

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS
VOLÁTEIS E ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR
Bacillus spp. ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
MANCHA PRETA DOS CITROS**

Andréia Fujimoto

Mestre em Microbiologia

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS
VOLÁTEIS E ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR
Bacillus spp. ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
MANCHA PRETA DOS CITROS**

Andréia Fujimoto

Orientadora: Dra. Kátia Cristina Kupper

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

2017

Fujimoto, Andréia
F961i Identificação de compostos orgânicos voláteis e antibióticos produzidos por *Bacillus* spp. envolvidos no controle da mancha preta dos citros / Andréia Fujimoto. -- Jaboticabal, 2017
xvi, 74 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Katia Cristina Kupper

Banca examinadora: Fábio Augusto, Alessandra Sussulini, Antônio de Góes, Jackson Antônio Marcondes de Souza

Bibliografia

1. Controle biológico. 2. *Citrus sinensis*. 3. *Guignardia citricarpa*. 4. Metabolômica. 5. *Phyllosticta citricarpa*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.8:634.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp. ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA MANCHA PRETA DOS CITROS

AUTORA: ANDRÉIA FUJIMOTO

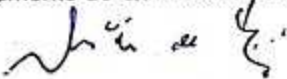
ORIENTADORA: KÁTIA CRISTINA KUPPER

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


Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura Sylvio Moreira / IAC / Cordeirópolis/SP


Prof. Dr. FÁBIO AUGUSTO
Departamento de Química Analítica / IQ/UNICAMP / CAMPINAS/SP


Profa. Dra. ALESSANDRA SUSSULINI
Departamento de Química Analítica / IQ/UNICAMP / CAMPINAS/SP


Prof. Dr. ANTONIO DE GÓES
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 19 de junho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Andréia Fujimoto, nasceu em São Paulo, em 19 de agosto de 1986. Iniciou sua graduação em Ciências Biológicas em Março de 2007 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Campus de Jaboticabal, concluindo seu bacharelado em dezembro de 2010. Durante a graduação, estagiou junto ao Departamento de Tecnologia da mesma instituição, no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, sob a orientação da Professora Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e Professor Dr. Jesus Aparecido Ferro, onde realizou duas iniciações científicas, trabalhando com *Xanthomonas* spp. Em agosto de 2011, entrou no curso de pós-graduação da mesma universidade, pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, sob orientação da Professora Dra. Kátia Cristina Kupper, realizando seu projeto de pesquisa na área de Fitopatologia e Controle Biológico, utilizando bactérias do gênero *Bacillus* no controle da mancha preta dos citros, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”/IAC, na cidade de Cordeirópolis/SP. Em agosto de 2013, ingressou no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária pela mesma instituição, sob orientação da Professora Dra. Kátia Cristina Kupper, dando prosseguimento aos estudos realizados no mestrado.

“Não me entrego sem lutar, tenho ainda coração. Não aprendi a me render, que caia o inimigo então.”

(Renato Russo)

Dedico

À minha mãe Marlene, às minhas irmãs Ana Paula e Angela e ao meu
companheiro de todos os momentos, Pedrinho, pelo amor, carinho, incentivo e
confiança que depositaram em mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À professora **Dra. Katia Cristina Kupper** pela orientação, pelo suporte, respeito e principalmente pela amizade e ótimos anos de convivência.

Aos professores **Dr. Fábio Augusto**, **Dra. Alessandra Sussulini**, **Dr. Antônio de Góes** e **Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza** pela participação na banca.

Aos meus pais, **Marlene** e **Paulo**, pela compreensão, amor, respeito e apoio em todos os momentos.

À toda a minha família, especialmente minhas irmãs **Ana Paula** e **Angela**, meu **tio Zé** e **minha vó** pelo carinho e força.

Ao **Pedrinho** por estar sempre ao meu lado, pela dedicação e amor.

À professora **Dra. Taicia Pacheco Fill** do Departamento de Química da Unicamp pelo convívio, parceria, amizade e ensinamentos de cromatografia.

Ao professor **Dr. Fábio Augusto** do Departamento de Química da Unicamp pela parceria e ensinamentos adquiridos.

À professora **Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima**, do Instituto de Biociências da Unesp-Botucatu e toda sua equipe, pelos ensinamentos sobre as análises enzimáticas.

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico (**Aline**, **Vanessa**, **Lury**, **Flávia**, **Bianca**, **Ariane**, **Mariana**, **Débora** e **Wesley**). Muito obrigada pelo companheirismo, amizade, ajuda e valiosas sugestões.

Aos meus amigos de república (**Ivi**, **Sneck**, **Holly**, **Corts** e **Kalango**) que levarei pra sempre em meu coração.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

Ao **Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agropecuária** da UNESP-Jaboticabal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa de doutorado concedida.

Muito obrigada à todos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Importância da mancha preta dos citros	3
2.2. Sintomatologia e controle da mancha preta dos citros	4
2.3. Controle Biológico	5
2.4. Metabolômica	6
2.4.1. Metabolômica de <i>Bacillus</i> spp	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1. Microrganismos	9
3.2. Identificação de isolados de <i>Bacillus</i> por amplificação da região 16s rRNA	9
3.3. Efeito da composição do meio de cultivo na produção de com- postos voláteis pelos isolados de <i>Bacillus</i> spp.	10
3.4. Efeito dos compostos voláteis produzidos por <i>Bacillus</i> spp. na evolução de lesões do tipo mancha sardenta para mancha dura, em frutos de laranja	11
3.5. Compostos fenólicos e atividades enzimáticas	14
3.5.1. Análise de compostos fenólicos	14
3.5.2. Análise de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD)	15
3.5.3. Análise de fenilalanina amônia liase (FAL)	16
3.6. Efeito dos compostos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. na morfologia de hifas e conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em frutos pós-colheita	17
3.7. Identificação dos COV produzidos por <i>Bacillus</i> spp. através de cromatografia gasosa unidimensional com detecção por espec- trometria de massas (GC-MS).	18
3.8. Efeito de diferentes meios de cultura no antagonismo e metabo- lismo secundário de <i>Bacillus</i> spp.	20
3.8.1. Seleção de isolados	20
3.8.2. Efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo microbiano.	20
3.8.3. Preparo das amostras para Cromatografia Líquida Acoplada com Espectrometria de Massas (LC-MS)	21
3.8.4. LC-MS	22
3.8.5. Efeito do cultivo de <i>Bacillus</i> spp. em meio líquido na produção de metabólitos	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Identificação de isolados de <i>Bacillus</i> spp. por amplificação da regi- ão 16S rRNA	23
4.2. Efeito do meio de cultivo na produção de compostos voláteis por <i>Bacillus</i> spp.	25

4.3. Efeito dos compostos voláteis produzidos por <i>Bacillus</i> spp. na evolução de lesões do tipo mancha sardenta para mancha dura, em frutos de laranja	28
4.4. Compostos fenólicos e atividades enzimáticas.....	33
4.5. Efeito dos compostos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. na morfologia de hifas e conídios de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em frutos pós-colheita.....	36
4.6. Análise dos metabólitos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. por GC-MS	38
4.7. Efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo microbiano.....	51
4.8. LC-MS.....	53
4.9. Efeito do cultivo de <i>Bacillus</i> spp. em meio líquido na produção de metabólitos	57
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS.....	66

IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E ANTIBIÓTICOS PRODUZIDOS POR *Bacillus* spp. ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA MANCHA PRETA DOS CITROS

