentam grande potencial para a bioprospecção de novos microrganismos (Kinupp and Lorenzi, 2014). Essas plantas, frequentemente adaptadas a condições adversas, estabelecem associações endofíticas que resultam em benefícios para ambas as partes, como a proteção contra patógenos e o aumento da resiliência ao estresse

ambiental (Bolívar-Anillo et al., 2020). As bactérias endofíticas associadas a essas plantas representam uma rica fonte de compostos bioativos que podem ser explorados para o desenvolvimento de bioprodutos destinados ao controle de doenças fitopatogênicas (Azevedo, 2014).

Muitos dos antagonistas bacterianos de fitopatógenos, pertencem ao gênero *Bacillus*, e o uso e o número de espécies de *Bacillus* antagonicamente importantes estão aumentando muito rapidamente (Dunlap, 2019). As espécies de *Bacillus* sintetizam vários tipos de metabólitos secundários de lipopeptídeos com atividades específicas contra patógenos de plantas, incluindo muitos lipopeptídeos anfifílicos e surfactantes potentes (Gong et al., 2015). Além de seu amplo espectro de capacidade de biocontrole, as espécies de *Bacillus* se replicam rapidamente e são resistentes a condições ambientais adversas (Wash et al., 2022). O desenvolvimento de bioprodutos a partir de isolados bacterianos de PANCs podem contribuir significativamente para o manejo sustentável de pragas e doenças na agricultura, promovendo uma alternativa segura e eficaz aos pesticidas químicos (Chattopadhyay et al., 2017).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade das bactérias obtidas de folhas de PANCs, com atividade fungicida, por meio de compostos difusíveis e voláteis, contribuindo para a diversificação das ferramentas biológicas disponíveis para o controle de doenças. A bioprospecção de microrganismos associados a PANCs não apenas contribui para o desenvolvimento de tecnologias de controle biológico, mas também amplia o conhecimento sobre a biodiversidade microbiana brasileira e suas aplicações biotecnológicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reativação e preparo dos isolados bacterianos para bioensaios

Os isolados bacterianos utilizados pertencem ao banco Jaboticabal Biological Control (JBC), vinculado ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP). Esses isolados foram obtidos a partir do isolamento de bactérias endofíticas de folhas de cinco espécies de PANCs e armazenados a -80 °C. Para a realização dos bioensaios, os 112 isolados foram cultivados em meio LB a 30 °C, sob agitação orbital a 150 r.p.m., por 40 horas.

2.2. Triagem de Bactérias com Atividade Antifúngica

Na avaliação da atividade antifúngica dos isolados bacterianos, utilizou-se os fitopatógenos descritos na (Tabela 1). Estes foram cultivados em placa de petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), a 27°C, sete dias antes de cada bioensaio. Os isolados bacterianos foram cultivados sob agitação a 150 r.p.m, por 40 horas a 30 °C. Um disco de meio de cultura de (≈ 8 mm Ø) contendo o micélio do fitopatógeno foi transferido para o centro da placa de petri contendo meio BDA. Nas bordas desta mesma placa em cinco pontos equidistantes entre eles e do centro da placa, sob a superfície do meio, foram adicionadas alíquotas de 10 µL de cinco isolados bacterianos por placa (Figura 1). O tratamento controle consistiu na adição do disco de meio de cultura contendo o fitopatógeno e uma alíquota de 10 µL do meio de cultura LB estéril. O momento de avaliação do halo de inibição, representado pelo espaço entre a extremidade do crescimento micélio do patógeno e a colônia da bactéria antagonista, foi estabelecido como o período necessário para que o micélio do patógeno, sem a presença do isolado bacteriano, se desenvolvesse sobre todo o meio de cultura (Bell D.K., Well H.D., 1982). As placas foram incubadas em B.O.D. (Bio-Oxygen Demand), a 27 °C, 12 horas de fotoperíodo.

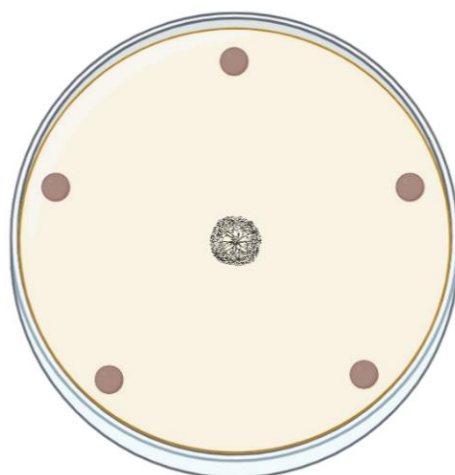


Figura 1. Representação de uma placa de Petri com a metodologia para triagem de antagonismo in vitro de bactérias endofíticas associadas a PANCs, em relação aos fungos fitopatogênicos. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A Tabela 1 apresenta a coleção de fitopatógenos fúngicos utilizada no estudo, pertencentes a Micoteca do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), detalhando a identificação molecular de cada isolado, o percentual de similaridade obtido por sequenciamento e os respectivos acessos disponíveis no banco de dados NCBI.

Tabela 1. Identificação Molecular dos Fitopatógenos Avaliados

ID-LBMP	Nome científico	Pe. Ident (%)	ID-NCBI
Fungo 1	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100	MT436756.1
Fungo 2	<i>Fusarium oxysporum</i>	100	OR055981.1
Fungo 3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100	MG925324.1
Fungo 4	<i>Colletotrichum musae</i>	100	MK298312.1
Fungo 5	<i>Macrophomina phaseolina</i>	99,83	MK922557.1
Fungo 6	<i>Alternaria alternata</i>	100	ON907655.1
Fungo 7	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100	MK336551.1

Fungo 8	<i>Macrophomina phaseolina</i>	100	MK336551.1
Fungo 9	<i>Rhizoctonia solani</i>	100	MT470690.1
Fungo 10	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	100	MT555754.1
Fungo 11	<i>Fusarium oxysporum f. sp. Cubense</i>	99,76	MN396268.1
Fungo 12	<i>Fusarium verticillioides</i>	100	MG515226.1
Fungo 13	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	100	NR_147332.1
Fungo 14	<i>Phyllosticta capitalensis</i>	100	NR_144914.1
Fungo 15	<i>Colletotrichum eriobotryae</i>	98	NR_171181.1

2.3. Triagem de bactérias com atividade inseticida.

Para a avaliação da atividade inseticida dos isolados, estes foram previamente cultivados em meio LB a 30°C, 150 r.p.m., por 40 horas. No bioensaio, foi utilizada a dieta artificial desenvolvida para *S. frugiperda* (Greene et al., 1976). Em placas de poliestireno de 128 poços (Cell Wells, Corning Glass Works) contendo aproximadamente 1 mL de dieta por poço, foram aplicados 60 µL do cultivo bacteriano sobre a superfície da dieta de cada poço, que possui área de 2 cm². Posteriormente, as bandejas foram acondicionadas em fluxo laminar até a secagem do cultivo aplicado, em seguida, uma lagarta neonata de *S. frugiperda* foi adicionada em cada poço da placa. As parcelas, representadas por 16 poços foram então seladas com adesivo transparente e acondicionadas a 27°C ± 2°C e 70% ± 5% de umidade relativa, com fotoperíodo de 14 horas de luz e 10 horas de escuro. Decorrido seis dias, foi verificada a mortalidade e aspecto visual de desenvolvimento das lagartas. Para a validação dos ensaios, utilizou-se o meio LB estéril como controle negativo e o *Bacillus thuringiensis* HD125 como controle positivo. Cada tratamento foi composto por duas parcelas de 16 poços. As larvas de *S. frugiperda* do controle quanto as tratadas eram neonatas, eclodidas até 24 horas antes dos experimentos, garantindo uniformidade nos estágios de desenvolvimento no início dos testes.

2.4. Extração e sequenciamento de DNA bacteriano

Os isolados que inibiram o crescimento fúngico foram submetidos à identificação de gênero e aproximação da espécie por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Foi realizada a extração do DNA total utilizando o kit TiaGen™; a qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose. Posteriormente, foi feita a amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene 16S rRNA, fD1 (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3') e rD1 (5'-CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC - 3') (Bedding and Akhurst, 1975); os produtos amplificados foram então purificados com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit e sequenciados utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing no sequenciador capilar modelo ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências obtidas foram analisadas com o software Phred-Phrap-Consed (www.phrap.org) e em seguida submetidas a consulta de similaridade de nucleotídeos no banco de dados de 16S do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST local - "Basic Local Alignment Search Tools". Sequências com similaridade > 99% foram consideradas para definir as espécies candidatas.

2.5. Atividade de Enzimas Hidrolíticas

Após o sequenciamento, as atividades enzimáticas dos isolados selecionados foram observadas em placas contendo substratos enzimáticos específicos (Aktayeva and Khassenov, 2024; Ameer Pasha et al., 2023). Uma cultura de 10 µL de cada isolado cultivado em LB foi adicionada em quatro pontos equidistantes às placas de enzimas de diagnóstico e incubadas a 30 °C por 2-3 dias. O diâmetro dos halos foi medido com régua milimetrada para quantificação da eficiência de solubilização. As placas de Petri foram fotografadas com um gerador de imagens Bio-Rad (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System).

2.5.1. Atividade de Protease

O meio (Difco™ Skim Milk) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante e autoclavado (20 min a 121 °C). Após a incubação, a atividade de protease positiva foi identificada por um corte de lise translúcido no meio de cultura.

2.5.2. Atividade Esterase e Lipase

O meio ágar (5,0 g NaCl, 10,0 g peptona, 0,1 g CaCl₂ · 2H₂O, 10 ml (v/v) Tween 20 (para esterase) e Tween 80 (para lipase) e 10,0 g ágar) foi solubilizado em 1000 mL de água deionizada em um agitador magnético, ajustado a pH 7,0 e autoclavado (20 min a 121 °C). A formação de precipitados brancos ao redor da colônia bacteriana era indicativa da atividade enzimática.

2.5.3. Atividade de Celulase

Meio de ágar (10,0 g de carboximetilcelulose (CMC), 10,0 g de triptona, 5,0 g de extrato de levedura, 10,0 g de NaCl e 10,0 g de ágar) foi solubilizado em 1000 mL de água deionizada em um agitador magnético a 100 °C, ajustado para pH 7,0 e autoclavado (20 min a 121 °C). Para avaliação, a placa foi tratada com solução de vermelho Congo a 0,2% (p/v) por 10 min, depois descolorida por vários tratamentos com NaCl 1 M. Como resultado positivo da atividade da celulase foram observadas zonas claras de hidrólise ao redor das colônias.

2.5.4. Atividade de Amilase

Foi determinado em ágar nutriente suplementado com amido solúvel (20,0 g de amido, 10,0 g de peptona, 10,0 g de extrato de levedura e 10,0 g de ágar) solubilizado em 1000 mL de água deionizada em um agitador magnético a 100 °C, o pH foi ajustado para 7,0 e autoclavado (20 min a 121 °C). A degradação do amido e a produção de amilase por bactérias foi avaliada vertendo uma solução de Lugol (0,3 g

de iodo e 0,6 g KI/L) na placa de Petri, após 3 min de exposição, o Lugol foi drenado a placa foi deixada em repouso por pelo menos 30 min, desenvolvimento de um halo claro ao redor das colônias indicou uma reação positiva.

2.5.5. Atividade de Fosfatase

O meio ágar (5,0 g peptona, 5,0 g fosfato de cálcio, 1,0 g glicose e 15,0 g ágar) foi solubilizado em 1000 mL de água deionizada sob agitação magnética, ajustado a pH 7,0 e autoclavado (15 min a 121 °C). A atividade de solubilização de fosfato foi avaliada pela formação de halos claros ao redor das colônias, indicando a degradação do fosfato de cálcio.

2.6. Bioensaio de Atividade Antifúngica

Após o sequenciamento do gene 16S rRNA e avaliação das atividades enzimáticas, um isolado foi selecionado, *B. velezensis* JBC141 que foi avaliado contra os fitopatógenos, pela técnica de placa de cultura dupla. Discos de micélio de cada fitopatógeno (≈ 8 mm Ø) cultivados em meio BDA sólido foram retirados e colocados no centro de placas de Petri de BDA. Em duas extremidades da placa foram adicionados uma cultura de $10 \mu\text{L } 9 \times 10^7$ CFU/mL de JBC141 *B. velezensis*, cultivado por 40 horas a 30 °C em meio LB líquido como representado na (Figura 2). As placas foram incubadas a 27 ± 2 °C em um B.O.D, com 12 horas de fotoperíodo, até o momento em que o fungo da placa controle se desenvolveu por toda placa.

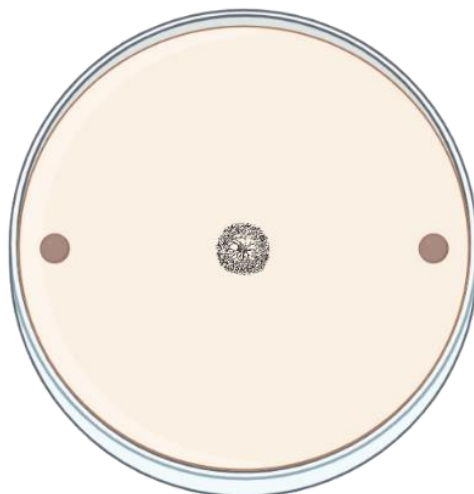


Figura 2. Representação de uma placa de Petri com a técnica de placa de cultura dupla para avaliação do potencial antagônico. **Fonte:** elaborado pelo autor.

As zonas de inibição foram medidas da borda do disco do fungo até o final do crescimento micelial do fungo. Placas de BDA inoculadas com 10 µL de meio LB estéril foram usadas como controles.

Para o cálculo da taxa de inibição do crescimento micelial in vitro (R) foi utilizada a equação:

$$R (\%) = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

Onde R é o percentual de inibição da extensão micelial; D1 é o diâmetro micelial (mm) do conjunto do controle; D2 é o diâmetro micelial exposto ao tratamento, incluindo o tamanho do disco fúngico (mm). Cada tratamento foi aplicado em três placas e repetido três vezes.

2.7. Atividade antifúngica com e sem células vivas

Para averiguar a necessidade de se ter células bacterianas vivas para atividade antifúngica, foram avaliados:

- I. Meio completo – cultura bacteriana (controle positivo);

- II. Proteínas secretadas – obtidas pela centrifugação da cultura bacteriana (30 minutos a 16.000 xg, 4 °C) e filtração do sobrenadante em membrana de 0,22 micrômetro;

Meio LB – Meio LB estéril (controle negativo). Após a obtenção dos extratos foi verificado a atividade antifúngica por meio do halo de inibição conforme descrito no item 2.6.

2.8. Caracterização Inicial dos Extratos

Os extratos que demonstraram atividade antifúngica foram analisados para a verificação de sua natureza proteica ou não, com ensaios de estabilidade térmica e enzimas proteolíticas. Alíquotas dos extratos foram expostas durante 30 minutos às temperaturas de 80 e 100 °C (banho-maria).

Na avaliação de resistência frente a enzimas proteolíticas, o extrato foi incubado com 10 mg/mL da enzima Proteinase K, durante 1 hora a 37 °C. Após o tratamento dos extratos, foi verificada a atividade antifúngica, conforme descrito no item 2.6. Gerando indicativos sobre o componente ativo ser de natureza não proteica, caso haja continuidade da atividade após os tratamentos, ou proteica, se observada a redução ou ausência da atividade.

2.9. Ação antifúngica de VOCs in vitro

No ensaio, duas placas de petri de mesmo diâmetro foram vedadas uma em frente da outra. A placa inferior, contendo meio LB sólido, foi inoculada com 100 µL 9×10^7 CFU/mL de JBC141 *B. velezensis*. A placa superior, contendo meio BDA, receberam um disco (≈ 8 mm Ø) do fitopatógeno fúngico. As placas foram incubadas a 27 ± 2 °C em um B.O.D, com 12 horas de fotoperíodo, até o momento em que o fungo da placa controle se desenvolveu por toda placa.

As placas controle foram preparadas da mesma maneira, exceto que a placa LB não foi inoculada. O desenvolvimento dos micélios fúngicos foram monitorados a cada 24 horas até o crescimento completo na placa controle. A taxa de inibição do crescimento micelial in vitro (R) foi calculada pela mesma equação do item 2.6.