RESUMO – O setor citrícola é o maior produtor de frutos no mundo, porém, encontra-se ameaçado por diversos patógenos, dentre esses, o fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros. Como alternativa à utilização de fungicidas sintéticos para o controle do patógeno, o controle biológico, utilizando bactérias do gênero *Bacillus*, apresenta destaque. Tais microrganismos possibilitam o biocontrole pela produção de compostos orgânicos voláteis ou não voláteis. Sendo assim, este trabalho teve por objetivos: identificar os isolados de *Bacillus* spp. por meio de técnicas moleculares; avaliar a produção de compostos orgânicos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. em diferentes meios de cultura; verificar os seus efeitos na evolução dos sintomas da doença em frutos de laranja, na morfologia de *P. citricarpa* em lesões de mancha preta e na indução de resistência, identificar os compostos voláteis por cromatografia gasosa unidimensional e finalmente, avaliar o efeito de diferentes meios de cultura no antagonismo e metabolismo secundário dos isolados de *Bacillus*. Os isolados bacterianos foram identificados como pertencentes às espécies de *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. methylophilus*. Os resultados mostraram que houve maior controle do patógeno, em decorrência da produção de voláteis, quando se utilizou os meios tripton de soja ágar (TSA) e caldo de tripton (TSB) para cultivo da bactéria, apresentando valores de inibição da colônia do fungo de até 73%. Com relação ao efeito dos compostos voláteis na evolução dos sintomas da doença, verificou-se que os melhores resultados, em termos de inibição (86%) de manchas sardentas que evoluíram para manchas duras, foram obtidos com o ACB-65 e ACB-73, quando cultivados em meio de cultivo TSB. Tais antagonistas causaram deformações nas hifas do patógeno, que podem explicar a não evolução dos sintomas da doença, como relatado anteriormente. Os voláteis de *Bacillus* spp. não foram capazes de ativar a atividade de enzimas indicativas de indução de resistência em frutos de laranja. As frações voláteis produzidas pelas bactérias foram identificadas e apresentaram álcoois, cetonas, aminas, éteres, aldeídos, fenóis e ácidos carboxílicos que podem servir como arsenal contra o fitopatógeno. Em relação ao efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo microbiano e no metabolismo secundário dos isolados de *Bacillus*, não houve diferença significativa entre os meios testados, porém proporcionaram redução significativa da colônia do fungo. Os metabólitos difundidos no meio de cultura foram identificados e apresentaram dois tipos de antibióticos, as iturinas e as surfactinas. O presente trabalho demonstrou o potencial de compostos orgânicos voláteis e não voláteis produzidos por *Bacillus* spp. no controle de *P. citricarpa* *in vitro* e *in vivo*, sendo uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos para o controle da mancha preta dos citros.

Palavras-chave: controle biológico, *Citrus sinensis*, *Guignardia citricarpa*, metabolômica, *Phyllosticta citricarpa*.

IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS AND ANTIBIOTICS PRODUCED BY *Bacillus* spp. INVOLVED IN CONTROL CITRUS BLACK SPOT

ABSTRACT – The citrus sector is the largest producer of fruits in the world, but it is threatened by several pathogens, among them *Phyllosticta citricarpa* fungus, causal agent of the citrus black spot. As an alternative to the use of synthetic fungicides to control the pathogen, the biological control, using bacteria of the genus *Bacillus*, is highlighted. Such microorganisms enable biocontrol by the production of volatile or non-volatile organic compounds. Therefore, this work had as objectives: to identify the isolates of *Bacillus* spp. by means of molecular techniques; to evaluate the production of volatile organic compounds produced by *Bacillus* spp. in different culture media; to verify its effects on the evolution of orange disease symptoms, *P. citricarpa* morphology in black spot lesions and induction of resistance, to identify the volatile compounds by one-dimensional gas chromatography and, finally, to evaluate the effect of different culture in the antagonism and secondary metabolism of *Bacillus* isolates. The bacterial isolates were identified as belonging to the species of *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus methylotrophicus*. The results showed that there was greater control of the pathogen, due to the volatile production, when tryptone broth (TSA) and tryptone broth (TSB) were used to culture the bacteria, presenting inhibition values of the fungus colony up to 73%. With regard to the effect of volatile compounds on the evolution of disease symptoms, the best results in terms of inhibition (86%) of freckles that progressed to hard spots were obtained with ACB-65 and ACB-73, when cultured in TSB culture medium. Such antagonists have caused deformations in the hyphae of the pathogen, which may explain the non-evolution of the disease symptoms, as previously reported. The volatiles of *Bacillus* spp. were not able to activate the enzyme activity indicative of induction of resistance in orange fruits. The volatile fractions produced by the bacteria were identified and showed alcohols, ketones, amines, ethers, aldehydes, phenols and carboxylic acids that can serve as arsenal against the phytopathogen. In relation to the effect of different culture media on the microbial antagonism and the secondary metabolism of the *Bacillus* isolates, there was no significant difference between the media tested, but provided a significant reduction of the fungus colony. The metabolites diffused in the culture medium were identified and presented two types of antibiotics, iturins and surfactins. The present work demonstrated the potential of volatile and non-volatile organic compounds produced by *Bacillus* spp. In the control of *P. citricarpa* *in vitro* and *in vivo*, being an alternative to the use of synthetic fungicides for the control of citrus black spot.

Keywords: biological control, *Citrus sinensis*, *Guignardia citricarpa*, metabolomics, *Phyllosticta citricarpa*,

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Meios de cultivo	10
Tabela 2. Meios de cultivo	21
Tabela 3. Espécies de <i>Bacillus</i> spp. identificadas por amplificação da região 16S rRNA.	24
Tabela 4. Efeito dos diferentes meios de cultura na produção de compostos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54 e ACB-56), avaliado por meio da medição do tamanho da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> (cm). Ensaio 1.	26
Tabela 5. Efeito dos diferentes meios de cultura na produção de compostos voláteis por <i>Bacillus</i> spp. (ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81, avaliado por meio da medição do tamanho da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> (cm). Ensaio 2.	27
Tabela 6. Porcentagem de manchas sardentas que evoluíram para manchas duras, sob efeito dos compostos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 1.	29
Tabela 7. Porcentagem de evolução da mancha sardenta para mancha dura sob efeito dos compostos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. Ensaio 2	32
Tabela 8. Compostos orgânicos voláteis de <i>Bacillus</i> ACB-65 e ACB-73, comuns em ambas as espécies, identificados pelo método SPME – GC-MS, após 7 dias de cultivo em meio TSB acrescido de ágar.	50

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sintomas da mancha preta dos citros. (A) mancha dura, (B) falsa melanose, (C) mancha sardenta, (D) mancha virulenta, (E) mancha rendilhada e (F) mancha trincada (SILVA-PINHATI <i>et al.</i> , 2009).....	5
Figura 2. Estruturas dos lipopeptídeos, iturina e surfactina, produzidos por espécies de <i>Bacillus</i> (Adaptada de MONGKOLTHANARUK, 2012).....	7
Figura 3. Ilustração dos sintomas de mancha preta dos citros. A – mancha sardenta, B – mancha dura.	12
Figura 4. Esquema demonstrativo da instalação do experimento para avaliar o efeito de compostos voláteis de <i>Bacillus</i> spp. sobre o desenvolvimento das lesões de mancha preta dos citros. A – placas de Petri perfuradas, B – potes de vidro contendo placas de Petri perfuradas com os isolados de <i>Bacillus</i> spp e frutos com sintomas de mancha preta dos citros, C – Armazenamento dos frutos nos potes de vidro, D – Frutos após retirada dos potes.	13
Figura 5. Curva analítica de ácido gálico.....	15
Figura 6. Dispositivo montado com tubos Falcon®, anel de alumínio com orifício central e septo de Teflon®.....	18
Figura 7. Dispositivo manual de SPME da SUPELCO.....	19
Figura 8. Gel de amplificação da região 16S rRNA de 32 isolados de <i>Bacillus</i> spp. 1 Kb- padrão de massa molecular.	23
Figura 9. Influência de compostos orgânicos voláteis de <i>Bacillus</i> ACB-73 na colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em diferentes meios de cultura (NA, TSA, TSB, BDA e KB)	25
Figura 10. Inibição da colônia de <i>Phyllosticta citricarpa</i> , quando submetida à ação de compostos voláteis produzidos pelos <i>Bacillus</i> spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24,	

- ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54 e ACB-56), em diferentes meios de cultura (NA, TSA, TSB, BDA e King B). Ensaio 126
- Figura 11.** Inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa*, quando submetida à ação de compostos voláteis produzidos pelos *Bacillus* spp. (ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81), em diferentes meios de cultura (NA, TSA, TSB, BDA e King B). Ensaio 2.....27
- Figura 12.** Efeito dos compostos voláteis de 27 isolados de *Bacillus* spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54, ACB-56, ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81), com 24h e 0h de cultivo em meio BDA, sobre a evolução de lesões de mancha sardenta para mancha dura. Foram realizadas três avaliações, num total de 21 dias31
- Figura 13.** Inibição da evolução dos sintomas de mancha sardenta para mancha dura, após os frutos serem submetidos aos compostos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus* spp. (ACB-46, ACB-60, ACB-65, ACB-69, ACB-71 e ACB-73). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio BDA e TSA ou TSB e utilizados no ensaio imediatamente após a repicagem (0h) ou, 24h depois.....33
- Figura 14.** Produção de compostos fenólicos avaliada por meio da formação de ácido gálico (g/100 g de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp. cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.34
- Figura 15.** Atividade da enzima polifenoloxidase avaliada por meio da transformação de catecol ($\mu\text{mol catecol transformado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados

- com voláteis de *Bacillus* spp., cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....34
- Figura 16.** Atividade da enzima peroxidase avaliada por meio da decomposição de H₂O₂ ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposto.min⁻¹.g⁻¹ de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp. cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.35
- Figura 17.** Atividade da enzima fenilalanina amônia liase avaliada por meio da decomposição de fenilalanina (PAL ABS.min⁻¹.g⁻¹ de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp. cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.35
- Figura 18.** Elétron-micrografias de varredura de lesões da mancha preta dos citros (MPC) em frutos de laranja. A – D: fruto controle (A- lesão da MPC; B- hifas de *Phyllosticta citricarpa* uniformemente tubulares e íntegras; C- emaranhado de conídios de *P. citricarpa*; D- lesão de MPC), E – H: fruto tratado com metabólitos voláteis do isolado *Bacillus amyloliquefaciens* ACB-65 (E- lesão da MPC; F- hifa de *P. citricarpa* achatada; G- conídios fúngicos deformados; H- conídio de *P. citricarpa* enrugado), I – L: fruto tratado com metabólitos voláteis do isolado *Bacillus subtilis* ACB-73 (I- lesão da MPC; J- K e L- hifas do fitopatógeno deformadas).....37
- Figura 19.** Cromatogramas de íons totais obtidos por GC-MS a partir de compostos orgânicos voláteis de (A) *Bacillus amyloliquefaciens* ACB-65 e (B) *Bacillus subtilis* ACB-73 cultivados em meio TSB. Condições de extração: 1h de extração a 27 °C com fibra DVB/CAR/PDMS. Condições cromatográficas: coluna HP-5MS

- (26 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), H₂ (1 mL/min), temperatura do injetor 250 °C, programação de temperatura 40 °C a 180 °C (5 °C/min); 180 °C a 250 °C (10 °C/min).....38
- Figura 20.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 2,60 min e (B) – espectro do composto 1,3-butanodiol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.39
- Figura 21.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,00 min e (B) – espectro do composto 3-hidroxi-2-butanona, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 96% de similaridade com o obtido experimentalmente.39
- Figura 22.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,00 min e (B) – espectro do composto 1-metoxi-2-metilpropano, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 90% de similaridade com o obtido experimentalmente.39
- Figura 23.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,19 min e (B) – espectro do composto 2-vinil-2-butenal, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 87% de similaridade com o obtido experimentalmente.40
- Figura 24.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,56 min e (B) – espectro do composto 3-metil-2-butanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 86% de similaridade com o obtido experimentalmente.40
- Figura 25.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,62 min e (B) – espectro do composto 1-metoxi-3-metilbutano, a partir da biblioteca

- NIST08.LIB, que apresentou 85% de similaridade com o obtido experimentalmente.....40
- Figura 26.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,74 min e (B) – espectro do composto 3-metil-1-butanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 91% de similaridade com o obtido experimentalmente.....41
- Figura 27.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 5,05 min e (B) – espectro do composto 3-metil-2-pentanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 86% de similaridade com o obtido experimentalmente.....41
- Figura 28.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 7,37 min e (B) – espectro do composto metil-pirazina, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.41
- Figura 29.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 8,04 min e (B) – espectro do composto 5-metil-2-hexanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.....42
- Figura 30.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 8,61 min e (B) – espectro do composto ácido-2-metil-butanóico, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 81% de similaridade com o obtido experimentalmente.....42
- Figura 31.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 9,20 min e (B) – espectro do composto 2-heptanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 95% de similaridade com o obtido experimentalmente.42

- Figura 32.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 9,57 min e (B) – espectro do composto 2-heptanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 96% de similaridade com o obtido experimentalmente.43
- Figura 33.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 10,08 min e (B) – espectro do composto 4,6-dimetil-pirimidina, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.43
- Figura 34.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 11,19 min e (B) – espectro do composto 6-metil-2-heptanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 95% de similaridade com o obtido experimentalmente.43
- Figura 35.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 11,50 min e (B) – espectro do composto 3-octen-2-ol, a partir da biblioteca FFNSC13.lib, que apresentou 81% de similaridade com o obtido experimentalmente.44
- Figura 36.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 11,89 min e (B) – espectro do composto 5-metil-2-heptanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 86% de similaridade com o obtido experimentalmente.44
- Figura 37.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 12,67 min e (B) – espectro do composto 3-(Butoximetil)heptano, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 84% de similaridade com o obtido experimentalmente.44
- Figura 38.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 12,98 min e (B) – espectro

- do composto 2-etil-3-metil-pirazina, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.....45
- Figura 39.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 13,71 min e (B) – espectro do composto 2-etil-1-hexanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 96% de similaridade com o obtido experimentalmente.45
- Figura 40.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,31 min e (B) – espectro do composto 3-etil-2,5-dimetil-pirazina, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.45
- Figura 41.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,60 min e (B) – espectro do composto 2-Nonanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 90% de similaridade com o obtido experimentalmente.46
- Figura 42.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,86 min e (B) – espectro do composto 3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.46
- Figura 43.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,99 min e (B) – espectro do composto 2-Nonanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.46
- Figura 44.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 19,76 min e (B) – espectro do composto 2-isopropil-5-metil-1-hexanol, a partir da biblioteca

- NIST08.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.....47
- Figura 45.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 20,10 min e (B) – espectro do composto 2-propil-1-heptanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 81% de similaridade com o obtido experimentalmente.....47
- Figura 46.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 20,67 min e (B) – espectro do composto 2-etil-2-propil-1-hexanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 82% de similaridade com o obtido experimentalmente.....47
- Figura 47.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 21,47 min e (B) – espectro do composto 2-undecanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 93% de similaridade com o obtido experimentalmente.48
- Figura 48.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 22,13 min e (B) – espectro do composto 2- nonenal, a partir da biblioteca FFNSC13.lib, que apresentou 82% de similaridade com o obtido experimentalmente.48
- Figura 49.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 22,34 min e (B) – espectro do composto 2-hexil-1-decanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 89% de similaridade com o obtido experimentalmente.....48
- Figura 50.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 23,20 min e (B) – espectro do composto 2-dodecanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 90% de similaridade com o obtido experimentalmente.49

- Figura 51.** Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 26,72 min e (B) – espectro do composto 2-Nonadecanona, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 87% de similaridade com o obtido experimentalmente.....49
- Figura 52.** Efeito do meio citros ágar (CiA) no antagonismo proporcionado por *Bacillus* spp. ao fungo *Phyllosticta citricarpa*. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.51
- Figura 53.** Efeito do meio cenoura-dextrose-ágar (CDA) no antagonismo proporcionado por *Bacillus* spp. ao fungo *Phyllosticta citricarpa*. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....52
- Figura 54.** Efeito do meio cenoura dextrose ágar (BDA) no antagonismo proporcionado por *Bacillus* spp. ao fungo *Phyllosticta citricarpa*. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.....52
- Figura 55.** Perfis cromatográficos obtidos quando o *Bacillus* ACB-08 foi cultivado em diferentes meios de cultura. (A) – meio citros ágar, (B) – meio cenoura dextrose ágar e (C) – meio batata dextrose ágar.....53
- Figura 56.** Perfis metabólicos dos isolados de *Bacillus*. (A) – ACB-08 em co-cultivo com o *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-08 cultivado sozinho; (C) – ACB-70 em co-cultivo *P. citricarpa* e (D) – ACB-70 sozinho; (E) – ACB-71 em co-cultivo *P. citricarpa* e (F) – ACB-71 sozinho.54
- Figura 57.** Perfis metabólicos dos isolados de *Bacillus*. (A) – ACB-12 em co-cultivo com o *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-12 cultivado sozinho; (C) – ACB-15 em co-cultivo *P. citricarpa* e (D) – ACB-15 sozinho; (E) – ACB-69 em co-cultivo *P. citricarpa* e (F) – ACB-69 sozinho.55

- Figura 58.** Perfis metabólicos dos isolados de *Bacillus*. (A) – ACB-63 em co-cultivo com o *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-63 cultivado sozinho; (C) – ACB-85 em co-cultivo *P. citricarpa* e (D) – ACB-85 sozinho.....56
- Figura 59.** Perfis metabólicos do isolado de *Bacillus*. (A) – ACB-13 em co-cultivo com *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-13 cultivado sozinho.56
- Figura 60.** Perfis metabólicos do isolado de *Bacillus*. (A) – ACB-64 em co-cultivo com *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-64 cultivado sozinho.57
- Figura 61.** Perfis metabólicos do isolado de *Bacillus*. (A) – ACB-83 em co-cultivo com *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-83 cultivado sozinho.57
- Figura 62.** Isolado de *Bacillus* ACB-71 que apresentou alta atividade de iturinas e surfactinas quando foi cultivado em meio líquido58
- Figura 63.** Isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram maior produção de iturinas, quando foram cultivados em meio líquido. (A) - ACB-63, (B) - ACB-69 e (C) – ACB-83.....58
- Figura 64.** Isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram maior produção de surfactinas, quando foram cultivados em meio líquido. (A) - ACB-08, (B) - ACB-12, (C) - ACB-13, (D) - ACB-15, (E) - ACB-64, (F) - ACB-70 e (G) - ACB-8559