2.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com base nos resultados da caracterização da atividade nos extratos e VOCs, foi selecionado *C. erobotryae* em bioensaios frente ao cultivo completo; sobrenadante livre de células e VOCs. A utilização da microscopia eletrônica de varredura teve como objetivo principal verificar os danos estruturais provocados nos micélios fúngicos pelos diferentes tratamentos, permitindo comparar alterações morfológicas em relação à amostra controle. Para a análise morfológica, ao final dos bioensaios foram coletados fragmentos do micélio fúngico de cada um dos tratamentos e da amostra controle. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (Solarbio, Co. Ltd.) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 18 h e pós-fixadas a 4 °C por 6 h com o mesmo tampão em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, foram submetidas a desidratação em gradiente de etanol (vol/vol) de 30 a 100%. Após esse processo, as amostras foram secas em secador de ponto crítico, metalizadas em ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura Zeiss, modelo Evo MA 10, operando a 10 kV.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem de Bactérias com Atividade Antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos isolados bacterianos foi realizada nos diferentes fungos fitopatogênicos, e os isolados foram avaliados quanto à capacidade

de inibir o crescimento micelial, indicado pela presença de halos de inibição ao redor das colônias.

A triagem antagonista com os isolados bacterianos das cinco espécies de PANCs foi conduzida para identificar aqueles com capacidade de inibir o crescimento dos fitopatógenos fúngicos (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual de isolados bacterianos com atividade associados às espécies de PANCs

PANC	Nº de Isolados	Isolados com	% de isolados ativos
	Totais	atividade antifúngica	por PANC
Peixinho-da-horta	34	10	29,41%
Almeirão-roxo	37	16	43,24%
Ora-pro-nóbis	3	1	33,33%
Capuchinha	21	12	57,14%
Azedinha	26	12	46,15%

A triagem inicial identificou um total de 51 isolados com capacidade de inibição a pelo menos um fitopatógeno fúngico, representando aproximadamente 45,5% do total avaliado. Observou-se uma variação na proporção de isolados ativos entre as espécies de PANCs, com destaque para Capuchinha e Azedinha, que exibiram os maiores percentuais de isolados com atividade antifúngica (57,14% e 46,15%, respectivamente). Os resultados da triagem de atividade antifúngica demonstraram que alguns isolados bacterianos apresentam um alto potencial como agentes de biocontrole. Entre os isolados avaliados, alguns se destacam pela amplitude da sua ação, inibindo múltiplos fungos patogênicos.

Um total de 51 isolados demonstraram atividade antifúngica neste primeiro teste de seleção (Figura 3), sendo selecionados para identificação taxonômica, submetidos ao sequenciamento do gene 16S rRNA.

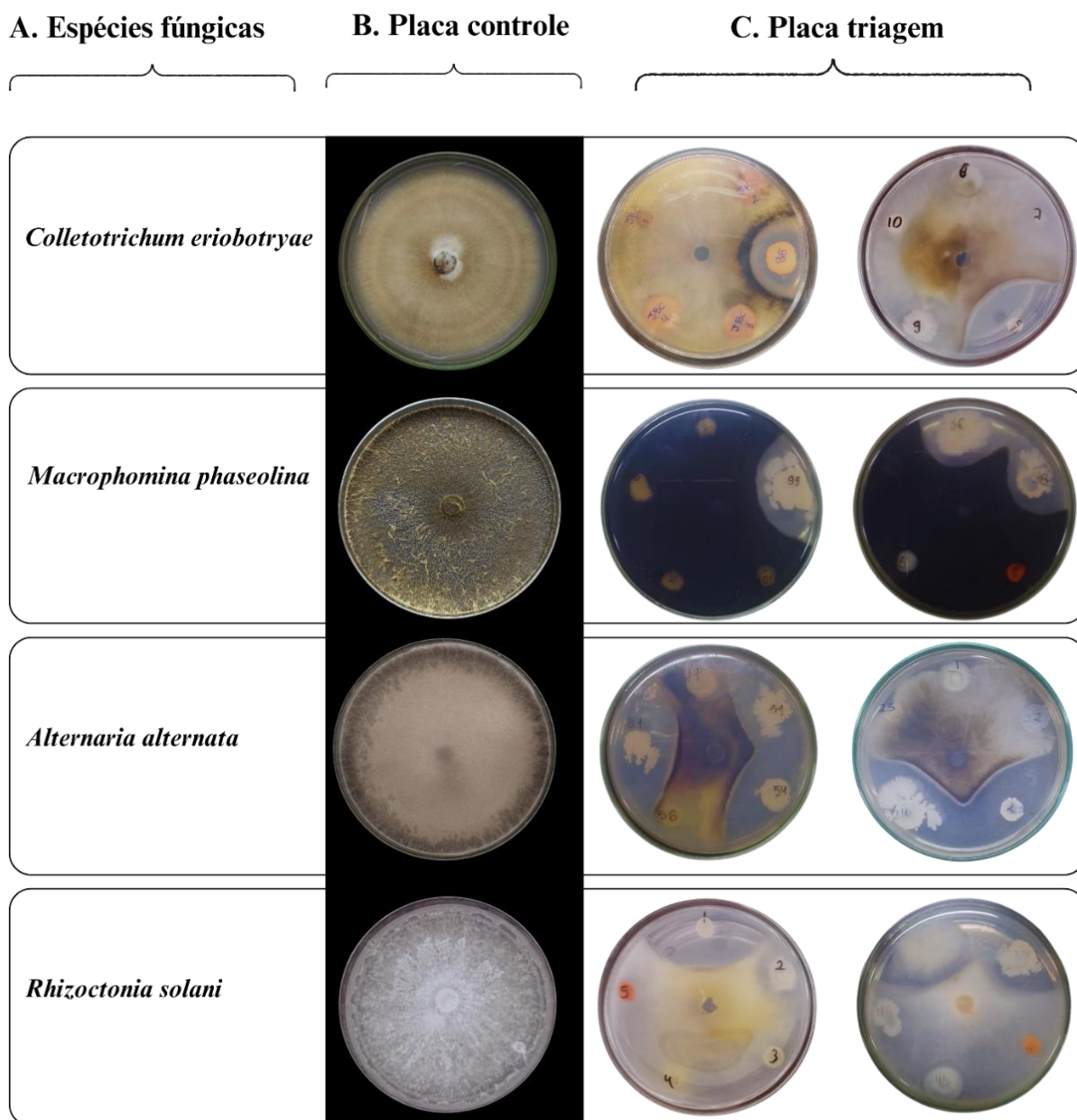


Figura 3. Ensaio de triagem para avaliação da atividade antagonista de bactérias contra um fungo patogênico. Coluna **A** apresenta o nome dos fitopatógenos apresentados. Coluna **B** representa o **controle**, onde apenas o fungo foi cultivado nas placas de Petri, sem a presença de bactérias. A coluna **C** representam a **triagem** com cinco isolados bacterianos aplicados em pontos equidistantes ao redor do fungo. Cada ponto de inoculação na coluna C contém uma bactéria isolada específica.

3.2. Triagem de Bactérias com Atividade inseticida

Os 112 isolados bacterianos testados não apresentaram atividade inseticida contra lagartas neonatas de *S. frugiperda* após seis dias de bioensaio. A mortalidade das larvas nos tratamentos com os isolados foi semelhante à observada no controle negativo (meio LB estéril), como ilustrado nas imagens C e D, enquanto o controle positivo com *Bacillus thuringiensis* HD125 (Figura 4 B) demonstrou elevada mortalidade larval, validando a eficácia do ensaio. A Figura 4 A representa o controle negativo, no qual as lagartas se desenvolveram normalmente.

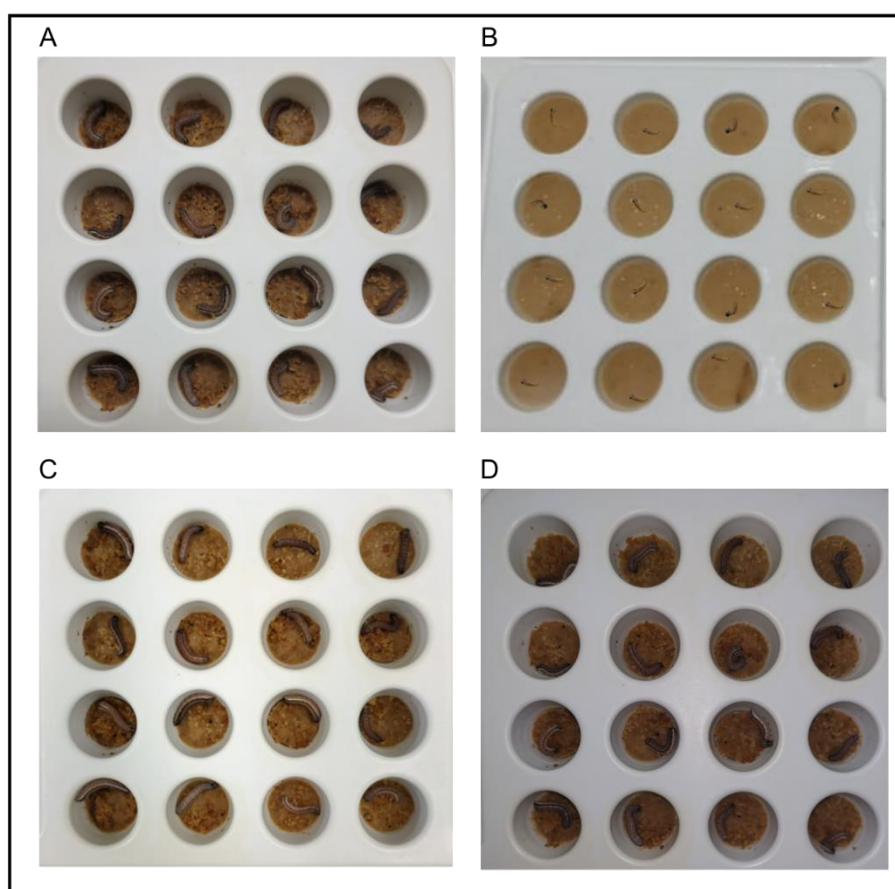


Figura 4. Triagem de atividade inseticida de isolados bacterianos endofíticos contra lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda*. **A** Controle negativo: dieta tratada com meio LB estéril, sem mortalidade larval. **B** Controle positivo: tratamento com *Bacillus thuringiensis* HD125, com alta mortalidade das lagartas. **C** e **D** Tratamentos com isolados bacterianos endofíticos, sem efeito tóxico observado, semelhantes ao controle negativo.

A ausência de toxicidade larval nos tratamentos com os isolados destaca a especificidade funcional das bactérias endofíticas estudadas, que demonstraram apenas atividade antifúngica nos testes prévios. Essa especificidade é altamente desejável, pois reduz o risco de efeitos colaterais sobre organismos não-alvo, como inimigos naturais e insetos polinizadores, o que é fundamental para o desenvolvimento de bioinsumos seguros e sustentáveis (Ruiu, 2015).

Diante desses resultados, os isolados que apresentaram atividade antifúngica foram selecionados para análises posteriores de sequenciamento e caracterização funcional. Isso reforça seu potencial como agentes de biocontrole com aplicação direcionada, minimizando impactos ecológicos negativos e favorecendo estratégias compatíveis com o manejo integrado de pragas (MIP).

3.3. Identificação dos Isolados Ativos

Para a identificação dos isolados bacterianos com atividade antifúngica, foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA. Esse procedimento permitiu classificar os isolados até o nível de gênero e aproximação das espécies, proporcionando uma caracterização taxonômica detalhada dos microrganismos associados às PANCs. Os resultados indicaram uma diversidade de espécies, principalmente do gênero *Bacillus*, além de outros gêneros como *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Priestia*, entre outros (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação taxonômica dos isolados bacterianos com atividade antifúngica.

Espécie	Nº de isolados	Acesso NCBI
<i>Bacillus velezensis</i>	7	NR_075005.2
<i>Bacillus rugosus</i>	5	NR_181236.1
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	4	NR_102783.2
<i>Bacillus wiedmannii</i>	2	NR_152692.1

<i>Bacillus licheniformis</i>	1	NR_118996.1
<i>Bacillus sanguinis</i>	5	NR_175555.1
<i>Bacillus stercoris</i>	1	NR_181952.1
<i>Bacillus aerophilus</i>	1	NR_042339.1
<i>Bacillus safensis</i>	1	NR_113945.1
<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	1	NR_148786.1
<i>Priestia megaterium NBR</i>	1	NR_112636.1
<i>Pantoea agglomerans</i>	5	NR_114735.1
<i>Pantoea allii</i>	2	NR_115258.1
<i>Pseudomonas oryzae</i>	1	NR_117269.1
<i>Rosenbergiella epipactidis</i>	1	NR_126303.1
<i>Lelliottia aquatilis</i>	1	NR_179968.1
<i>Microbacterium testaceum</i>	1	NR_026163.1
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	1	NR_074869.1

Os resultados da identificação taxonômica revelaram que a maioria dos isolados pertencem ao gênero *Bacillus*, que é reconhecido por sua produção de compostos bioativos com atividade antifúngica (Bidima et al., 2022). A relação entre as espécies bacterianas e as PANCs (Figura 5) demonstra que *B. sanguinis* e *B. rugosus* foram amplamente isolados de diversas plantas, evidenciando uma associação adaptativa relevante. Outras espécies, como *P. oryzae* e *R. epipactidis*, foram específicas para certas PANCs, o que pode indicar interações especializadas.

A distribuição das espécies bacterianas (Figura 5) encontradas neste estudo é consistente com outros trabalhos que identificaram espécies do gênero *Bacillus* como predominante em ambientes vegetais, especialmente em plantas adaptadas a condições adversas (Bokhari et al., 2019). As espécies do gênero *Bacillus* são amplamente reconhecidas por sua capacidade de produzir compostos bioativos com atividade antifúngica. Estudos recentes confirmam que espécies como *B. velezensis* e *B. subtilis* produzem lipopeptídeos e outros metabólitos secundários que inibem o crescimento de diversos fitopatógenos (Ortiz et al., 2024).

	Peixinho	Almeirão	Ora-pro-nóbis	Capuxinha	Azedinha
<i>Bacillus velezensis</i>	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Bacillus licheniformis</i>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
<i>Bacillus subtilis</i>	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Bacillus stercoris</i>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Bacillus rugosus</i>	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente
<i>Bacillus sanguinis</i>	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
<i>Bacillus safensis</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Bacillus aerophilus</i>	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Bacillus wiedmannii</i>	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Pantoea agglomerans</i>	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Pantoea allii</i>	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
<i>Priestia megaterium</i>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Rosenbergiella epipactidis</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Lelliottia aquatilis</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Microbacterium testaceum</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
<i>Erwinia tasmaniensis</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente

Legenda
 Ausente
 Presente

Figura 5. O gráfico indica a presença (verde escuro) ou ausência (verde claro) de cada espécie bacteriana nas PANCs avaliadas: Peixinho, Almeirão, Ora-pro-nóbis, Capuxinha e Azedinha.

O gênero *Pantoea* também foi identificado entre os isolados com atividade antifúngica. Embora algumas espécies de *Pantoea* sejam conhecidas como fitopatógenos, outras atuam como endofíticos benéficos, produzindo compostos com atividade antimicrobiana (Valbuena-Rodríguez et al., 2024). Por exemplo, *P. agglomerans* é relatada por produzir bacteriocinas que inibem o crescimento de patógenos de plantas (P et al., 2023).

Os demais gêneros, como *Pseudomonas*, *Priestia* e *Rosenbergiella*, foram menos representados, mas têm relevância biotecnológica. Por exemplo, *P. oryzihabitans* é relatada na literatura por sua capacidade de produzir compostos antifúngicos e antibacterianos (Ioannis Vagelas, 2012). *P. megaterium* é amplamente utilizada em aplicações industriais devido à sua robustez e capacidade de produzir enzimas e biopolímeros (Biedendieck et al., 2021; Mayer et al., 2022). *R. epipactidis*, um gênero menos estudado, foi identificado recentemente como endofítico, com potencial para estudos futuros (Lenaerts et al., 2014).

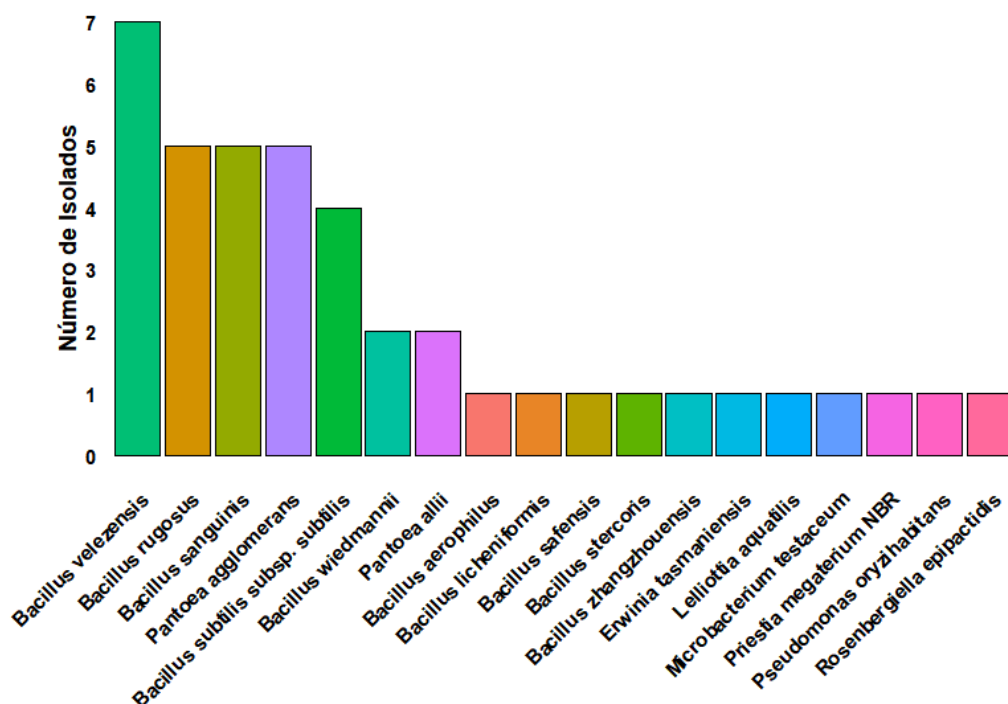


Figura 6. A figura apresenta a distribuição do número de isolados bacterianos por espécie. O eixo vertical representa o número de isolados, enquanto o eixo horizontal mostra as espécies identificadas. Cada barra colorida indica a quantidade de isolados associados a cada espécie bacteriana.

A diversidade de gêneros bacterianos isolados das PANCs sugere um potencial significativo para a descoberta de novos agentes de biocontrole. Estudos indicam que plantas adaptadas a ambientes adversos abrigam comunidades microbianas com características desejáveis, e com potencial para a produção de metabólitos bioativos (Coertjens et al., 2024).

3.4. Enzimas Hidrolíticas

Após o sequenciamento foi um isolado de cada espécie foi selecionado para a avaliação das enzimas hidrolíticas que revelou uma diversidade de atividades entre os isolados. Os resultados apresentados no “heatmap” (Figura 7) mostram a atividade enzimática de diferentes isolados bacterianos para seis enzimas: protease, esterase, lipase, CMC (carboximetilcelulase), fosfatase e amilase, todos relevantes para o biocontrole de fitopatógenos. A intensidade das cores reflete a presença e o nível de

atividade dessas enzimas, onde tons mais intensos indicam maior atividade enzimática, medida em uma escala de inibição em centímetros.

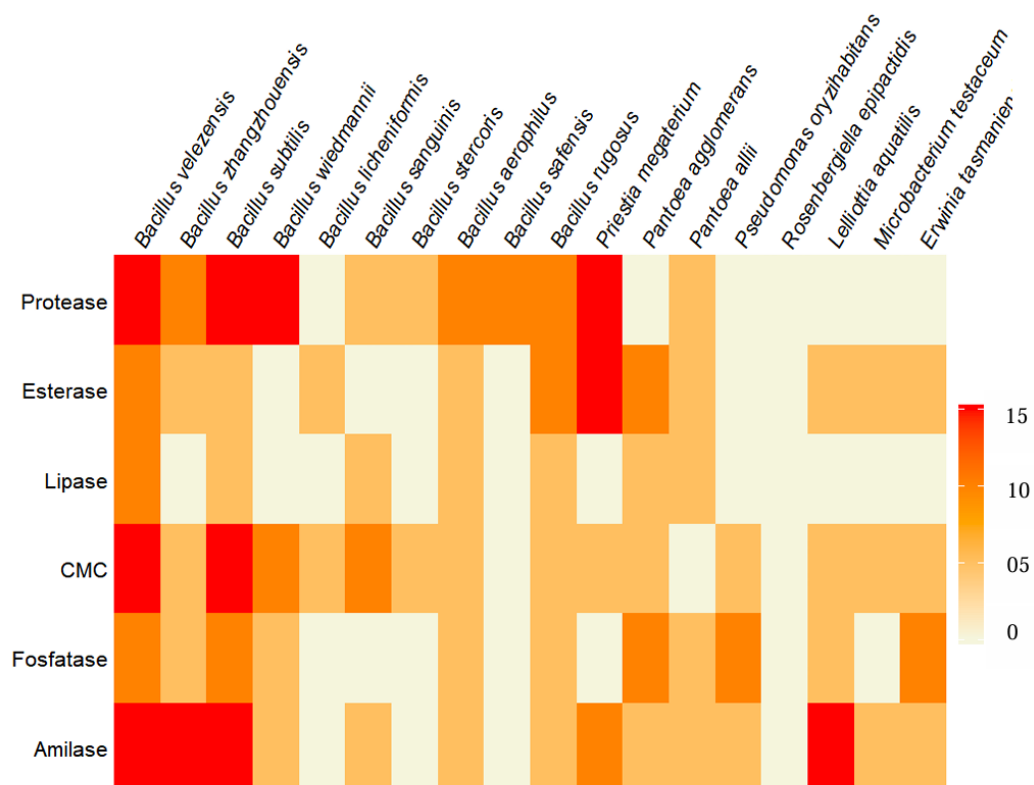


Figura 7. Heatmap mostrando a atividade enzimática de diferentes isolados bacterianos testados para seis enzimas: protease, esterase, lipase, CMC (carboximetilcelulase), fosfatase e amilase. As intensidades das cores representam o nível de atividade enzimática, medido em centímetros, onde tons mais intensos indicam maior atividade. Isolados com zonas de inibição iguais ou superiores a 15 mm foram considerados os mais eficazes.

Entre os isolados avaliados, *B. velezensis* destacou-se por apresentar atividade elevada para protease, CMC e amilase, com zonas de inibição iguais ou superiores a 15 mm, além de atividade moderada para esterase, lipase e fosfatase. Esse perfil enzimático é relevante no contexto de controle biológico, pois enzimas como protease e amilase são essenciais para a degradação de proteínas e amidos, componentes estruturais presentes nas paredes celulares de muitos fitopatógenos fúngicos, contribuindo para a sua desestabilização (Kim et al., 2022). A atividade celulolítica elevada, indicada pela CMC, reforça o potencial de *B. velezensis* na degradação da celulose, também encontrada nas estruturas fúngicas, o que aumenta sua eficácia potencial como agente de biocontrole (Myo et al., 2019).

Além da capacidade elevada de controlar vários fitopatógenos, a escolha de *B. velezensis* para dar continuidade aos estudos se baseia em vários fatores que destacam seu potencial como agente de biocontrole. A análise de placas enzimáticas (Figura 8) demonstra visualmente os halos de inibição de *B. velezensis* nos testes enzimáticos.

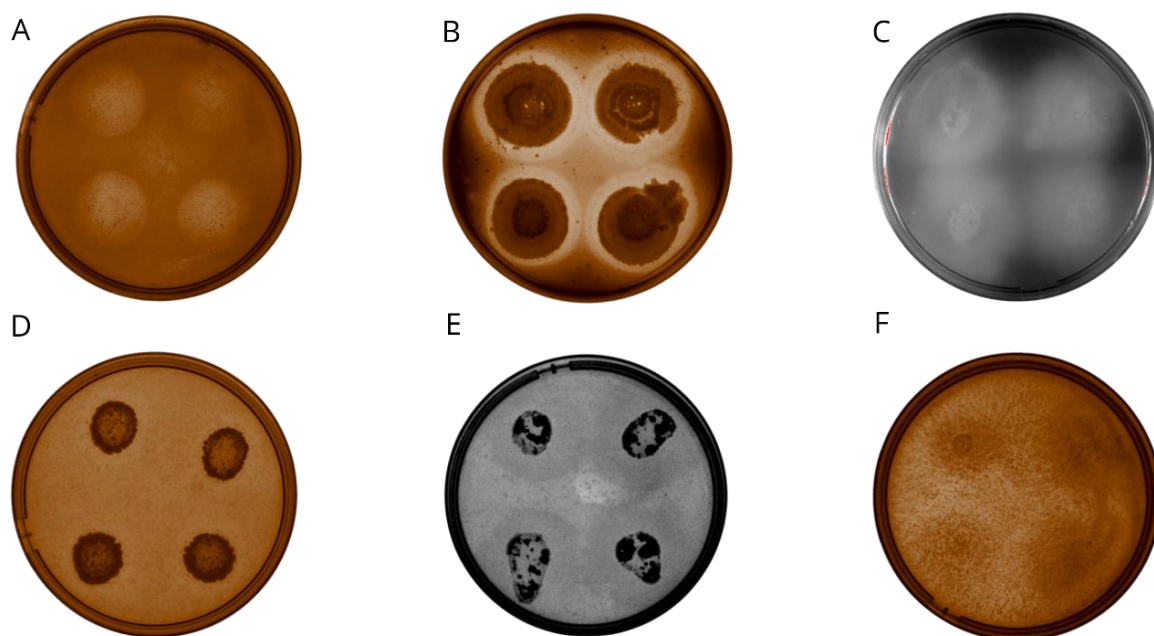


Figura 8. Placas enzimáticas demonstrando a atividade de *Bacillus velezensis* em diferentes substratos: (A) CMC (carboximetilcelulase), (B) Protease, (C) Amilase, (D) Lipase, (E) Esterase e (F) Fosfatase. A presença de halos ou zonas de clareamento ao redor das áreas de inoculação indica a degradação dos substratos específicos.

3.5. Teste de cultura dupla

O bioensaio de cultura dupla foi realizado com o isolado *B. velezensis* JBC141, selecionado com base em sua destacada atividade antagonista contra uma ampla gama de fitopatógenos fúngicos da Micoteca avaliada e por sua capacidade de degradação enzimática.

Os resultados obtidos estão apresentados no (Figura 9), que ilustra os percentuais de inibição do crescimento micelial para cada fungo avaliado, em

comparação ao controle. O isolado *B. velezensis* JBC141 demonstrou uma eficácia significativa, com percentuais de inibição variando de **50% a 97,5%**, dependendo do fitopatógeno avaliado.

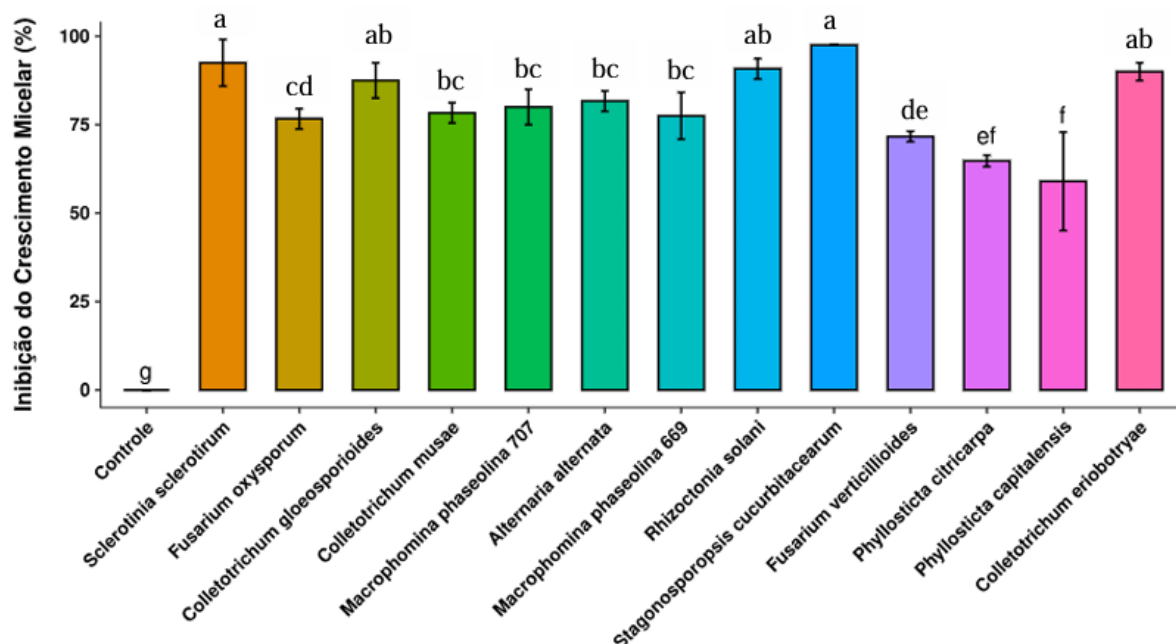


Figura 9. Percentual de inibição do crescimento micelial (%) de diferentes fitopatógenos fúngicos pelo isolado *Bacillus velezensis* JBC141, em comparação ao controle. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão. As letras acima das barras indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, conforme análise de variância seguida do teste de comparações múltiplas ($p < 0,05$).

O isolado *B. velezensis* JBC141 demonstrou resultados estatisticamente significativos no bioensaio de cultura dupla, com destaque para a inibição quase total do crescimento micelial de *S. cucurbitacearum*, *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *C. gloeosporioides* e *C. eriobotryae* que apresentaram os maiores percentuais de inibição, posicionando-se nos agrupamentos estatísticos superiores (letras "a" e "ab"). Esses resultados evidenciam a alta eficácia de *B. velezensis* JBC141 contra esses importantes fitopatógenos.

Outro grupo relevante é representado pelos patógenos *F. oxysporum*, *C. musae*, *M. phaseolina* (707 e 669) e *A. alternata* que também apresentaram inibições significativas, sendo classificados em agrupamentos intermediários. Esses dados reforçam o amplo espectro de ação do isolado. Por outro lado, os patógenos *P. citricarpa* e *P. capitalensis* mostraram menor sensibilidade ao isolado, posicionando-se nos agrupamentos estatísticos inferiores. Apesar disso, ambos tiveram percentuais de inibição superiores a 50%, indicando uma ação ainda relevante.

O método cultura dupla é uma ferramenta prática e direta que permite investigar múltiplos fatores envolvidos na interação entre o agente biocontrolador e o fitopatógeno, como competição por nutrientes ou espaço, a presença de componentes da superfície celular e a secreção de metabólitos voláteis ou solúveis, que podem ser induzidos ou constitutivos (Bodil et al., 2022; Raymaekers et al., 2020). No caso de *B. velezensis* JBC141, os resultados demonstraram não apenas alta eficácia contra patógenos amplamente relevantes na agricultura, mas também fornecem uma base sólida para sua aplicação em estratégias integradas de manejo de doenças. A análise estatística confirma a consistência dos resultados, destacando a confiabilidade e o amplo espectro de ação do isolado.