ABREVIATURAS

LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
SPME	Microextração em fase sólida
COV	Compostos orgânicos voláteis
MPC	Mancha preta dos citros
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
TSB	Caldo de triptona de soja
BDA	Batata dextrose ágar
BD	Caldo de batata dextrose
TSA	Triptona de soja ágar
CiA	Meio de citros ágar
NA	Nutriente ágar
KB	King B
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PPO	Polifenoloxidase
POD	Peroxidase
g	Gramas
L	Litros
mL	Mililitros
min	Minuto
h	Hora

1. INTRODUÇÃO

O setor citrícola é o maior produtor de frutos no mundo, sendo estes dedicados principalmente à extração de sucos, mas uma proporção considerável é fornecida ao consumo direto, como fruta *in natura* (PALOU *et al.*, 2015). No entanto, o setor sofre grandes perdas causadas particularmente por fungos patogênicos, podendo afetar de 25% a 50% da produção (ECKERT; OGAWA, 1985; SPADARO; GULLINO, 2004).

Dentre estes patógenos, encontra-se o fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Petrak (teleomorfo: *Guignardia citricarpa* Kiely), que afeta a maioria das espécies de citros causando a mancha preta dos citros (MPC). A infecção resulta em graves perdas econômicas em áreas produtoras de citros na África, Ásia, Austrália e América do Sul. Esta doença afeta a comercialização dos frutos *in natura*, pois causa a depreciação estética dos mesmos (LIMA *et al.*, 2016), além de sofrer com as barreiras fitossanitárias impostas por países da comunidade europeia, onde o patógeno encontra-se ausente (PAUL *et al.*, 2005; GRAHAM *et al.*, 2014).

A utilização de fungicidas sintéticos, apesar de sua eficiência limitada, constitui-se na principal medida de controle da doença, porém, a preocupação dos consumidores com resíduos químicos e o desenvolvimento de patógenos resistentes, estimulou a busca por meios alternativos de controle, mais seguros, ecológicos e sustentáveis (FELIZIANI; ROMANAZZI, 2013; BAUTISTA-BAÑOS, 2014; MARI *et al.*, 2014).

Neste contexto, o controle biológico utilizando espécies de *Bacillus* tem destaque. Esses microrganismos possibilitam o biocontrole pela produção de compostos orgânicos voláteis (COV) ou não voláteis (ASARI *et al.*, 2016), apresentando potencial antagônico a diversos fitopatógenos de várias culturas na pré e pós-colheita (KIM *et al.*, 2010; ASHWINI; SRIVIDYA, 2014; ALAMRI, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2015; ZOHORA *et al.*, 2016).

A utilização de COV produzidos por *Bacillus* spp. ou a fumigação com misturas artificiais de voláteis no tratamento de frutos na pós-colheita, pode eliminar ou inibir patógenos durante o transporte e armazenamento, além de minimizar a manipulação dos frutos e ser uma alternativa viável como controle

não-residual (DONAHAYE, 2000). Atualmente, existem poucos fumigantes disponíveis para o controle de patógenos, o dióxido de enxofre é um deles, porém, não apresenta efetividade contra infecções pré-existentes (ADASKAVEG *et al.*, 2002).

Espécies de *Bacillus*, também, apresentam capacidade de produzir metabólitos não voláteis, entre esses, as iturinas e fengicinas exibem poderosa atividade antifúngica que afetam o desenvolvimento de uma grande variedade de fitopatógenos (KLICH, 1994; HAGELIN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010; ABRIOUEL *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015). Já as surfactinas não são tóxicas para patógenos fúngicos, porém, apresentam algum efeito sinérgico sobre a atividade antifúngica da iturina (MAGET-DANA *et al.*, 1992).

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: (i) identificar taxonomicamente as espécies de *Bacillus* spp. utilizadas neste estudo, por meio de técnicas moleculares; (ii) avaliar a produção de compostos orgânicos voláteis por isolados de *Bacillus* spp., em diferentes meios de cultivo; (iii) analisar os efeitos desses compostos na evolução de lesões de MPC em frutos de laranja na pós-colheita; (iv) estudar os efeitos dos COV na indução de resistência em frutos de laranja; (v) avaliar os efeitos dos COV na morfologia de *Phyllosticta citricarpa* em lesões de MPC; (vi) identificar os COV produzidos; (vii) analisar o efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo em cultivo pareado e no metabolismo secundário de *Bacillus* spp. e, finalmente, (viii) identificar os metabólitos difundidos no meio pela bactéria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da mancha preta dos citros

A mancha preta dos citros (MPC) é uma doença causada pelo fungo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa (1973), teleomorfo *Guignardia citricarpa* Kiely (1948). Este microrganismo afeta todas as variedades de laranja doce (*Citrus sinensis*), limões verdadeiros (*Citrus limon* e *Citrus limonia*), pomelos (*Citrus maxima*) e algumas variedades de tangerina (*Citrus reticulata*), excluindo-se apenas variedades de laranja azeda (*Citrus aurantium*) e lima ácida “Tahiti” (*Citrus latifolia* Tanaka), (KOTZÉ, 1981; BALDASSARI *et al.*, 2008). Os sintomas da doença são aparentes em pecíolos, ramos, pedúnculos, folhas, espinhos e, principalmente, em frutos (KIMATI *et al.*, 2005). A intensidade da doença além de prejudicar a aparência, está diretamente relacionada à queda prematura dos frutos, reduzindo a produtividade (SPOSITO, 2003; GASPAROTTO; PEREIRA, 2004).

A infecção por *P. citricarpa* resulta em graves perdas econômicas em áreas produtoras de citros na África, Ásia, Austrália e América do Sul. Esta doença afeta a comercialização dos frutos *in natura*, pois causa a depreciação estética dos mesmos (LIMA *et al.*, 2016), além de sofrer com as barreiras fitossanitárias impostas por países da comunidade europeia, onde o patógeno encontra-se ausente (PAUL *et al.*, 2005; GRAHAM *et al.*, 2014).

Os sintomas da MPC, geralmente, surgem tardiamente e os frutos que não apresentam indícios da doença podem vir a desenvolver os sintomas na fase de pós-colheita. O surgimento das lesões é muito influenciado pelas condições de transporte ou armazenamento, temperaturas elevadas e alta luminosidade (AGOSTINI *et al.*, 2006). Assim, o conhecimento dos mecanismos envolvidos na expressão dos sintomas e a determinação de alternativas que viabilizem a sua supressão tornam-se de importância relevante, podendo significar a possibilidade de aumento das exportações de frutos pelas empresas brasileiras.

2.2. Sintomatologia e controle da mancha preta dos citros

Os frutos acometidos pela MPC apresentam seis diferentes formas de lesões, demonstrados na Figura 1. A mancha dura (Figura 1A) é o sintoma mais típico da doença e, geralmente, aparece quando os frutos iniciam a fase de maturação. As lesões apresentam centro deprimido de cor marrom claro ou acinzentado e as bordas salientes, de coloração marrom escura (KOTZÉ, 1981).

As manchas do tipo falsa melanose (Figura 1B) geralmente aparecem em frutos jovens; porém, no decorrer da temporada, podem vir a desenvolver lesões do tipo mancha dura. As lesões deste tipo de sintoma são pequenas, de colorações escuras e numerosas (KOTZÉ, 1981).

Sintomas de mancha sardenta (Figura 1C) caracterizam-se por lesões pequenas de coloração pardo-avermelhadas, levemente deprimidas e normalmente não apresentam as frutificações do fungo. Ocorrem após o início de maturação dos frutos e são quase invisíveis a olho nu, porém, no decorrer da temporada podem vir a desenvolver lesões do tipo mancha dura (KOTZÉ, 1981).

A mancha virulenta (Figura 1D) desenvolve-se normalmente no final da safra, quando os frutos estão maduros e as temperaturas mais elevadas. As lesões aparecem como resultado do desenvolvimento e coalescência de lesões dos dois tipos anteriores, dando origem a grandes lesões deprimidas, de centro acinzentado e bordos salientes de coloração marrom escuro ou avermelhadas. A casca do fruto fica necrosada na área da lesão, que apresenta muitos picnídios, mas a parte interna do fruto não é afetada (KOTZÉ, 1981).

Os sintomas da mancha rendilhada (Figura 1E) aparecem em frutos ainda verdes. As lesões são superficiais, sem bordas definidas e textura lisa, coloração alaranjada com o centro amarelado a marrom escuro. Estas lesões podem atingir grande parte da superfície do fruto (GOES, 2005).

A mancha trincada (Figura 1F) é observada em frutos ainda verdes, onde apresenta aspecto oleoso. Após maturação dos frutos, as regiões exibindo as manchas apresentam trincas, oriundas da interação do patógeno com o ácaro da falsa ferrugem (*Phyllocoptruta oleivora*) (GOES *et al.*, 2000; NOZAKI, 2007).

A utilização de fungicidas sintéticos, apesar de sua eficiência limitada, constitui-se na principal medida de controle da doença, porém, a preocupação dos consumidores com resíduos químicos e o desenvolvimento de patógenos

resistentes, estimulou a busca por meios alternativos de controle, mais seguros, ecológicos e sustentáveis (FELIZIANI; ROMANAZZI, 2013; BAUTISTA-BAÑOS, 2014; MARI *et al.*, 2014).

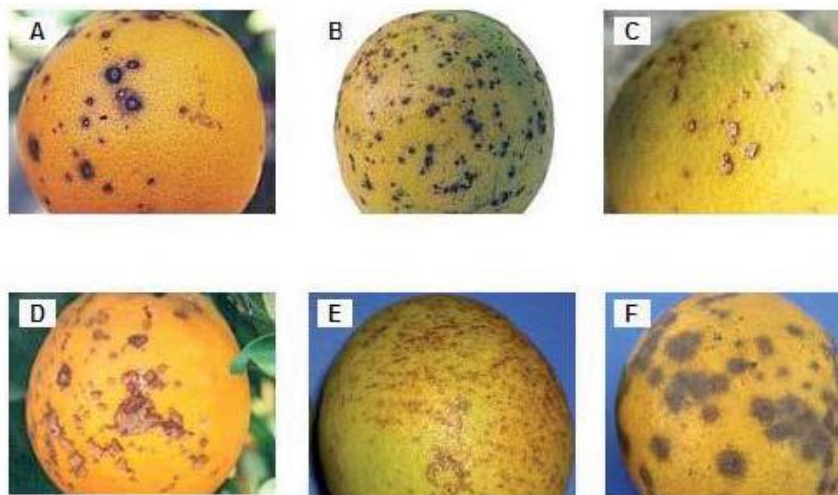


Figura 1. Sintomas da mancha preta dos citros. (A) mancha dura, (B) falsa melanose, (C) mancha sardenta, (D) mancha virulenta, (E) mancha rendilhada e (F) mancha trincada (Fonte: SILVA-PINHATI *et al.*, 2009).

2.3. Controle Biológico

O controle biológico consiste na supressão de danos causados por um organismo, devido à atividade de outros organismos, considerados inimigos naturais. Em fitopatologia, o termo é aplicado ao uso de microrganismos antagonistas na supressão de doenças (PAL; MCSPADDEN, 2006). Alguns autores também classificam a indução de resistência como um tipo de controle biológico (PASCHOLATI, 1998).

Neste contexto, o controle biológico, utilizando espécies de *Bacillus*, apresenta destaque por apresentarem diversas vantagens em relação aos demais antagonistas.

Estes microrganismos apresentam a capacidade de formar endósporos tolerantes a altas variações de temperatura e pH, a pesticidas, fertilizantes e ao tempo de estocagem, permitindo a utilização destes na formulação de produtos mais estáveis (KLOEPPER *et al.*, 1997).

Outra vantagem do gênero *Bacillus* se deve ao seu rápido crescimento e à ausência de patogenicidade da maioria das espécies (SHODA, 2000).

Além de tudo isso, esses microrganismos possibilitam o biocontrole pela produção de compostos orgânicos voláteis (COV) ou não voláteis (ASARI *et al.*, 2016), apresentando potencial antagônico a diversos fitopatógenos de várias culturas na pré e pós-colheita (KIM *et al.*, 2010; ASHWINI; SRIVIDYA, 2014; ALAMRI, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2015; ZOHORA *et al.*, 2016).

2.4. Metabolômica

A metabolômica é o campo científico que visa caracterizar e avaliar a totalidade de metabólitos produzidos por uma célula ou tecido em um determinado momento (Dumas *et al.*, 2014),

Os microrganismos fornecem a possibilidade de inúmeras manipulações, visando à otimização da produção de metabólitos, graças ao curto ciclo de vida e a fácil adaptação no meio externo (LIMA, 1975). Neste sentido, uma abordagem é a modificação das condições de cultivo e crescimento do microrganismo.

O alto grau de diversidade do metaboloma de um organismo é verificado pelos diferentes metabólitos que o compõem, de massa molecular, polaridade, solubilidade e volatilidade variáveis. Essas moléculas participam de reações metabólicas e são requeridas para manutenção, crescimento e função celular (HARRIGAN; GOODACRE, 2012).

Mediante a metabolômica torna-se possível compreender a variedade de processos biológicos envolvidos, por exemplo, na progressão de doenças, no desenvolvimento de agentes de biocontrole, no melhoramento genético, na resposta de um organismo a um tratamento ou, no efeito de estímulos ambientais em processos de desenvolvimento (ALLWOOD *et al.*, 2008).

A espectrometria de massas é uma ferramenta que vem sendo bastante utilizada para identificação e quantificação do metaboloma de microrganismos. Ela se baseia no princípio de que íons em fase gasosa podem ser direcionados e separados de acordo com sua relação massa/carga (m/z) por campos elétricos

e/ou magnéticos, permitindo a obtenção de informação estrutural de uma determinada substância (FILL, 2009).

2.4.1. Metabolômica de *Bacillus* spp.

As espécies de *Bacillus* spp. têm a capacidade de produzir uma variedade de componentes bioativos com estruturas quimicamente diversas. Tais espécies têm um sistema secretório bem desenvolvido (HARWOOD, 1992), produzindo diversos metabólitos secundários com um amplo espectro de atividades antibióticas valiosas para a medicina e a agricultura (MUKHERJEE; SEN, 2006).

Os compostos antimicrobianos produzidos por estirpes de *Bacillus* já foram estudados extensivamente como agentes biológicos de controle de patógenos de plantas. Tais estirpes têm a capacidade de produzir antibióticos, vários deles relatados na literatura (HAGELIN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010; ABRIOUEL *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015). Dentre eles, as iturinas (Figura 2) exibem poderosa atividade antifúngica e inibição do crescimento contra uma ampla gama de fitopatógenos (KLICH, 1994; KIM, *et al.*, 2004). Já as surfactinas (Figura 2) não são tóxicas para patógenos fúngicos, mas apresentam algum efeito sinérgico sobre a atividade antifúngica da iturina (MAGET-DANA *et al.*, 1992).

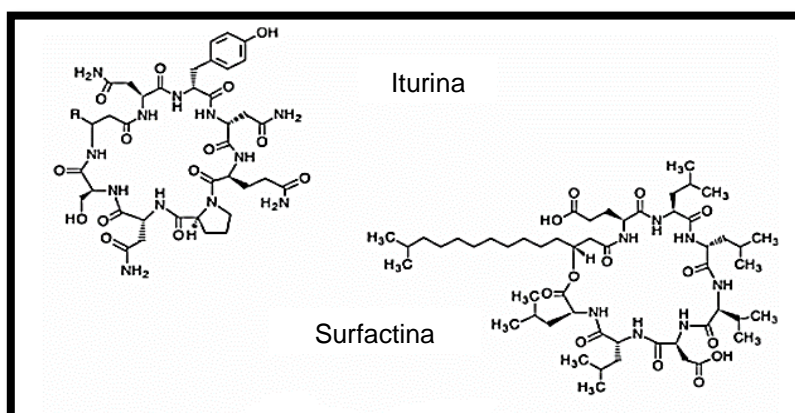


Figura 2. Estruturas dos lipopeptídeos, iturina e surfactina, produzidos por espécies de *Bacillus* (Adaptada de MONGKOLTHANARUK, 2012).