3.6. Atividade antifúngica com e sem células vivas

A avaliação da atividade antifúngica de *Bacillus velezensis* JBC141 foi conduzida comparando o cultivo contendo células vivas e o filtrado contendo apenas proteínas secretadas. Os resultados apresentados no (Figura 10) destacam diferenças claras na inibição do crescimento micelial entre os tratamentos

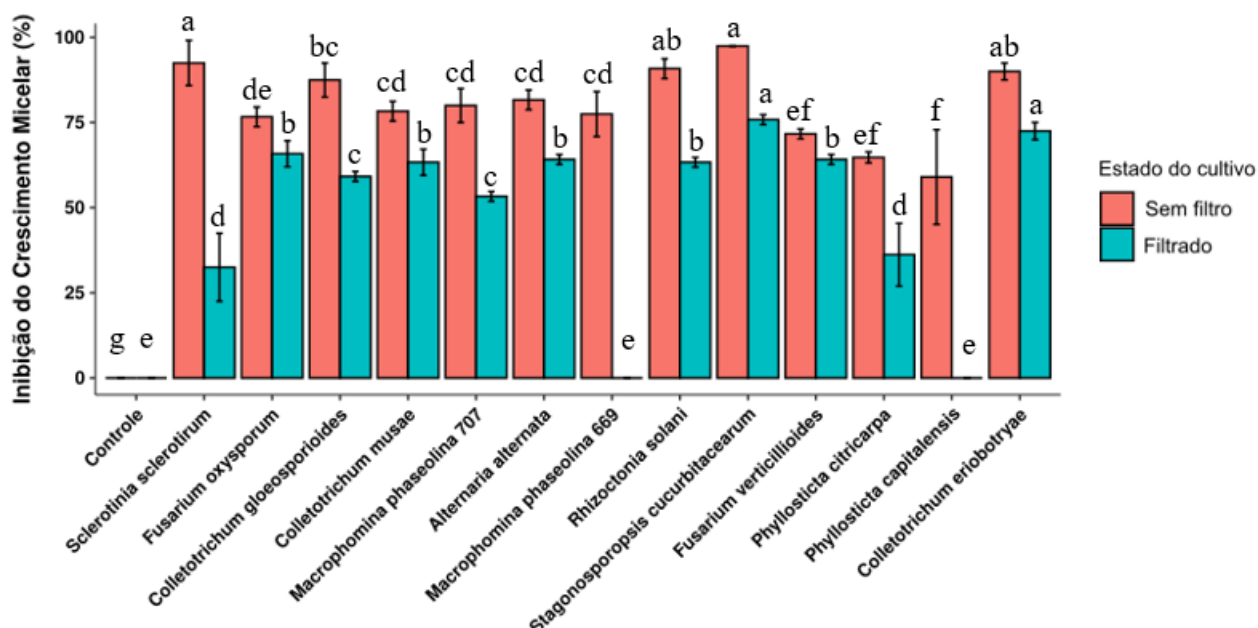


Figura 10. Comparação da atividade antifúngica de *Bacillus velezensis* (isolado JBC 141) em diferentes condições: cultivo contendo células vivas e filtrado contendo proteínas secretadas. As barras representam a média e o desvio padrão da inibição micelial (%). As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas significativas entre os fungos, conforme o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os maiores índices de inibição foram observados para os tratamentos contendo células vivas ("Não filtrado"), que apresentaram os valores mais altos para fungos como *S. sclerotiorum*, *R. solani*, *C. eriobotryae* e *S. cucurbitacearum*, atingindo valores próximos a 100% de inibição. Esses resultados receberam as letras "a" e "ab", destacando-se significativamente em relação ao controle (0% de inibição, letra "g"), evidenciando o efeito potencializador das células vivas na produção de compostos antifúngicos e/ou sua interação direta com os fitopatógenos (Figura 11).

O filtrado, que contém proteínas secretadas e metabólitos, também demonstrou atividade antifúngica relevante, embora inibições inferiores aos tratamentos com células vivas em grande parte dos casos. Os melhores resultados de inibição micelial utilizando o filtrado, representadas pela letra "a" foram observados para *C. eriobotryae* e *S. cucurbitacearum*, com inibições acima de 70%.

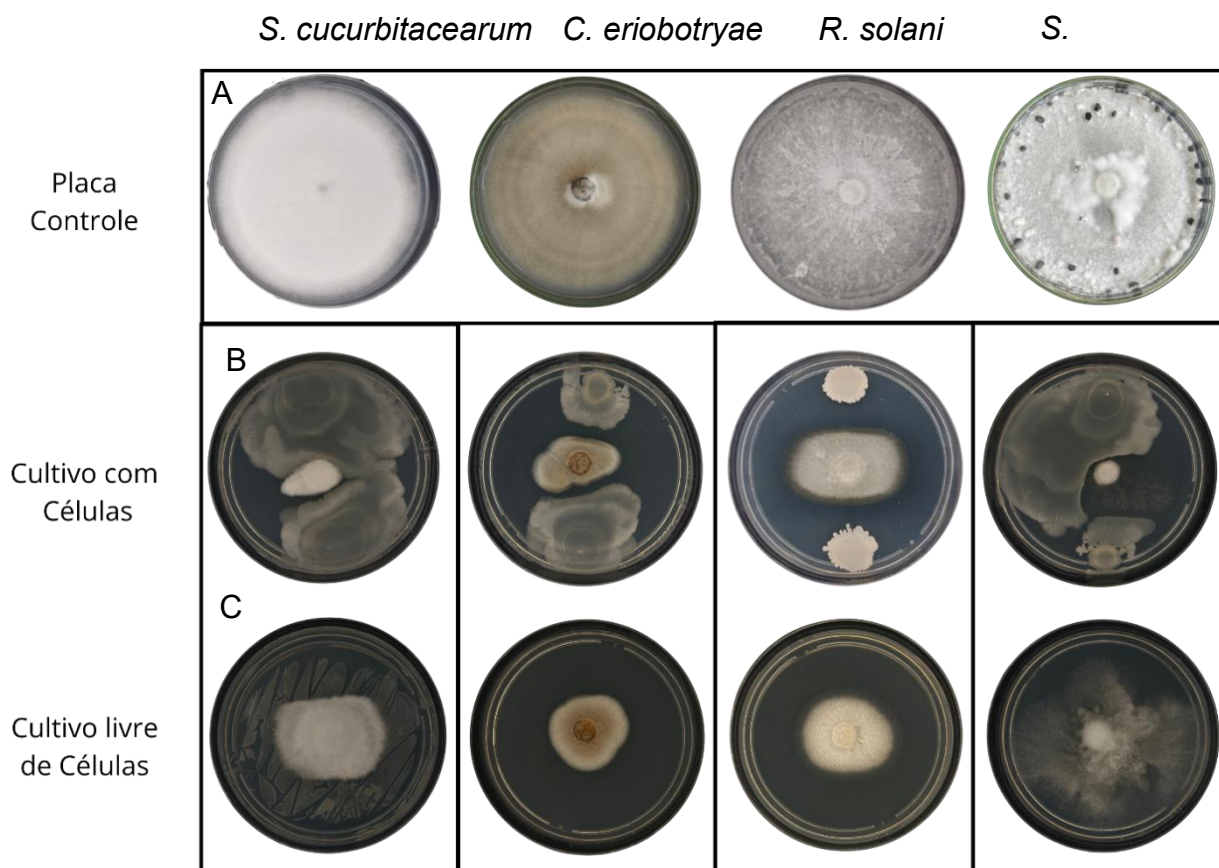


Figura 11. Teste de cultura dupla com e sem a presença de células vivas, dos melhores resultados de inibição. A em linha as placas controle. B em linha, tratamento com a presença de células. C em linha tratamentos livres de células.

Os resultados intermediários representados pelas letras “b” e “c”, também foram relevantes com inibição superior a 50%. O controle, como esperado, não apresentou inibição letra “e”, reforçando a eficácia dos tratamentos avaliados. Esses resultados indicam que, para esses fitopatógenos, os compostos secretados por *B. velezensis* JBC141 são altamente eficazes, mesmo na ausência de células bacterianas, reforçando o potencial do filtrado como alternativa viável em estratégias de biocontrole, especialmente em sistemas agrícolas onde a aplicação de células vivas possa ser limitada.

Esses resultados indicam um amplo espectro de ação contra fitopatógenos, destacando-se sua capacidade de inibir fungos de importância agrícola. Esses dados corroboram com estudos recentes que também destacam o papel de *B. velezensis* na produção de metabólitos bioativos, como lipopeptídeos (iturina, fengicina e

surfactina) (Akintayo et al., 2023). Os lipopeptídeos são amplamente reconhecidos por sua eficácia na proteção direta às plantas atuando na supressão de doenças por meio de antibiose (Meena and Kanwar, 2015) e indiretamente, promovendo a resistência sistêmica induzida, que estimula a resposta imunológica precoce e ativa os mecanismos de defesa das plantas (Tsotetsi et al., 2022).

3.7. Caracterização Inicial dos Extratos

Tabela 4. Eficácia Comparativa de Inibição de Crescimento Micelial (%) de *B. velezensis* JBC141, Com e Sem a Presença de Células em Diferentes Condições Térmicas.

	Cultivo com células (%)		Cultivo livre de células (%)		
	80°C	100°C	80°C	100°C	Proteinase K
Controle	0,0 f A	0,0 f A	0,0 e A	0,0 e A	0,0 f A
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	93,3 a A	88,3 a B	60,8 b C	30,8 d E	51,7 c D
<i>Fusarium oxysporum</i>	72,5 c B	79,2 ab A	57,5 b D	56,7 c E	65,8 bc C
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	70,8 c A	70,8 c A	49,2 c D	62,5 bc B	53,3 c C
<i>Colletotrichum musae</i>	87,5 a A	85,8 ab B	55,8 b E	65,8 ab D	70,8 ab C
<i>Macrophomina phaseolina</i> 707	65,8 cd A	64,2 d B	44,2 c C	0,0 e E	15,0 e D
<i>Alternaria alternata</i>	85,0 ab A	77,5 bc B	62,5 b E	71,7 a C	64,2 bc D
<i>Macrophomina phaseolina</i> 669	56,7 d B	58,3 d A	0,0 e C	0,0 e C	0,0 f C
<i>Rhizoctonia solani</i>	70,8 c B	72,5 bc A	63,3 ab E	67,5 ab D	68,3 ab C
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	66,7 cd B	76,7 bc A	65,0 ab C	61,7 c E	65,8 bc D
<i>Fusarium verticillioides</i>	81,7 ab A	72,5 bc C	73,3 a B	61,7 c D	73,3 ab B
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	61,0 cd A	52,4 de B	33,3 d C	25,7 d E	33,3 d C
<i>Phyllosticta capitalensis</i>	40,8 e B	41,7 e A	7,5 e D	0,0 e E	10,8 e C
<i>Colletotrichum eriobotryae</i>	84,2 ab A	81,7 ab B	69,2 a D	74,2 a C	81,67 a B

*

Percentual de inibição do crescimento micelial de diferentes fitopatógenos em cultivos com células e cultivos livres de células de *Bacillus velezensis* JBC141, submetidos a diferentes tratamentos térmicos (80°C e 100°C) e à ação de proteinase K. As letras minúsculas indicam diferenças estatísticas dentro de cada coluna, onde os tratamentos são comparados entre si para cada fungo ($p < 0,05$). As letras maiúsculas representam diferenças estatísticas dentro de cada linha, onde os diferentes tratamentos são comparados individualmente para cada fungo ($p < 0,05$). Dados apresentados como média ($n = 3$).

Os resultados obtidos a partir da avaliação dos tratamentos térmicos (80°C e 100°C) com e sem células bacterianas, bem como o tratamento com Proteinase K, revelam diferenças significativas na eficácia de inibição do crescimento micelial para os diferentes fungos testados. O controle, como esperado, não apresentou atividade inibitória significativa, com 0% de inibição em todas as condições avaliadas, sendo estatisticamente diferente de todos os tratamentos avaliados.

Os resultados do cultivo completo nas temperaturas de 80°C e 100°C, apresentados na tabela 06 são representados graficamente (Figura 12) evidenciando que os tratamentos mantiveram altos índices de inibição (>70%) para a maioria dos fungos avaliados, destacando *S. sclerotiorum* e *C. musae* como os mais suscetíveis, que possuem estruturas celulares mais vulneráveis aos compostos bioativos termorresistentes produzidos por *B. velezensis* JBC141. Este comportamento ressalta a eficácia do tratamento na supressão de fungos amplamente problemáticos na agricultura.

Outro destaque importante é o comportamento de *C. eriobotryae*, que apresentou inibição superior a 80% em ambas as temperaturas, mantendo-se nos extratos mais altos de significância (letras "ab"). Este resultado reafirma a eficácia dos compostos bioativos secretados por *B. velezensis* JBC141, mesmo sob condições térmicas distintas. Essa estabilidade no desempenho é desejável para estratégias de biocontrole.

No entanto, fungos como *P. citricarpa* e *P. capitalensis* apresentaram menores níveis de inibição (<65%), sugerindo uma resistência relativa a esses tratamentos. Mesmo estando alocadas nos extratos mais baixos da significância estatística as inibições foram superiores a 40%.

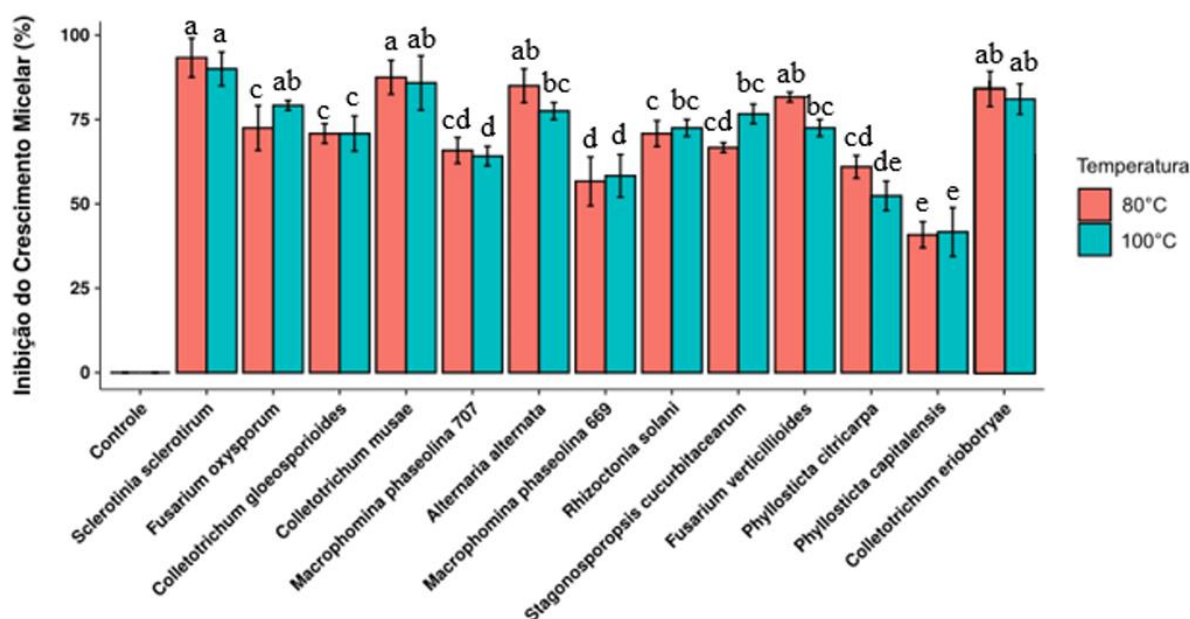


Figura 12. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos pelo cultivo completo de *Bacillus velezensis* em temperaturas de 80°C e 100°C. As barras representam a média e o desvio padrão da inibição micelial (%). As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas significativas entre os fungos, conforme o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para o cultivo filtrado e o cultivo completo de JBC141 *B. velezensis* demonstram diferenças significativas na inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos avaliados, destacando a eficácia das diferentes abordagens de tratamento.

No cultivo filtrado (Figura 13), *C. eriobotryae* apresentou os índices mais elevados de inibição, com diferença estatística representada pela letra "a" em ambas as temperaturas (80°C e 100°C). Este resultado reforça o papel dos metabólitos extracelulares na eficácia antifúngica, mesmo na ausência de células bacterianas. No cultivo completo, o mesmo fungo também se destacou, sendo classificado com a letra "ab" para as duas temperaturas, indicando uma ação consistente e eficaz.