Estudos do antagonismo oriundo de compostos orgânicos voláteis (COV) produzidos por *Bacillus* não são tão frequentes na literatura, quando comparado aos de metabólitos difusíveis, como por exemplo, os antibióticos (CHAURASIA *et al.*, 2005). Tais compostos, porém, são potenciais no tratamento de doenças, em particular, durante o armazenamento e transporte, ou mesmo eliminando lesões e doenças provocadas por microrganismos (WORAPONG, 2001; MERCIER; JIMENEZ, 2004). Eles compreendem grupos quimicamente diversos de moléculas orgânicas (como por exemplo, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, aminas e tióis) que podem se difundir tanto no solo quanto no ambiente externo (MORATH; HUNG; BENNETT, 2012). Vários pesquisadores já relataram as propriedades antimicrobianas dos COV produzidos por espécies de *Bacillus* contra vários fitopatógenos (CHAVES-LÓPES *et al.*, 2015; SOLANKI *et al.*, 2015; ASARI *et al.*, 2016; TORRES *et al.*, 2016), porém não há estudos que relatem a ação desses compostos no controle de *P. citricarpa*.

Dessa forma, a utilização dos metabólitos produzidos por espécies de *Bacillus*, sejam antibióticos secretados para o meio ou COV, pode fornecer resultados interessantes no controle preventivo da MPC e também durante o transporte e armazenamento dos frutos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

O fungo *Phyllosticta citricarpa* e os 32 isolados de *Bacillus* spp. (ACB-08, ACB-12, ACB-13, ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54, ACB-56, ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73, ACB-81, ACB-83 e ACB-85) utilizados neste estudo pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia e Controle Biológico do Centro APTA Citros Sylvio Moreira/IAC, Cordeirópolis/SP. Tais isolados de *Bacillus* spp. foram selecionados com base nos resultados promissores apresentados por eles contra *P. citricarpa*, em estudo prévio relatado por Fujimoto & Kupper (2016).

3.2. Identificação de isolados de *Bacillus* por amplificação da região 16S rRNA

Os 32 isolados de *Bacillus* spp. foram identificados por meio de técnicas de biologia molecular. Para isso, o DNA das bactérias foi extraído utilizando “Wizard Genomic DNA Purification Kit” da Promega® e a quantidade e pureza do material foram determinadas usando um espectrofotômetro (2000c NanoDrop). A região 16S rRNA dos DNAs obtidos foi amplificada através da técnica da PCR, utilizando dois iniciadores universais, 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGYTACCTTACGACTT-3'), de acordo com Lane (1991). Os ciclos da PCR consistiram de um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 3 min; 27 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 30 s, anelamento a 52 °C durante 30 s e extensão a 72 °C por 1 min e 40 s e uma extensão final a 72 °C durante 7 min. O produto da PCR foi purificado utilizando “PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit” (Invitrogen™) (THOMPSON *et al.*, 1994) e enviadas para sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO/UNESP, Jaboticabal/SP). Para o sequenciamento

foram utilizados os mesmos iniciadores descritos anteriormente, a fim de se obter a sequência completa do gene 16S rRNA. Posteriormente, as sequências foram alinhadas e comparadas com a base de dados do NCBI, através da ferramenta Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

3.3. Efeito da composição do meio de cultivo na produção de compostos voláteis pelos isolados de *Bacillus* spp.

Neste estudo foram testados diferentes meios (Tabela 1) para o cultivo de 27 isolados de *Bacillus* spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54, ACB-56, ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81) com o objetivo de incrementar a produção de compostos voláteis com atividade contra *P. citricarpa*, anteriormente relatada por Fujimoto e Kupper (2016). Para a produção de COV, utilizou-se a metodologia adaptada de Lopes *et al.* (2015).

Tabela 1. Meios de cultivo

Meio de cultivo	Sigla	Composição
Batata dextrose ágar	BDA	4 g/L de extrato de batata, 20 g/L de dextrose; 15 g/L de ágar.
King B	KB	20 g/L de proteose peptona nº3; 1,5 g/L de MgSO ₄ .7H ₂ O; 1,5 g/L de K ₂ HPO ₄ ; 15 g/L de ágar; 10 mL/L de glicerina.
Nutriente ágar	NA	3 g/L de extrato de carne; 5 g/L de peptona; 15 g/L de ágar.
Triptona de soja ágar	TSA	15 g/L de hidrolisado de caseína enzimática; 15 g/L ágar; 5 g/L de peptona de soja; 5 g/L de cloreto de sódio.
Caldo de triptona de soja	TSB	17 g/L de hidrolisado de caseína enzimática; 3 g/L de peptona de soja; 5 g/L de cloreto de sódio; 2,5 g/L de D-glicose; 2,5 g/L de di-hidrogenofosfato de potássio.

Para este estudo, foram realizados dois ensaios com quatro repetições cada um, utilizando placas de Petri bipartidas. Em um dos lados da placa foi colocado o meio de cultivo para a bactéria, conforme mencionado anteriormente e do outro lado, meio BDA para o cultivo de *P. citricarpa*. Discos de 5 mm contendo a bactéria e/ou o patógeno foram transferidos para os respectivos meios, após a solidificação e as placas contendo as culturas foram vedadas. O tratamento controle foi constituído por placas contendo o fitopatógeno na ausência da bactéria. As culturas foram incubadas em estufa para B.O.D. a 26 °C com fotoperíodo de 12h. A avaliação se deu quando o patógeno atingiu a borda da placa no tratamento controle, pela medição da colônia do fungo em dois sentidos perpendiculares. Foi realizado um teste fatorial onde os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3.4. Efeito dos compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. na evolução de lesões do tipo mancha sardenta para mancha dura, em frutos de laranja

Para este estudo foram realizados dois ensaios com três repetições cada um. O primeiro (Ensaio 1) teve por objetivo avaliar os 27 isolados de *Bacillus* spp. produtores de compostos orgânicos voláteis com atividade contra *P. citricarpa* (FUJIMOTO; KUPPER, 2016). O segundo (Ensaio 2) correspondeu à utilização de seis isolados da bactéria (ACB-46, ACB-60, ACB-65, ACB-69, ACB-71 e ACB-73) selecionados em função dos resultados obtidos no Ensaio 1 desse estudo e dos ensaios com diferentes meios de cultivo da bactéria para produção de voláteis e que mostraram potencial para o controle do patógeno.

Frutos de laranja Hamlin foram colhidos a partir de um pomar comercial de laranja, localizado no município de Engenheiro Coelho, São Paulo, Brasil. Após a coleta, os frutos foram selecionados visando obter um lote de tamanho médio e de estágio de maturação uniforme, sendo que todos apresentavam

sintomas de mancha preta dos citros. Inicialmente, os frutos foram lavados com detergente neutro e água corrente e as lesões de mancha sardenta foram pré-marcadas com caneta definitiva para avaliação do seu desenvolvimento para mancha dura, posteriormente aos tratamentos (Figura 3).

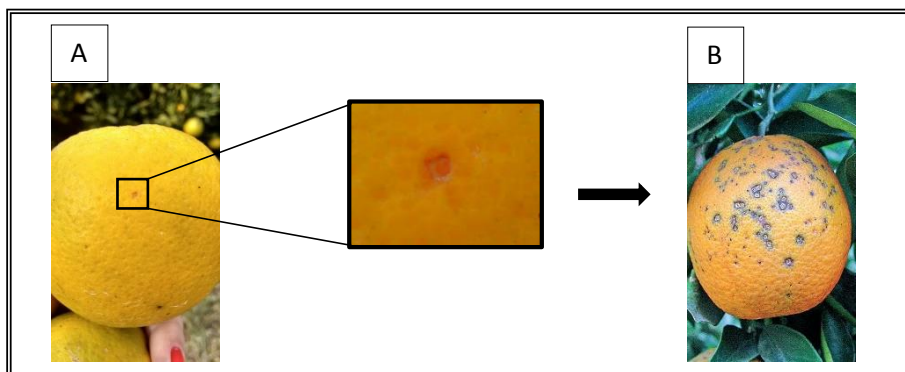


Figura 3. Ilustração dos sintomas de mancha preta dos citros.
A – mancha sardenta, B – mancha dura.

Para o tratamento dos frutos, no Ensaio 1, os 27 isolados de *Bacillus* spp., foram repicados para placas contendo meio BDA, enquanto que, para o Ensaio 2, os seis isolados selecionados foram repicados para meio BDA e, também, para outros meios, TSA (isolado ACB-46, ACB-60 e ACB-69) e meio TSB (isolados ACB-65, ACB-71 e ACB-73), considerando os experimentos anteriores. Para a repicagem foi utilizada uma suspensão da bactéria de 200 μ L que foi espalhada sobre os respectivos meios. Parte das placas com os isolados foram utilizadas no experimento imediatamente após a repicagem (0h) e a outra parte foi incubada em estufa para BOD a 26°C com fotoperíodo de 12 horas durante 24 horas.

Para a instalação do experimento, as tampas das placas de poliestireno (onde estava sendo cultivado cada isolado de *Bacillus* spp.) foram, inicialmente perfuradas (7 orifícios por tampa e 0,4 cm de diâmetro para cada orifício) e, em seguida, depositadas no fundo de um pote de vidro de 3 L. Na sequência, foram colocados frutos apresentando sintomas do tipo mancha sardenta, totalizando 30 lesões por pote. Os potes foram hermeticamente fechados, porém, na parte interna da tampa de rosca foi colocada outra placa (perfurada, como descrito anteriormente) contendo o mesmo isolado de *Bacillus*, para garantir que os voláteis produzidos ficassem bem distribuídos dentro dos recipientes. Seguiu-se

o mesmo procedimento para todos os tratamentos. Placas contendo apenas meio de cultura foram utilizadas como controle. Os recipientes foram mantidos em temperatura e luz ambiente. Os frutos permaneceram dentro dos potes durante 7 dias. Após a retirada dos frutos dos recipientes, os mesmos continuaram em temperatura ambiente e umidade relativa de 85% (metodologia adaptada de TOFFANO, 2010). (instalação do experimento, Figura 4).

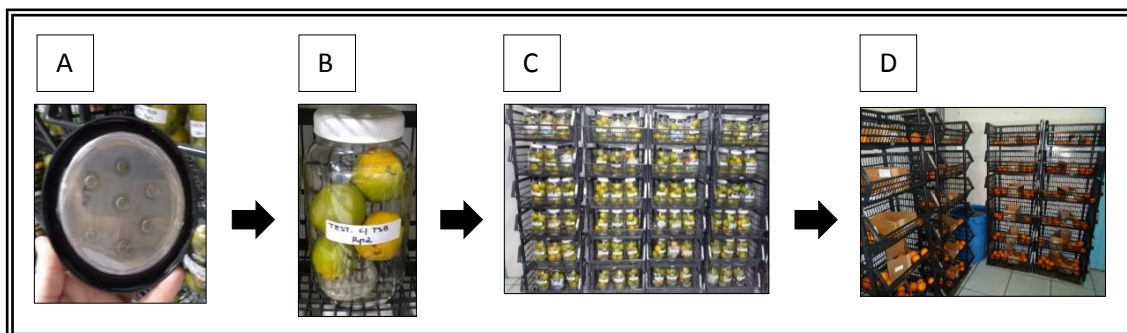


Figura 4. Esquema demonstrativo da instalação do experimento para avaliar o efeito de compostos voláteis de *Bacillus* spp. sobre o desenvolvimento das lesões de mancha preta dos citros. A – placas de Petri perfuradas, B – potes de vidro contendo placas de Petri perfuradas com os isolados de *Bacillus* spp e frutos com sintomas de mancha preta dos citros, C – Armazenamento dos frutos nos potes de vidro, D – Frutos após retirada dos potes.

Foram realizadas três avaliações, em intervalo de sete dias, sendo a primeira logo após a retirada dos frutos dos potes de vidro (Ensaio 1). Para o Ensaio 2, foram realizadas quatro avaliações, sendo as três primeiras realizadas de acordo com o descrito para o Ensaio 1 e a quarta 10 dias após a terceira avaliação, totalizando 31 dias. As avaliações foram realizadas determinando-se a porcentagem de lesões com sintomas de mancha sardenta que evoluíram para o sintoma de mancha dura, após a submissão dos frutos aos compostos voláteis produzidos pelos isolados bacterianos. Foi realizado um teste fatorial onde os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3.5. Compostos fenólicos e atividades enzimáticas

Frutos cítricos, obtidos dos melhores tratamentos (ACB-60+TSA, ACB-65+TSB, ACB-71+TSB, ACB-73+TSB, ACB-46+BDA) no experimento em que se avaliou o efeito dos COV produzidos por *Bacillus* spp. sobre o desenvolvimento das lesões de MPC, foram utilizados para análise de produção de compostos fenólicos e atividades enzimáticas, bem como os frutos do tratamento controle. Amostras de casca dos frutos testados foram dessecadas a partir das lesões de MPC (aproximadamente 0,5 cm). O material foi macerado com nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C até a realização dos experimentos.

3.5.1. Análise de compostos fenólicos

Na preparação do extrato bruto para análise de fenóis foram utilizados tubos plásticos contendo 100 mg do material macerado acrescido de 5 mL de metanol 80% (v/v). Logo após, os tubos foram colocados em banho ultrassônico por 20 min e centrifugados a 5000 g por 10 min. Os sobrenadantes foram reservados em frascos selados no escuro e repetiu-se o processo, juntando os sobrenadantes obtidos. A reação foi realizada em frascos escuros contendo 0,3 mL do sobrenadante; 0,7 mL de água destilada; 2,5 mL de Na₂CO₃ e 0,5 mL de folin ciocalteau. O branco consistiu de 0,3 mL de metanol 80% (v/v); 0,7 mL de água destilada; 2,5 mL de solução de Na₂CO₃ a 20% (v/v) e 0,5 mL de folin ciocalteau. Os frascos foram agitados e após 1 hora de descanso no escuro, foi realizada a leitura de absorbância a 725 nm. As leituras foram plotadas em curva analítica (Figura 5) a partir de uma solução de ácido gálico na concentração de 1 mg/mL. Para a curva, foram utilizados 50 mg de ácido gálico, completando um balão volumétrico para 50 mL com metanol 80% (v/v), retirado uma alíquota de 2,5 mL completando um balão volumétrico para 25 mL com metanol 80% (v/v). Alíquotas desta solução (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mL) foram diluídas com água

destilada, até completar o volume para 1 mL e acrescidas de 0,5 mL de folin e 2,5 mL de uma solução de Na_2CO_3 20% (m/v). Posteriormente, realizou-se a leitura a 725 nm. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/100 g^{-1} de massa fresca. Cada tratamento foi composto por três repetições. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, onde os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

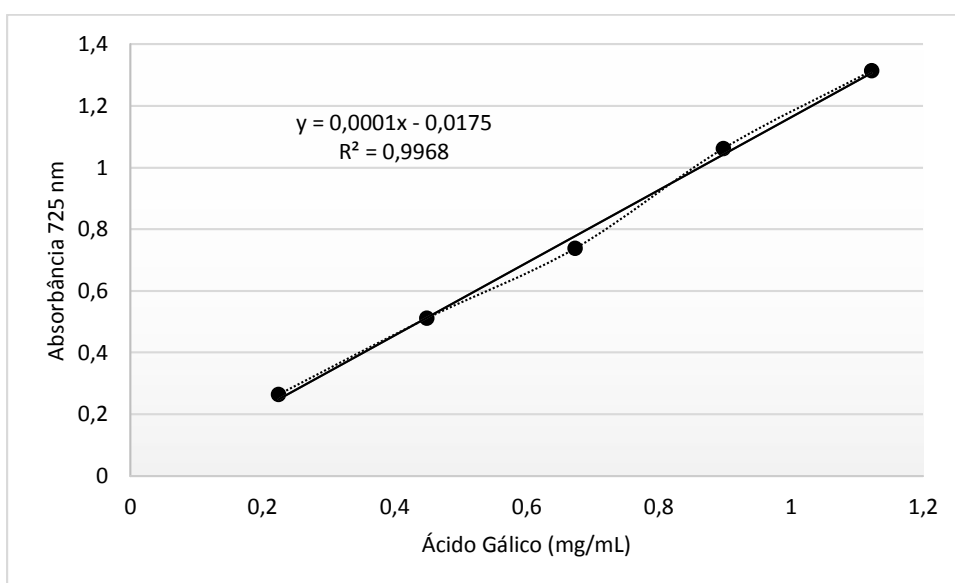


Figura 5. Curva analítica de ácido gálico.