Comparando os dois tratamentos, fungos como *F. verticillioides* e *A. alternata* também apresentaram inibição elevada em ambos os tratamentos, reforçando a eficiência dos compostos bioativos produzidos por *B. velezensis* JBC141. Além disso,

R. solani e *S. cucurbitacearum* destacaram-se por manter inibição consistente entre 50% e 60% em ambas as temperaturas.

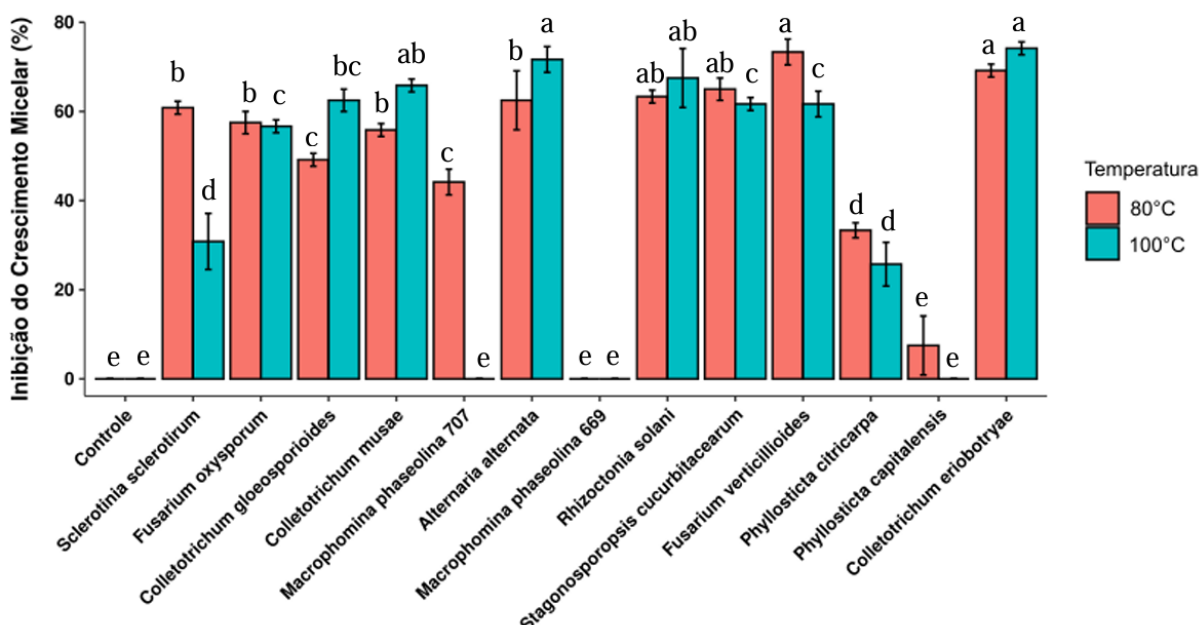


Figura 13. Porcentagem de inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos pelo cultivo filtrado de *Bacillus velezensis* submetido a 80°C e 100°C. As barras representam a média e o desvio padrão da inibição micelial (%). As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas significativas entre os fungos, conforme o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Por outro lado, fungos como *P. capitalensis* e *M. phaseolina 669* apresentaram os piores resultados. A inibição para *P. capitalensis* foi inferior a 10% em todas as condições (letra "e"), enquanto *M. phaseolina 669* não apresentou qualquer inibição, mostrando-se totalmente resistente aos compostos secretados quando submetidos ao estresse térmico. *M. phaseolina 707*, apresentou uma inibição moderada em torno de 40% para o tratamento térmico a 80 °C, mas perdeu todo efeito quando o tratamento foi aquecido a 100°C. Esses resultados indicam a limitação de compostos isolados contra determinados fungos e a necessidade de estratégias complementares.

Comparando com o cultivo completo, a presença de células bacterianas mostrou-se fundamental para a eficácia de alguns dos tratamentos, especialmente

contra fungos como *S. sclerotiorum* e *F. oxysporum*, cujas inibições atingiram 93% e 72%, respectivamente, no cultivo não filtrado. E os fungos *M. phaseolina* (669 e 707) e *P. capitalensis* que tiveram o efeito inibitório perdido. Em contrapartida, a diferença entre o cultivo completo e filtrado foi menor para fungos como *R. solani* e *S. cucurbitacearum*, sugerindo que os compostos secretados são importantes e possuem boa parte da atividade antifúngica.

Complementando os resultados anteriores, o tratamento com Proteinase K (Figura 14) apresentou resultados que também indicam diferenças significativas na inibição do crescimento micelial dos fungos avaliados. Como o *C. erobotryae* que foi o principal destaque, apresentando os maiores índices de inibição (letra "a"), reforçando sua sensibilidade aos compostos resistentes à ação enzimática, evidenciando que parte dos metabólitos bioativos de *B. velezensis* JBC141 mantém sua eficácia mesmo após a degradação de proteínas. Outros fungos, como *A. alternata*, *R. solani* e *S. cucurbitacearum*, também se destacaram com inibição moderada (letras "ab" e "bc"), indicando uma resposta intermediária ao tratamento.

Mantendo o padrão dos tratamentos sem a presença de células, *P. capitalensis* e *M. phaseolina* (707 e 669) apresentaram os menores índices de inibição (letras "e" e "f"), o que sugere uma menor eficácia dos compostos ativos neste tratamento para esses fitopatógenos específicos.

Comparando com os demais tratamentos, o Proteinase K mostrou resultados similares ao cultivo filtrado em termos de eficiência para fungos como *C. musae* e *F. verticillioides*. No entanto, *C. erobotryae* manteve-se como o mais sensível em todos os tratamentos, consolidando-se como o fungo mais suscetível à ação de *B. velezensis* JBC141. Esses resultados reforçam que mesmo após a degradação de proteínas por Proteinase K, compostos secundários, como lipopeptídeos, podem desempenhar um papel crucial na atividade antifúngica.

Comparando os dados deste estudo com os de Andrić et al., (2020), observa-se que *B. velezensis* apresenta eficiência semelhante ou superior à observada com outros agentes biológicos amplamente utilizados no controle de *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp, *R. solani* e *S. sclerotiorum*. Isso reforça a relevância do isolado

JBC141 como alternativa sustentável aos antifúngicos químicos, especialmente considerando sua eficácia em diferentes condições térmicas e sua ação consistente mesmo após tratamentos com Proteinase K.

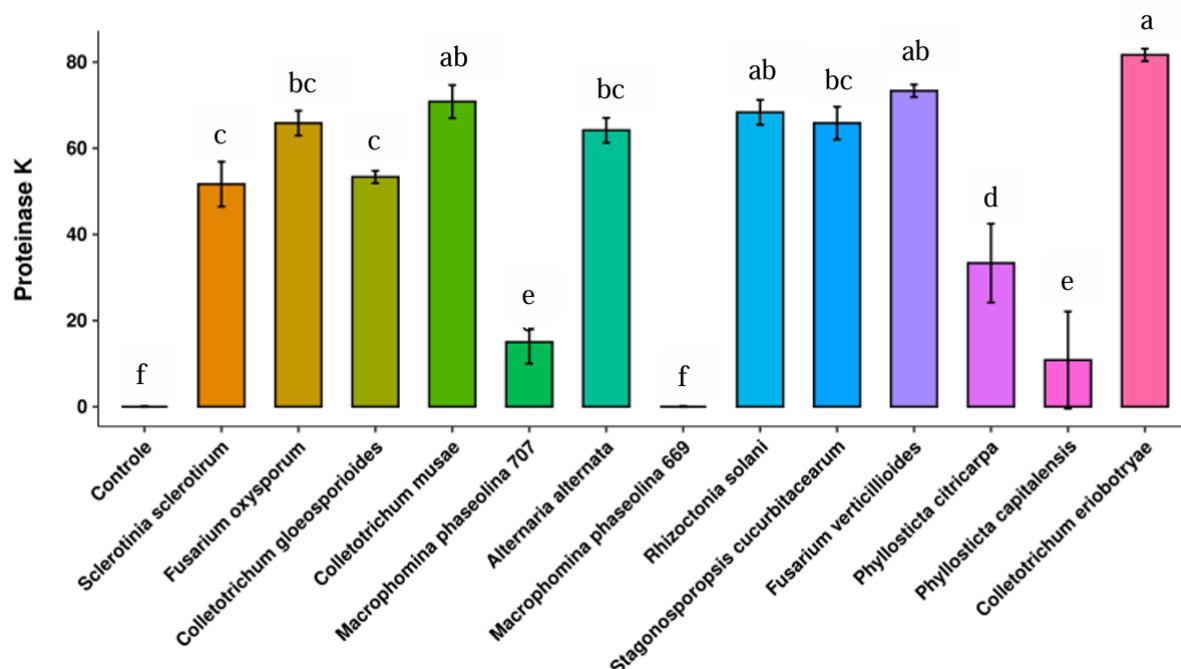


Figura 14. Percentual de inibição do crescimento micelial dos fungos tratados com o cultivo filtrado de *Bacillus velezensis* submetido à ação de Proteinase K. As barras representam a média e o desvio padrão da inibição micelial (%). As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas significativas entre os fungos, conforme o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.8. Avaliação de VOCs

Os resultados da inibição do crescimento micelial por compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por *B. velezensis* JBC141 mostram variações significativas na eficácia contra os diferentes fungos testados (Figura 15). *R. solani* e *C. eriobotryae* destacaram-se como os fungos mais inibidos, com níveis de inibição acima de 40% (letra "a"), seguido de *C. gloeosporioides* com inibição próxima a 40% evidenciando a alta capacidade antifúngica dos compostos voláteis produzidos por *B. velezensis* JBC141 contra esses patógenos. *C. musae* e *P. citricarpa* apresentaram inibição intermediária, com percentuais na faixa de 25% a 30% (letras "b" e "c"),

enquanto todos os demais fungos, incluindo o controle, apresentaram níveis muito baixos ou ausência de inibição, classificados com a letra "d".

Quando comparados aos resultados dos tratamentos térmicos e do cultivo filtrado com Proteinase K, observa-se que os compostos voláteis possuem uma eficácia mais restrita, afetando um menor número de fungos. Por exemplo, enquanto *C. eriobotryae* continuou a se destacar com elevada inibição em todos os tratamentos avaliados, alguns fungos como *S. sclerotiorum*, que apresentaram bons resultados nos outros tratamentos, não foram significativamente inibidos pelos compostos voláteis. Esses resultados indicam que os mecanismos de ação variam entre os diferentes tratamentos, com os compostos voláteis possuindo um espectro de ação mais específico e potencial para aplicação em situações específicas de manejo integrado de doenças agrícolas.

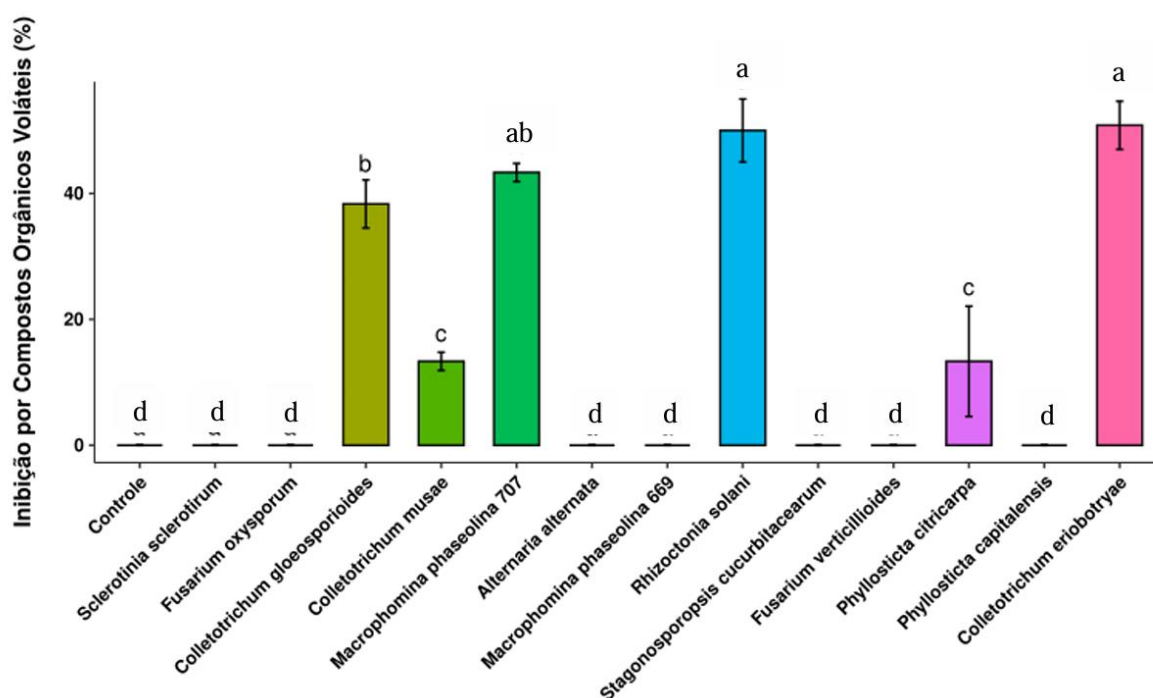


Figura 15. Inibição do crescimento micelial (%) de fungos fitopatogênicos por compostos orgânicos voláteis (VOCs) produzidos por *Bacillus velezensis* JBC141. As barras representam a média e o desvio padrão da inibição micelial (%). As letras sobre as barras indicam diferenças estatísticas significativas entre os fungos, conforme o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Outro aspecto relevante é a comparação dos demais tratamentos com VOCs, que demonstraram eficácia mais específica. No entanto, a alta inibição de *C.*

eriobotryae por VOCs (40%) sugere que a combinação de estratégias, como o uso de células vivas e compostos voláteis, pode maximizar a eficácia de controle. Segundo Calvo et al. (2020) além da ação direta desses metabolitos voláteis com a ação antifúngica os VOCs atuam indiretamente ao induzir a resistência sistêmica nas plantas, ocasionando dupla proteção.

C. eriobotryae, agente causal da antracnose em nespereiras (*Eriobotrya japonica*), representa uma ameaça significativa à produção e qualidade dos frutos, especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Damm et al., 2020). Essa doença é caracterizada pela formação de manchas necrosadas em folhas, caules e frutos, resultando em queda prematura das estruturas afetadas. Condições de alta umidade e temperaturas amenas favorecem seu desenvolvimento, desafiando os produtores (Takata et al., 2024). Tradicionalmente, o controle da antracnose tem se apoiado no uso de antifúngicos químicos, o que levanta preocupações relacionadas à resistência do patógeno e aos impactos ambientais (Damm et al., 2020). Nesse contexto, este estudo apresenta o primeiro relato do uso de *B. velezensis* no controle de *C. eriobotryae*, com resultados expressivos e inéditos.

Os bioensaios realizados demonstraram que *B. velezensis* JBC141 foi o agente de biocontrole eficiente provocando inibição superior a 80% do crescimento micelial de *C. eriobotryae* em todas as condições testadas, incluindo cultivos completos, filtrados livres de células, tratamentos térmicos (80°C e 100°C) e compostos voláteis. Este é um resultado de destaque, indicando a robustez e consistência do isolado na supressão desse patógeno.

Este estudo estabelece um marco no biocontrole de *C. eriobotryae*, evidenciando o potencial de *B. velezensis* como uma alternativa eficiente e ambientalmente responsável ao uso de antifúngicos químicos. A descoberta não apenas destaca a eficácia do isolado *B. velezensis* JBC141, mas também abre novas perspectivas para o controle integrado de doenças em culturas agrícolas, consolidando o papel das bactérias benéficas no enfrentamento de desafios fitopatológicos.

3.9. Efeitos de *B. velezensis* sobre *C. eriobotryae* por MEV

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para avaliar os efeitos morfológicos de *Bacillus velezensis* sobre *C. eriobotryae* após exposição a diferentes tratamentos: cultivo completo (bactéria viva), sobrenadante livre de células, compostos voláteis (VOCs) e controle. A análise permitiu observar alterações estruturais distintas nas hifas fúngicas entre os tratamentos, refletindo os diferentes mecanismos de ação do microrganismo (Figura 16).

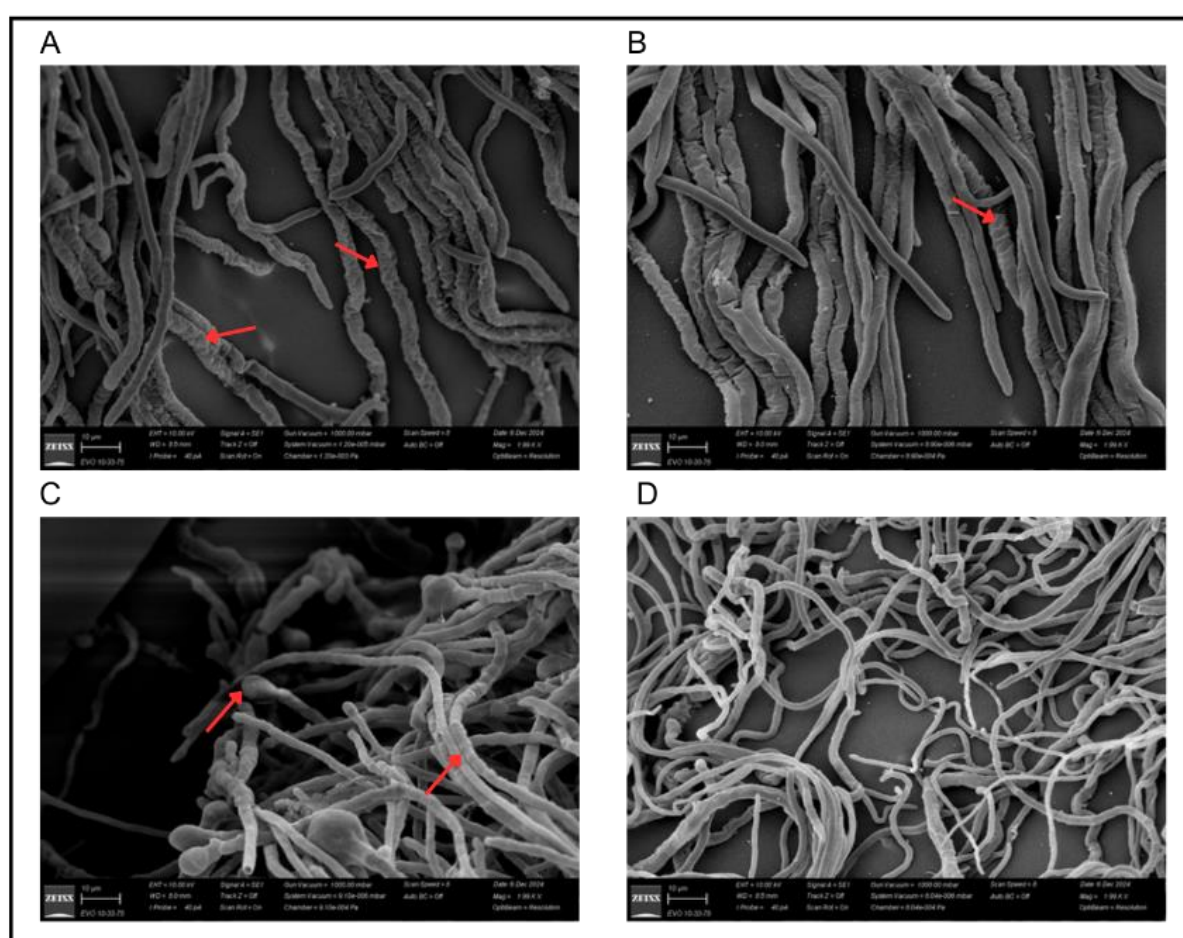


Figura 16. Efeitos morfológicos nos micélios de *C. eriobotryae* expostos a diferentes frações de *Bacillus velezensis*, visualizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) Tratamento com a cultura bacteriana contendo células vivas. (B) Tratamento com o sobrenadante livre de células. (C) Tratamento com compostos voláteis (VOCs). (D) Controle (sem exposição bacteriana).

Na presença da bactéria viva (Figura 16A), as hifas apresentaram colapso estrutural evidente, com ruptura das paredes celulares, enrugamento pronunciado e lise em diversos pontos. Tais alterações indicam um processo de degradação intensa da estrutura fúngica, resultado da ação sinérgica entre compostos de contato, como lipopeptídeos (iturina, fengicina, surfactina), e enzimas hidrolíticas produzidas por *B. velezensis*, como quitinases, proteases e glucanases (Kim, T. Y. et al., 2022).

No tratamento com sobrenadante livre de células (Figura 16B), as hifas ainda apresentavam sinais de dano, com irregularidades na superfície e colapso parcial. Isso demonstra a presença de metabólitos solúveis termoestáveis com atividade antifúngica, como surfactinas e ácidos graxos, capazes de manter atividade mesmo após separação das células bacterianas (K. Wang et al., 2022; Wu et al., 2019)

Na exposição aos compostos voláteis (Figura 16C), observou-se uma modificação distinta: estruturas densas e globosas se formaram nas pontas das hifas, possivelmente resultado de uma resposta ao estresse químico induzido pelos VOCs (Elsherbiny et al., 2020). Compostos como acetoin, 2,3-butanodiol e álcoois aromáticos, frequentemente produzidos por *Bacillus* spp., são conhecidos por interferir no crescimento e diferenciação de fitopatógenos (Krishnan et al., 2019; D. Wang et al., 2022)

A imagem controle (Figura 16D) apresenta hifas com morfologia íntegra, contínua e sem sinais de dano, confirmando que as alterações observadas nos demais tratamentos foram induzidas pelos compostos bioativos de *B. velezensis*.

Esses resultados demonstram a capacidade de *B. velezensis* em atuar por múltiplos mecanismos contato direto, ação de metabólitos solúveis e emissão de compostos voláteis reforçando seu potencial como agente de biocontrole. A caracterização morfológica por MEV contribui significativamente para a compreensão da interação bactéria-fungo e oferece subsídios importantes para o desenvolvimento de bioinsumos eficazes contra fitopatógenos.

4. CONCLUSÕES

Os isolados endofíticos de PANCs demonstraram-se eficiente, onde dos 112 isolados, 45,5% apresentaram atividade antifúngica, nenhum dos isolados apresentaram atividade inseticida. O gênero *Bacillus*, especialmente *B. velezensis* JBC141, apresentou atividades enzimáticas hidrolíticas relevantes para a degradação das estruturas fúngicas, como proteases e amilases.

C. eriobotryae relatado pela primeira vez por ser controlado por uma cepa de *b. velezensis*. Sendo inibido por *B. velezensis* JBC141 com e sem a presença de células, nas variadas condições de tratamento, térmico, degradação de proteínas e VOCs. Os resultados destacam a robustez do *B. velezensis* JBC141, cuja eficácia persiste mesmo em filtrados e após tratamentos térmicos, e consolidam o uso de PANCs como fontes promissoras de microrganismos para estratégias agrícolas sustentáveis no manejo integrado de doenças fúngicas.

5. REFERENCIAS

- AKINTAYO, S. O. *et al.* Characterization of antifungal properties of lipopeptide-producing *Bacillus velezensis* strains and their proteome-based response to the phytopathogens, *Diaporthe* spp. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023.
- AKTAYEVA, S.; KHASSENNOV, B. High keratinase and other types of hydrolase activity of the new strain of *Bacillus paralicheniformis*. **PLOS ONE**, v. 19, n. 10, p. e0312679, 1 oct. 2024.
- AMEER PASHA, B.; MUTHURAJU, R.; SIVAKUMAR, G. Enzymase Activity of Gut Microbes Isolated from the Rugose Spiraling Whitefly *Aleurodicus rugioperculatus*. **International Journal of Environment and Climate Change**, v. 13, n. 11, p. 2337–2341, 6 nov. 2023.
- ANDRIĆ, S.; MEYER, T.; ONGENA, M. **Bacillus Responses to Plant-Associated Fungal and Bacterial Communities** *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., 23 jun. 2020.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. *Em: Microbial diversity and biotechnology in food security*. [s.l.] Springer, 2014. p. 17–22.
- BEDDING, R. A.; AKHURST, R. J. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. **Nematologica**, v. 21, n. 1, p. 109–110, 1 jan. 1975.
- BEEMELMANN, C. *et al.* Natural products from microbes associated with insects. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 12, n. 1, p. 314–327, 2016.
- BELL D.K., WELL H.D., M. C. R. **Phyto72n04_379.pdf**, 1982.
- BIDIMA, M. G. S. *et al.* Antifungal activity of bioactive compounds produced by the endophyte *Bacillus velezensis* NC318 against the soil borne pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Journal of Plant Protection Research**, v. 62, n. No 4, p. 326–333, 2022.
- BIEDENDIECK, R. *et al.* The “beauty in the beast”—the multiple uses of *Priestia megaterium* in biotechnology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 14, p. 5719–5737, 2021.
- BODIL, K. *et al.* Quantitative High-Throughput Screening Methods Designed for Identification of Bacterial Biocontrol Strains with Antifungal Properties. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01433-21, 7 mar. 2022.
- BOKHARI, A. *et al.* Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18154, 2019.

BOLÍVAR-ANILLO, H. J.; GARRIDO, C.; COLLADO, I. G. Endophytic microorganisms for biocontrol of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 3, p. 721–740, 2020.

CALVO, H. *et al.* Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 166, p. 111208, 2020.

CHATTOPADHYAY, P.; BANERJEE, G.; MUKHERJEE, S. Recent trends of modern bacterial insecticides for pest control practice in integrated crop management system. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

COERTJENS, N. C.; MASCARENHAS, M. DO S.; BATISTOTE, M. Brazilian endophytic fungi: biotechnological potential in evidence. **Diversitas Journal**, v. 9, n. 3, 20 jul. 2024.

DAMM, U.; SUN, Y.-C.; HUANG, C.-J. *Colletotrichum eriobotryae* sp. nov. and *C. nymphaeae*, the anthracnose pathogens of loquat fruit in central Taiwan, and their sensitivity to azoxystrobin. **Mycological Progress**, v. 19, n. 4, p. 367–380, 2020.

DUNLAP, C. A. Taxonomy of registered *Bacillus* spp. strains used as plant pathogen antagonists. **Biological Control**, v. 134, p. 82–86, 2019.

ELSHERBINY, E. A. *et al.* Trichoderma Volatile Organic Compounds as a Biofumigation Tool against Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in Postharvest Potato Tubers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 31, p. 8163–8171, 5 ago. 2020.

GONG, A. D. *et al.* Antagonistic mechanism of iturin a and plipastatin a from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 17 fev. 2015.

GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium. **Journal of Economic Entomology**, v. 69, n. 4, p. 487–488, 1 ago. 1976.

HARDOIM, P. R. *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.

HONG-XING, X. U. *et al.* Sustainable management of rice insect pests by non-chemical-insecticide technologies in China. **Rice Science**, v. 24, n. 2, p. 61–72, 2017.

IMHOFF, J. F.; LABES, A.; WIESE, J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 468–482, 2011.

IOANNIS VAGELAS, S. G. Control of *Fusarium oxysporum* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with *Pseudomonas oryzae* habitans. **Pakistan Journal of Phytopathology**, 2012.

KIM, J. A. *et al.* *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a Promising Agent for Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, 1 out. 2022.

KIM, T. Y. *et al.* Antifungal Potential of *Bacillus velezensis* CE 100 for the Control of Different Colletotrichum Species through Isolation of Active Dipeptide, Cyclo-(D-phenylalanyl-D-prolyl). **International Journal of Molecular Sciences** 2022, Vol. 23, Page 7786, v. 23, n. 14, p. 7786, 14 jul. 2022.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. J. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. [s.l: s.n.].

KRISHNAN, N.; VELRAMAR, B.; VELU, R. K. Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 155, p. 101–107, 1 mar. 2019.

LENAERTS, M. *et al.* *Rosenbergiella australoborealis* sp. nov., *Rosenbergiella collisarenosi* sp. nov. and *Rosenbergiella epipactidis* sp. nov., three novel bacterial species isolated from floral nectar. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 402–411, 2014.

MAYER, J. *et al.* Construction and Application of a Plasmid-Based Signal Peptide Library for Improved Secretion of Recombinant Proteins with *Priestia megaterium*. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2022.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 473050, 1 jan. 2015.

MYO, E. M. *et al.* Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. **Biological Control**, v. 134, p. 23–31, 2019.

ORTIZ, T. A.; SOUZA, S. G. H. DE; PONCE, F. S. *Bacillus* spp. é um gênero de bactérias para muitas tecnologias. 15 fev. 2024.

P, S. S. *et al.* Pantailocins: phage-derived bacteriocins from *Pantoea ananatis* and *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 89, n. 12, p. e00929-23, 20 nov. 2023.

RAYMAEKERS, K. *et al.* Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management – A review. **Biological Control**, v. 144, p. 104240, 2020.

RUIU, L. Insect pathogenic bacteria in integrated pest management. **Insects**, v. 6, n. 2, p. 352–367, 2015.

SYED AB RAHMAN, S. F. *et al.* Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. **Plant Science**, v. 267, p. 102–111, 2018.

TAKATA, Y. *et al.* Pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from rotten fruit and asymptomatic flowers of loquat in Nagasaki Prefecture, Japan and characterization of *C. nagasakiense* Takata & Kyoko Watan. sp. nov. **Journal of General Plant Pathology**, v. 90, n. 2, p. 69–81, 2024.

TSOTETSI, T. *et al.* **Bacillus for Plant Growth Promotion and Stress Resilience: What Have We Learned?** *Plants* MDPI, , 1 out. 2022.

VALBUENA-RODRÍGUEZ, J. L. *et al.* Isolation and characterization of *Pantoea ananatis* and *P. agglomerans* in quinoa: *P. ananatis* as a potential fungal biocontroller and plant growth promoter. **International Microbiology**, 2024.

WANG, D. *et al.* Identification of non-volatile and volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* LZ88 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. **Biological Control**, v. 169, p. 104901, 1 jun. 2022.

WANG, K.; WANG, Z.; XU, W. Induced oxidative equilibrium damage and reduced toxin synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by secondary metabolites from *Bacillus velezensis* WB. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 98, n. 8, p. 1–13, 21 jul. 2022.

WASH, P. *et al.* Prevalence of Antimicrobial Resistance and Respective Genes among *Bacillus* spp., a Versatile Bio-Fungicide. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 22, 1 nov. 2022.

WU, S. *et al.* Characterization of Antifungal Lipopeptide Biosurfactants Produced by Marine Bacterium *Bacillus* sp. CS30. **Marine Drugs** 2019, Vol. 17, Page 199, v. 17, n. 4, p. 199, 29 mar. 2019.

CAPÍTULO – 4 - Dinâmica da Produção de Metabólitos Antifúngicos por *Bacillus velezensis* ao Longo da Curva de Crescimento

RESUMO - Microrganismos do gênero *Bacillus*, especialmente *B. velezensis*, são reconhecidos por sua capacidade de produzir metabólitos secundários com ação antifúngica, representando uma alternativa promissora aos fungicidas sintéticos. A produção desses compostos pode variar ao longo das fases de crescimento bacteriano, sendo crucial compreender essa dinâmica para seu uso biotecnológico. Neste capítulo, investigou-se a produção de metabólitos com potencial antifúngico por *Bacillus velezensis* ao longo de diferentes fases da curva de crescimento. Foram selecionadas três amostras de sobrenadante bacteriano, representando os tempos de 4, 16 e 40 horas de cultivo, e comparadas com o meio LB não inoculado. A análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H permitiu identificar compostos como ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido palmítico e possíveis lipopeptídeos, cujos perfis espectrais estavam ausentes no meio controle. Observou-se acúmulo e variação temporal desses compostos, com intensificação especialmente nas fases exponencial e estacionária, sugerindo regulação metabólica ao longo do crescimento. Os resultados reforçam o potencial de *B. velezensis* como fonte de moléculas bioativas para o desenvolvimento de bioinsumos aplicáveis ao controle de fitopatógenos.

Palavras-chave: Ressonância magnética nuclear (RMN); Metabólitos antifúngicos; HPLC

1. INTRODUÇÃO

O interesse por microrganismos com capacidade de produzir compostos bioativos tem crescido significativamente nas últimas décadas, sobretudo no contexto da agricultura sustentável e da substituição de insumos químicos por produtos de base biológica. Dentre esses microrganismos, espécies do gênero *Bacillus*, têm se destacado por sua capacidade de sintetizar metabólitos secundários com potente ação antifúngica, como lipopeptídeos, antibióticos e enzimas hidrolíticas (Ongena and Jacques, 2008; Rabbee et al., 2019). Especificamente, *Bacillus velezensis* tem sido amplamente relatado como produtor de compostos com forte ação antifúngica, sendo utilizado em formulações comerciais de biocontrole devido à sua eficácia e segurança ambiental (Kenfaoui et al., 2024).

Esses compostos desempenham papéis cruciais na competição microbiana e na interação com o hospedeiro vegetal, contribuindo para a promoção de crescimento, indução de resistência sistêmica e supressão de patógenos (Caulier et al., 2019). No entanto, a produção desses metabólitos está diretamente relacionada ao estágio de crescimento bacteriano, sendo regulada por fatores fisiológicos e ambientais (Ahmad et al., 2023). A análise da curva de crescimento, portanto, é essencial para definir os momentos ideais de coleta de extratos bioativos e compreender a dinâmica metabólica do microrganismo.

A caracterização bioquímica e estrutural desses compostos ao longo do crescimento bacteriano permite a identificação de perfis de produção, acúmulo e possível sinergismo entre diferentes classes de metabólitos (Wang et al., 2021). Para tanto, é necessário empregar abordagens complementares de análise, como a quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), caracterização de proteínas por SDS-PAGE, análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e, principalmente, a identificação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (Mouafo et al., 2022; Sit et al., 2015).

A espectroscopia por RMN é uma ferramenta poderosa e não destrutiva para a identificação de compostos orgânicos, fornecendo informações sobre a estrutura molecular com alta precisão. Quando aplicada em extratos fermentativos de

microrganismos, a técnica permite a identificação de sinais compatíveis com classes químicas específicas, como ácidos graxos, compostos aromáticos e peptídeos cíclicos, frequentemente envolvidos na atividade antimicrobiana (Shami et al., 2023). A possibilidade de comparar espectros obtidos em diferentes tempos da curva de crescimento com um controle (meio de cultivo estéril) permite isolar os sinais verdadeiramente atribuíveis à atividade metabólica do microrganismo.

Este capítulo visa integrar essas ferramentas analíticas para investigar a produção de metabólitos bioativos por *B. velezensis* JBC141, isolado de folhas de PANCs, ao longo de diferentes tempos da curva de crescimento (4h, 16h e 40h). O objetivo é identificar os compostos presentes, avaliar suas variações temporais, relacioná-los à atividade antifúngica previamente observada, e destacar o potencial deste isolado como fonte de bioinsumos agrícolas seguros e eficazes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Curva de crescimento

Para o estudo da curva de crescimento bacteriano, preparou-se pré-inóculos a partir do estoque bacteriano em meio LB. Inoculou-se 100 µL do estoque em erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio LB, e o cultivo foi incubado a 30 °C e 150 r.p.m., por 5 horas, a mensuração da absorbância a 600 nm (D.O. 600), dos pré-inóculos variou entre $0,072 \pm 0,005$.

Em seguida, cada pré-inóculo foi usado para inocular erlenmeyers de 125 mL, contendo 55 mL de meio LB, na proporção de 1 mL de pré-inóculo por frasco a D.O 600 nm no momento da inoculação variou entre $0,005 \pm 0,002$. Cada erlenmeyer representou uma amostra, e foram analisados em intervalos de uma hora, permitindo a mensuração da D.O 600 nm, contagem de Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro (U.F.C./mL) e leitura de pH.

O experimento foi conduzido em ciclos de aproximadamente 24 horas, com novos pré-inóculos preparados a cada ciclo para garantir consistência e homogeneidade no

crescimento bacteriano. As coletas abrangeram o intervalo de 0 a 40 horas, possibilitando a caracterização detalhada das diferentes fases do crescimento bacteriano.

2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para identificação morfológica, amostras da colônia de JBC 141 foram analisadas por MEV. O isolado JBC 141 foi cultivado em meio LB sólido, por 20 horas. Após o cultivo as amostras foram coletadas e fixadas em glutaraldeído 2,5% (Solarbio, Co. Ltd.) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 18 h e pós-fixadas a 4 °C por 6 h com o mesmo tampão em tetróxido de ósmio 1%, seguida de desidratação em gradiente de etanol (vol/vol) de 30 a 100%. As amostras foram secas em um secador de ponto crítico e, em seguida, metalizadas em ouro e visualizadas em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss, Evo MA 10, a 10 kV.

2.3. Eletroforese em SDS-PAGE corado com nitrato de prata

Dez amostras foram selecionadas da “curva de crescimento” (4, 7, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35 e 40 horas) e foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) (LAEMMLI, 1970) com o propósito de verificar a presença de bandas proteicas. Foi utilizado o gel de empacotamento na concentração de 5% e o de separação a 12% de poliacrilamida, cada poço do gel recebeu uma mistura composta por 55 µL de amostra e 15 µL de tampão de amostra. Após o período a migração, a revelação das proteínas presentes no gel foi realizada com nitrato de prata, conforme procedimento descrito por Blum, Beier & Gross (1987).

2.4. HPLC - High-performance liquid chromatography

Para as análises de cromatografia, todas as amostras representadas por dez tempos de cultivo, baseados na curva de crescimento (4, 7, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35 e 40 horas) foram submetidas a um processo de diluição em água miliQ 1:10 e, em seguida, filtradas utilizando filtros de PTFE com membrana de 0,22 μm . Posteriormente, as amostras foram encaminhadas para a etapa de análise em HPLC, com o método cromatográfico que consistiu em eluição da fase móvel no modo gradiente, empregando como fases móveis: fase A (H_2O com 5% (volume:volume) de ácido acético) e fase B (metanol). Nesta etapa foi empregada uma coluna de fase estacionária de octadecilsilano (C18), marca Shimadzu modelo LC40D. A eluição da fase móvel se deu seguindo as seguintes proporções: 40% de B de 0 a 2 min; de 40 a 90% de B de 2 a 9 min; 90% de B de 9 a 12 min; 40% de B de 12 a 13 min; mantido 40% de B até 60 min (final da corrida). O volume de injeção foi de 10 μL com o fluxo de 0,8 mL min^{-1} e com detecção por espectrofotometria de UV-Vis (detector de arranjo de diodos) monitorando o comprimento de onda a 280 nm na quantificação dos compostos (SANTOS, et al., 2021).

2.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) foram adquiridos e processados a fim de elucidar os metabolitos secundários presente na amostra. Com base nos resultados do eletroforese em SDS-PAGE e HPLC foram selecionados três tempos de cultivo mais o meio LB. 50 mL dos cultivos no tempo 4h, 16h e 40h foram centrifugado a 10.000 xg por 10 minutos a 4°C, para a remoção de sólidos e resíduos em suspensão. Em seguida, o sobrenadante foi congelado em nitrogênio líquido, para preservar suas características estruturais. Após o congelamento, a amostra foi liofilizada por 24 horas a uma temperatura de -50°C,

utilizando o liofilizador modelo L101, da marca Liobras, e posteriormente foi dissolvida em solução de água deuterada (D_2O). Esta amostra foi então analisada em um espectrômetro de RMN da marca Bruker operando a 400 MHz. Os dados foram coletados utilizando um pulso de 90 graus e um tempo de aquisição de 5.45 segundos, e posteriormente processados aplicando um filtro de Lorentziano para correção da linha de base. A metodologia empregada permitiu a obtenção de espectros de alta qualidade. Para análise dos resultados e construção dos espectros foram utilizados os softwares TopSpin e SpinWorks 4.

3. RESULTADOS

3.1. Curva de crescimento

A figura 1 ilustra o comportamento de crescimento do isolado *B. velezensis* JBC141 ao longo de 40 horas de incubação, evidenciando as três fases distintas de crescimento: latência, exponencial e estacionária, com destaque para a dinâmica de CFU/mL, densidade óptica (D.O 600), e variação de pH. Nas primeiras 4 horas, o isolado permaneceu em fase de latência, período necessário para adaptação ao meio de cultura. Durante este intervalo, até 5 horas o pH apresentou uma redução gradual, refletindo a produção de metabólitos ácidos, nessa fase adaptativa.

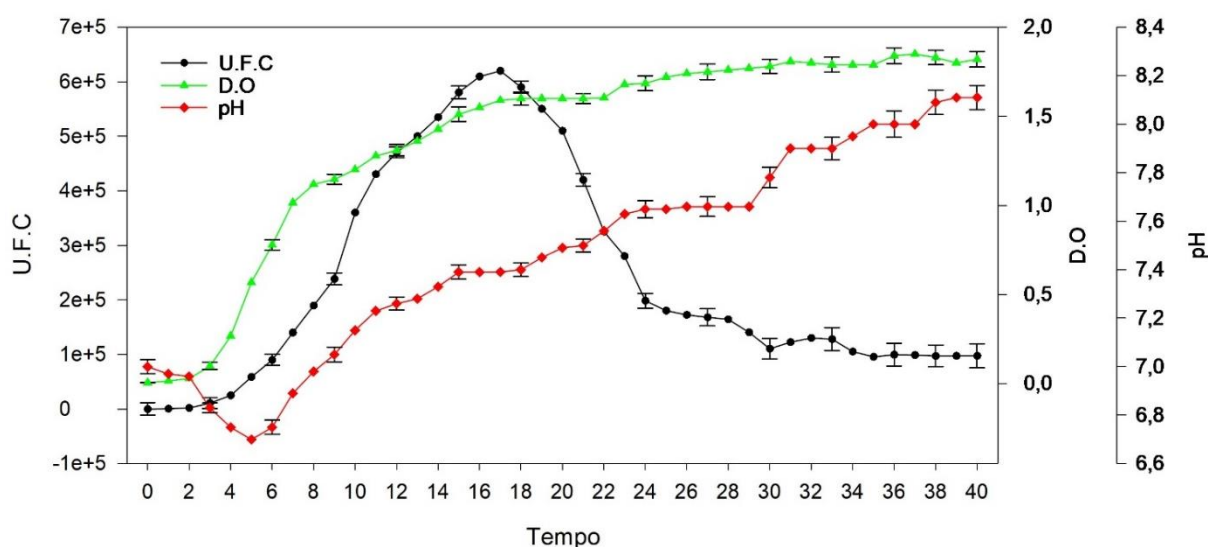


Figura 1. Curva de crescimento do isolado *Bacillus velezensis* JBC141 ao longo de 40 horas de incubação, mostrando a evolução das Unidades Formadoras de Colônia (CFU/mL), densidade óptica (DO 600), e pH do meio de cultivo.

Entre 5 e 13 horas, *B. velezensis* JBC141 entrou na fase logarítmica (exponencial), caracterizada por um rápido aumento de CFU/mL e D.O 600, com a densidade populacional atingindo máxima concentração de $6,2 \times 10^8$ CFU/mL às 17 horas e D.O 600 alcançando o pico de 1,80 às 25 horas. Durante essa fase, o pH começou a subir levemente, sugerindo a degradação de metabólitos ácidos e/ou o acúmulo de compostos alcalinos resultantes do metabolismo bacteriano. A fase de declínio da UFC/mL começou depois das 21 horas, com a concentração de células atingindo um equilíbrio dinâmico entre 28 e 40 horas, indicando uma estabilização entre divisão celular e morte, mantendo uma média de $1,5 \times 10^8$ CFU/mL e O.D. 600 de 1,8 estabilizada desde as 25 horas. Paralelamente, o pH continuou a aumentar, atingindo valores próximos a 8,2, indicando um ambiente progressivamente mais alcalino. Mesmo após 40 horas de incubação, *B. velezensis* JBC141 manteve uma densidade celular significativa, com concentração média de $9,89 \times 10^7$ CFU/mL. Este resultado demonstra a notável capacidade de sobrevivência e estabilidade de *B. velezensis* JBC141, evidenciando seu potencial para aplicações biotecnológicas em condições adversas ou prolongadas.

Conhecer a caracterização da curva de crescimento de isolados bacterianos possui significativa importância biotecnológica, pois permite compreender o comportamento microbiano em diferentes fases de desenvolvimento, otimizando processos industriais e aplicações em biotecnologia (Schuler and Marison, 2012). Segundo Chaturvedi e colaboradores (2021) essa caracterização auxilia na determinação do tempo de geração, fases de crescimento (latência, exponencial, estacionária e declínio) e na identificação de condições ideais para a produção de metabólitos de interesse, ou inibir os metabólitos indesejados produzidos em determinada fase. Portanto, a análise da curva de crescimento é uma ferramenta essencial para a maximização da eficiência e produtividade em diversas aplicações biotecnológicas.

3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização morfológica do isolado JBC 141, previamente identificado como *Bacillus velezensis*, foi realizada por meio de MEV, revelando estruturas celulares típicas do gênero *Bacillus*. Na imagem de menor aumento (à esquerda), observa-se uma densa colonização bacteriana recobrindo a superfície do meio de cultura, demonstrando a capacidade de crescimento vigoroso e adesão do isolado. A imagem ampliada (à direita) evidencia a presença de células bacilares com extremidades arredondadas e distribuição homogênea, com comprimentos médios compatíveis com os padrões morfológicos descritos para *B. velezensis*.

A estrutura bacilar bem definida, evidenciada na ampliação (seta vermelha), corrobora a identidade taxonômica atribuída ao isolado e demonstra sua morfologia típica de bacilos Gram-positivos (Baltaci et al., 2020). A presença de agregados e matriz extracelular visível nas imagens pode estar relacionada à produção de substâncias exopolissacarídicas (EPS), frequentemente associadas à formação de biofilmes, colonização vegetal e mecanismos de proteção ambiental (Ruhail and Kataria, 2021)

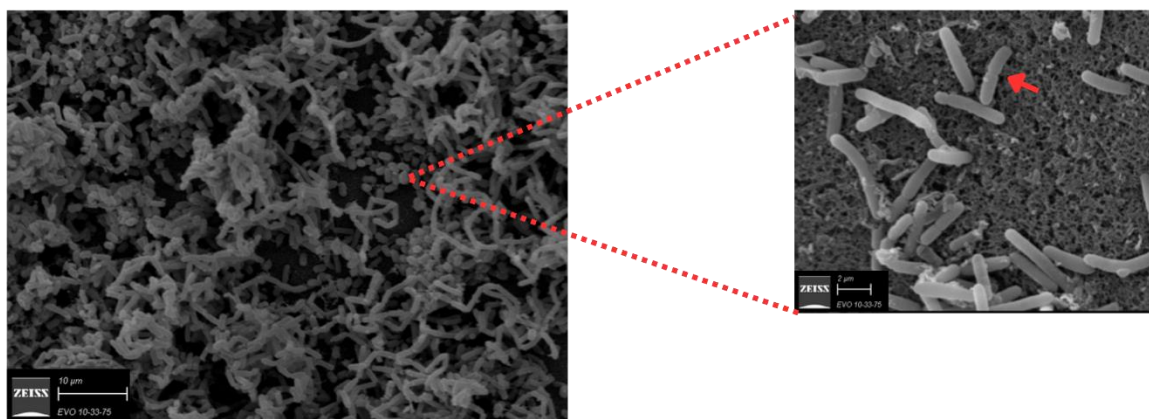


Figura 2. Visualização morfológica do isolado *Bacillus velezensis* JBC 141 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3.3. Eletroforese em SDS-PAGE corado com nitrato de prata

A análise por SDS-PAGE corado com nitrato de prata revelou alterações qualitativas e quantitativas no perfil proteico do sobrenadante ao longo do tempo de cultivo de *Bacillus velezensis* JBC 141. Foram avaliadas amostras correspondentes aos tempos 4, 7, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35 e 40 horas da curva de crescimento, permitindo a visualização da dinâmica de expressão de proteínas secretadas ao longo do ciclo bacteriano (Figura 3).

A partir de 10 horas de cultivo, observa-se o aparecimento de bandas distintas no gel, com maior complexidade e intensidade a partir de 16 horas tempo que se destaca por apresentar o maior número de bandas nítidas e bem definidas. Esse resultado sugere uma fase ativa de produção proteica associada ao início da fase estacionária, período em que geralmente ocorre maior secreção de metabólitos secundários e proteínas extracelulares de interesse biotecnológico, como compostos antimicrobianos, enzimas e peptídeos sinalizadores (Wang et al., 2021; Zhao et al., 2022).

Além disso, nota-se que a partir das 25h as bandas tornam-se mais intensas e espessas, indicando o acúmulo de determinadas proteínas ao longo do tempo, o que pode estar associado à produção tardia de compostos de defesa ou enzimas com função ecológica (Caseys, 2019; Jain et al., 2022). Esse padrão progressivo reforça a importância da seleção do tempo de cultivo ideal para aplicações industriais e para futuros testes de atividade biológica, como antifúngica ou de indução de resistência em plantas (dos Santos e Franco, 2023).

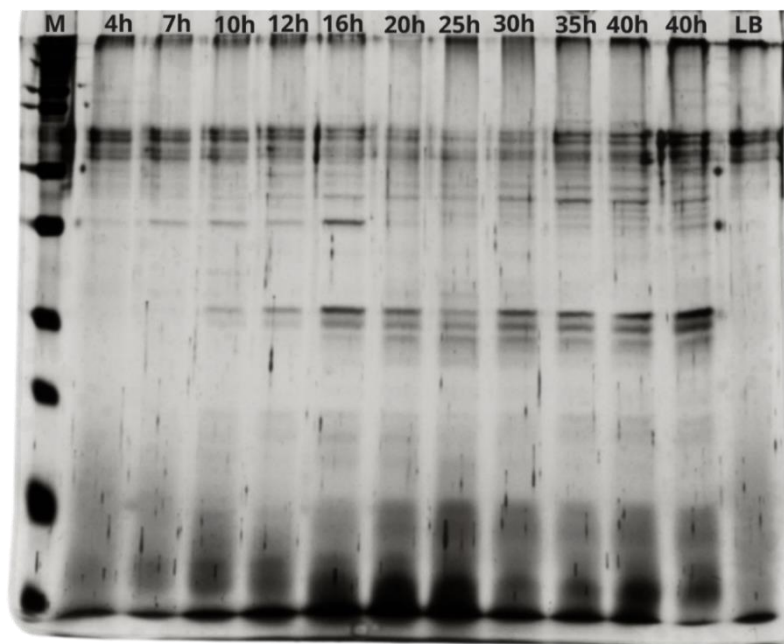


Figura 3. Perfil proteico do sobrenadante de *Bacillus velezensis* JBC 141 ao longo da curva de crescimento, obtido por SDS-PAGE a 12% e revelado com nitrato de prata. As amostras correspondem primeiro o marcador (M); seguido de dez tempos do decorrer da curva de crescimento (Tempos 4, 7, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35 e 40 horas) sendo o 40 horas em duplicata, cultivados em meio LB; além do controle de meio estéril (LB).

A ausência de bandas em amostras de meio LB puro (controle negativo) confirma que os perfis obtidos são derivados exclusivamente da atividade metabólica de *B. velezensis* JBC 141. Assim, o tempo de 16h se configura como ponto estratégico para prosseguir com análises como fracionamento, purificação e caracterização funcional dos compostos de interesse.

3.4. HPLC - High-performance liquid chromatography

A produção de compostos bioativos por *Bacillus velezensis* JBC 141 ao longo da curva de crescimento foi monitorada por HPLC com detecção a 280 nm. Foram analisadas amostras coletadas nos tempos de 4, 7, 10, 12, 16, 20, 25, 30, 35 e 40 horas de cultivo. A Figura 4 apresenta o cromatograma completo com tempo de retenção de 0 a 60 minutos, enquanto a Figura 5 mostra a ampliação da janela de 0 a 3,1 minutos, destacando com maior nitidez os picos de interesse iniciais.

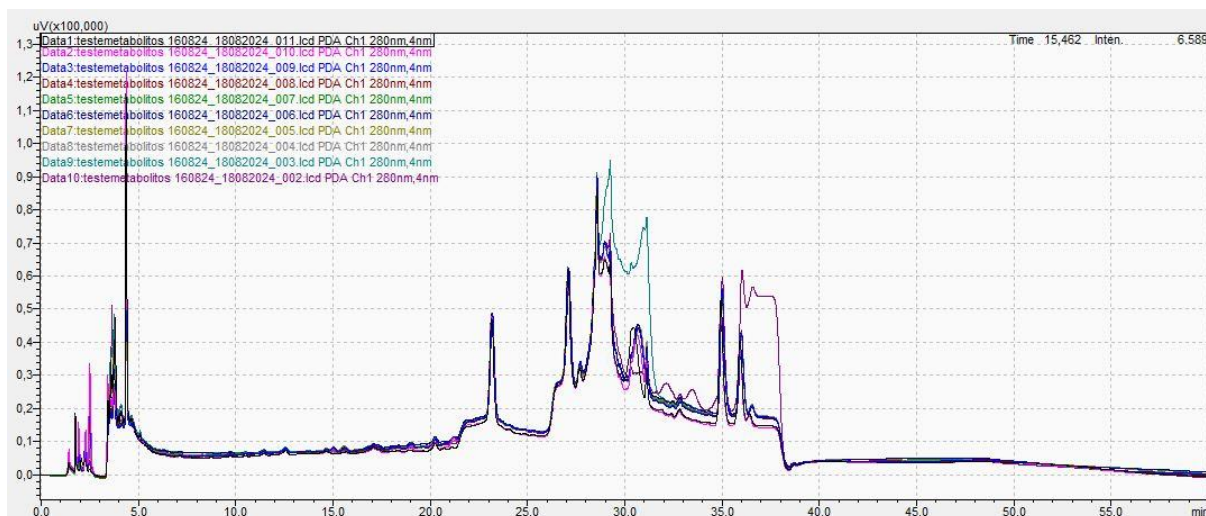


Figura 4. Perfil cromatográfico completo (0–60 min) das amostras do sobrenadante de *Bacillus velezensis* JBC 141.

A análise detalhada do intervalo inicial (0–3,1 min) revelou um padrão de acúmulo progressivo de metabólitos ao longo dos tempos de cultivo, com picos bem definidos a partir de 12 horas e máxima intensidade observada aos 16 horas. Esse tempo coincide com o perfil mais complexo de expressão proteica revelado por SDS-PAGE, sugerindo que esse intervalo representa um ponto-chave na síntese ativa de compostos bioativos. A persistência de picos até 40h também indica estabilidade e continuidade na produção metabólica.

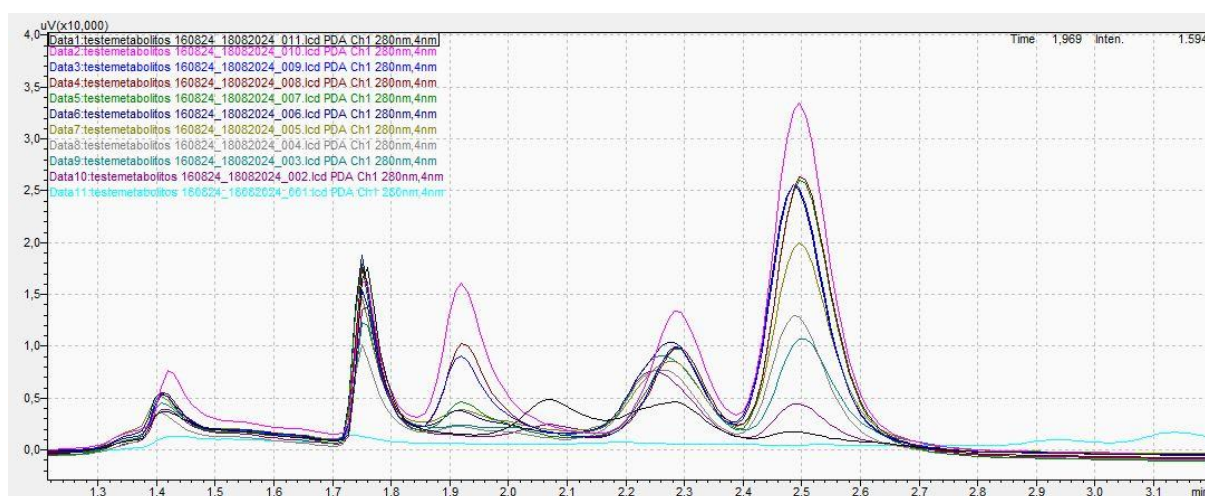


Figura 5. Ampliação do perfil cromatográfico entre 0 e 3,1 minutos das amostras de *Bacillus velezensis* JBC 141.

O cromatograma completo (0–60 min) mostrou que os metabólitos estão distribuídos em diferentes faixas de retenção, com destaque para um conjunto expressivo de picos entre 28 e 35 minutos, sugerindo a presença de compostos de maior massa molecular ou menor polaridade, compatíveis com lipopeptídeos, antibióticos ou voláteis com potencial bioativo (Rabbee et al., 2019; Wu et al., 2021). Esses picos estiveram mais pronunciados nos tempos entre 16 e 30 horas, reforçando esse intervalo como estratégico para a bioprospecção.

O cromatograma do controle (meio LB estéril) não apresentou picos relevantes, validando que os compostos detectados são produzidos exclusivamente por *B. velezensis* JBC 141. A análise integrada dos cromatogramas e dados de expressão proteica evidencia o potencial biossintético do isolado e orienta os próximos passos em fracionamento e identificação de metabólitos com atividade antifúngica.

3.5. Identificação de Compostos Bioativos Produzidos por *Bacillus velezensis* por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Com o objetivo de elucidar os compostos potencialmente responsáveis pela atividade antifúngica observada nos sobrenadantes de *Bacillus velezensis*, foi conduzida uma análise espectroscópica por RMN de ^1H . As amostras analisadas representam três diferentes momentos da curva de crescimento bacteriano (4h, 16h e 40h), que correspondem às fases log, estacionária e final do declínio, respectivamente. Como controle, foi utilizado o meio LB submetido ao mesmo tratamento experimental.

Os dados espectrais brutos foram processados para identificar os picos presentes em cada tempo e quantificar suas áreas, permitindo inferir a concentração relativa dos compostos presentes. A conversão das frequências em Hz para deslocamentos químicos em ppm foi realizada considerando um espectrômetro de 400 MHz.

Com base nos deslocamentos químicos e na comparação com bancos de dados de compostos orgânicos (como o SDBS), foram identificados compostos com potencial atividade antifúngica, entre eles ácido salicílico, ácido ferúlico, ácido palmítico e ácido oleico.

Tabela 1. Frequências e deslocamentos químicos (ppm) observados nos espectros de RMN das amostras de *Bacillus velezensis*, com a identificação das regiões químicas associadas, possíveis compostos compatíveis e suas respectivas classes químicas.

Frequência (Hz)	ppm	Região química aproximada	Compostos compatíveis	Possível química	Classe	referencias
2800	7,0	Aromáticos	Ácido salicílico, ácido ferúlico, lipopeptídeos aromáticos	Fenóis aromáticos substituídos	e	(Lubbers et al., 2019)
1920	4,8	Hidrogênios α a grupos amina ou hidroxila	Surfactina, peptídeos com grupos NH/CH-OH	Peptídeos, lipopeptídeos		(Ongena et al., 2007)
1200	3,0	Grupos metoxila ou esqueleto peptídico	Ácido ferúlico (OCH ₃), lipopeptídeos (resíduos de aminoácidos)	Metoxilaromáticos, peptídeos		(Zhang et al., 2021)
800	2,0	Cadeia graxa (CH ₂ alifático)	Ácido palmítico, ácido oleico, parte graxa de lipopeptídeos	Ácidos graxos, lipopeptídeos		Parfene et al., 2013)

Esses picos apresentaram intensificação progressiva ao longo dos tempos de cultivo, sendo mais expressivos na amostra de 16h indicando provável pico de biossíntese de metabólitos bioativos e mantendo-se presentes na fase estacionária (40h), sugerindo acúmulo de compostos. O controle negativo (meio LB) não apresentou picos significativos nessas regiões, corroborando que os compostos observados são oriundos da atividade metabólica de *B. velezensis* e não componentes do meio.

Destaque-se que os espectros apontam forte correlação com estruturas de surfactina, iturina e fengicina, lipopeptídeos conhecidos por sua potente ação antifúngica contra patógenos vegetais e por sua versatilidade funcional como

biossurfactantes (González-Jaramillo et al., 2017; Mnif et al., 2016). A ausência de atividade inseticida nos bioensaios reforça a especificidade dessas substâncias, o que representa um diferencial positivo para a aplicação desses compostos como agentes de biocontrole seletivos, que preservam os insetos benéficos.

A caracterização por RMN, portanto, fornece suporte estrutural às observações biológicas anteriores e contribui para o entendimento da dinâmica temporal da produção de metabólitos antifúngicos em *B. velezensis*. Esses dados reforçam o potencial desse microrganismo como fonte promissora para desenvolvimento de bioinsumos sustentáveis com alta especificidade e eficácia.

4. CONCLUSÕES

A caracterização funcional e metabólica do isolado *Bacillus velezensis* JBC 141 revelou seu potencial como produtor de compostos com atividade antifúngica. A curva de crescimento indicou que o pico celular ocorreu na fase estacionária entre 16 e 20 horas de cultivo, fase em que foi observada maior produção de metabólitos. A análise morfológica por MEV confirmou sua estrutura típica bacilar, enquanto os perfis cromatográficos e espectrais por HPLC e RMN identificaram compostos bioativos relevantes, como ácidos graxos, aromáticos e lipopeptídeos. Esses achados reforçam o valor do isolado JBC 141 como candidato para aplicação em bioinoculantes agrícolas.

5. REFERENCIAS

- AHMAD, T. *et al.* Biocontrol potential of lipopeptides produced by the novel *Bacillus subtilis* strain Y17B against postharvest *Alternaria* fruit rot of cherry. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1150217, 15 mar. 2023.
- BALTACI, M. O. *et al.* *Bacillus pasinlerensis* sp. Nov., a thermophilic bacterium isolated from a hot spring in Turkey. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 6, p. 3865–3871, 4 jun. 2020.
- CASEYS, C. A Plant Metabolon Efficiently Mass-Produces Phytochemical Defenses. *The Plant Cell*, v. 31, n. 11, p. 2554–2555, 14 nov. 2019.
- CAULIER, S. *et al.* Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. FEB, p. 435128, 26 fev. 2019.
- CHATURVEDI, A. *et al.* A Computational Approach to Incorporate Metabolite Inhibition in the Growth Kinetics of Indigenous Bacterial Strain *Bacillus subtilis* MN372379 in the Treatment of Wastewater Containing Congo Red Dye. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 193, n. 7, p. 2128–2144, 2021.
- GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M. *et al.* Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 156, p. 114–122, 1 ago. 2017.
- JAIN, M. *et al.* Insights into biological role of plant defense proteins: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 40, p. 102293, 1 mar. 2022.
- KENFAOUI, J. *et al.* *Bacillus velezensis*: a versatile ally in the battle against phytopathogens—insights and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 108, n. 1, p. 439, 1 dez. 2024.
- LUBBERS, R. J. M. *et al.* A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 7, p. 107396, 15 nov. 2019.
- MNIF, I. *et al.* Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 7, p. 6690–6699, 1 abr. 2016.
- MOUAFO, H. T. *et al.* Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization and food application. *Food Bioscience*, v. 46, p. 101598, 1 abr. 2022.
- ONGENA, M. *et al.* Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, v. 9, n. 4, p. 1084–1090, 1 abr. 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 3, p. 115–125, 1 mar. 2008.

PARFENE, G. *et al.* Production of medium chain saturated fatty acids with enhanced antimicrobial activity from crude coconut fat by solid state cultivation of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry*, v. 136, n. 3–4, p. 1345–1349, 1 fev. 2013.

RABBEE, M. F. *et al.* *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, v. 24, n. 6, p. 1046, 16 mar. 2019.

RUHAL, R.; KATARIA, R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, v. 251, p. 126829, 1 out. 2021.

SANTOS, C. DOS; FRANCO, O. L. Pathogenesis-Related Proteins (PRs) with Enzyme Activity Activating Plant Defense Responses. *Plants* 2023, Vol. 12, Page 2226, v. 12, n. 11, p. 2226, 5 jun. 2023.

SCHULER, M. M.; MARISON, I. W. Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 94, n. 6, p. 1469–1482, 2012.

SHAMI, A. A. *et al.* NMR-Based Metabolomics: A New Paradigm to Unravel Defense-Related Metabolites in Insect-Resistant Cotton Variety through Different Multivariate Data Analysis Approaches. *Molecules*, v. 28, n. 4, p. 1763, 1 fev. 2023.

SIT, C. S. *et al.* Variable genetic architectures produce virtually identical molecules in bacterial symbionts of fungus-growing ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 43, p. 13150–13154, 27 out. 2015.

WANG, W.; KANG, S.; VIKESLAND, P. J. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacterial Metabolites for Bacterial Growth Monitoring and Diagnosis of Viral Infection. *Environmental Science and Technology*, v. 55, n. 13, p. 9119–9128, 6 jul. 2021.

WU, W. *et al.* Influence of tissue and geographic locality on culturable endophytic bacteria of *Atractylodes macrocephala*. *Microbiology (United Kingdom)*, v. 167, n. 11, p. 001109, 26 nov. 2021.

ZHANG, M. *et al.* Site-selective and diastereoselective functionalization of α -amino acid and peptide derivatives via palladium-catalyzed sp^3 C–H activation. *Organic Chemistry Frontiers*, v. 8, n. 1, p. 133–168, 5 jan. 2021.

ZHAO, X. *et al.* Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 922450, 15 jul. 2022.