3.5.2. Análise de polifenoloxidase (PPO) e peroxidase (POD)

Para a análise das atividades da polifenoloxidase (PPO) e da peroxidase, o extrato bruto foi preparado em tubos plásticos, contendo 500 mg do material macerado e 5 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,7. As amostras foram centrifugadas a 10000 g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e guardado em tubos de ensaio, em banho de gelo. A reação da PPO foi realizada em tubos de ensaio contendo 0,3 mL do sobrenadante e 1,85 mL de catecol. O branco da amostra continha água destilada no lugar do catecol. O branco geral apresentava 0,3 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,7 e 1,85

mL de catecol. Os tubos foram incubados a 30 °C em banho-maria, por 30 min. Posteriormente, os tubos foram transferidos para um banho de gelo, onde foi adicionado 0,8 mL de ácido perclórico, para paralisar a reação. Após agitação em vortex, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos e, posteriormente, realizada a leitura de absorbância a 395 nm, em espectrofotômetro. A atividade específica da polifenoloxidase foi expressa em μmol de catecol consumido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas solúveis (CANO *et al.*, 1997).

A reação da POD foi montada em tubos de ensaio contendo 0,6 mL do sobrenadante; 0,5 mL de uma solução A (2,2 mL de H_2O_2 a 30% em 10 mL de água destilada, e desta solução, retirado 0,5 mL e completado com 50 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,7) e 0,5 mL de uma solução B (81,5 mg de fenol em 40 mL de água destilada; dissolvido 40,65 mg de aminoantipirina em 10 mL de água destilada e adicionado os 40 mL da solução de fenol). Para o branco da amostra, foi utilizado 0,6 mL do sobrenadante e 1 mL de água destilada. O branco geral continha 0,5 mL da solução A; 0,5 mL da solução B e 0,6 mL de solução tampão fosfato de potássio pH 6,7. Os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C, por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram transferidos para um banho de gelo, onde foi adicionado 2 mL de álcool etílico absoluto. Após agitação em vortex, o tubo foi deixado em repouso por 10 minutos e, posteriormente, realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi expressa em μmol de H_2O_2 consumida $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas solúveis (ALLAIN *et al.*, 1974 com modificações em LIMA *et al.*, 1999).

Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, onde os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3.5.3. Análise de fenilalanina amônia liase (FAL)

Na preparação do extrato enzimático bruto para análise da fenilalanina amônia liase, 300 mg do material macerado foi adicionado a 10 mL de tampão borato 0,1 mol/L, em banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6000 g, a 4 °C, durante 40 min e o sobrenadante foi coletado. A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo 1 mL do sobrenadante e 1 mL de tampão borato 0,2 mol/L. O branco das amostras foi composto de 1 mL do sobrenadante e 2 mL de tampão borato 0,2 mol/L. Para o branco geral foi utilizado 1 mL de tampão borato 0,1 mol/L e 1 mL de tampão borato 0,2 mol/L. Os tubos foram colocados em banho-maria a 36°C, adicionando após 5 minutos, 1 mL de fenilalanina em cada tubo, exceto nos tubos com o branco das amostras. Estes foram incubados em banho-maria por 1 hora a 36°C. Posteriormente, acrescentou-se 0,1 mL de HCl 6 mol/L aos tubos, em banho de gelo, para paralisar a reação. Os tubos foram agitados e as leituras espectrofotométricas de absorvância foram realizadas a 290 nm, subtraindo da leitura de cada amostra a leitura de seu controle. A atividade específica da PAL foi definida como nmol de ácido trans-cinâmico por min⁻¹ por mg de proteína total (metodologia adaptada de LISKER et al., 1983). Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, onde os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o software Assistat 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2016).

3.6. Efeito dos compostos voláteis de *Bacillus* spp. na morfologia de hifas e conídios de *Phyllosticta citricarpa* em frutos pós-colheita

Esse ensaio teve por objetivo verificar o efeito dos compostos voláteis sobre as hifas do fungo *P. citricarpa*, utilizando microscopia eletrônica de varredura como ferramenta. Frutos provenientes dos melhores tratamentos obtidos no teste anterior (Ensaio 2, item 3.4) foram utilizados.

Amostras da casca do fruto (4 mm), contendo tecido lesionado, foram retiradas das lesões de MPC e fixadas em temperatura ambiente por imersão em glutaraldeído (2,5%) em 0,075 mol/L de tampão fosfato a pH 7,0 por 24 h, para conservação das características estruturais e morfológicas. Em seguida, as amostras foram imersas em tetróxido de ósmio 1% (v/v) em 0,075 mol/L de

tampão fosfato a pH 7,0 por 1 h. Após essas etapas, as amostras foram submetidas a uma série de desidratações utilizando concentrações crescentes de etanol (20%, 30%, 50%, 70% e 100% v/v) por 20 minutos e depois secas em um secador de ponto crítico. Os tecidos secos foram montados em topos de alumínio, revestidos com ouro-paládio utilizando um revestidor de pulverização BAL-TEC 050 e elétrôn-micrografadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JMS-T300), operando em 10 KeV (metodologia adaptada de CAPDEVILLE *et al.*, 2007).

3.7. Identificação dos COV produzidos por *Bacillus* spp. por meio de cromatografia gasosa unidimensional com detecção por espectrometria de massas (GC-MS)

As separações cromatográficas foram conduzidas empregando GC-MS, seguindo metodologia adaptada de Lima *et al.* (2015). Dois isolados de *Bacillus* spp. (ACB-65 e ACB-73) foram selecionados com base em seus bons resultados obtidos nos experimentos anteriores de controle da MPC em frutos pós-colheita. As bactérias foram cultivadas em um dispositivo montado utilizando tubos Falcon® de 50 mL com tampas e anel de alumínio com orifício central e septo de Teflon® (Figura 6), contendo 25 mL de meio TSB acrescido de ágar. O meio foi vertido por toda a parede dos tubos para maior crescimento dos isolados e, conseqüentemente, maior produção de compostos voláteis. Os dispositivos foram armazenados em estufa para BOD a 27 °C e fotoperíodo de 12 h durante 7 dias.



Figura 6. Dispositivo montado com tubos Falcon®, anel de alumínio com orifício central e septo de Teflon®.

A extração da fração volátil que constitui o *headspace* das amostras, contidas no dispositivo de extração, foi realizada aplicando microextração em fase sólida (SPME) (Figura 7).

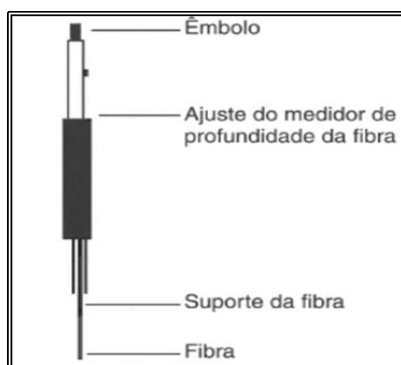


Figura 7. Dispositivo manual de SPME da SUPELCO.

Como os COV produzidos por *Bacillus* spp. são bem conhecidos e constituídos de diferentes classes de compostos (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e outros) e, dessa forma, consistem em metabólitos com polaridade variável, a extração destes foi realizada utilizando uma fibra de revestimento triplo, recobertas com polímero DVB/CAR/PDMS (Divilbenzeno/ Carboxeno/ Polidimetilsiloxano), com espessura de filme 50/30 μm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e foi condicionada a 250 ° C durante 1 h antes da utilização (EFFMERT *et al.*, 2012; HYNES *et al.*, 2007).

Os frascos das amostras foram fixados dentro de um banho termostático de água e colocados num agitador. As amostras foram equilibradas a 27 °C durante 30 min. A agulha foi utilizada para perfurar através do septo de Teflon® no dispositivo de extração e a fibra SPME foi exposta ao headspace das amostras, durante 1 hora. Os compostos orgânicos voláteis a partir de 25 mL de meio TSB semi-sólido foi usado como controle. Após extração, a fibra de SPME foi diretamente inserida no cromatógrafo a gás.

As fibras de SPME foram dessorvidas a 250 ° C durante 5 min na porta de injeção de GC-QMS-QP2010 (Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com uma coluna capilar HP-5MS (26 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,25 μm

de espessura) de 5% fenil - 95% polidimetilsiloxano (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). As amostras foram corridas por 41 min e as fibras foram condicionadas a 250 ° C durante 10 minutos antes de serem reutilizadas. O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio. A temperatura do forno inicial foi de 40 °C, mantida durante 3 min, rampa a 5 °C/min a 180 °C e em rampa a 10 °C/min a 250 ° C e mantida durante 3 min. A temperatura da linha de transferência e da fonte de íons foram de 260 e 200 °C, respectivamente. Os íons foram detectados no intervalo de 45-400 *m/z*. Para aquisição e análise dos cromatogramas obtidos por GC-QMS foi utilizado o *software* comercial GCMSolution versão 5.3. (Shimadzu, Tóquio, Japão). Os espectros de massa dos compostos desconhecidos foram comparados com aqueles nas Bibliotecas NIST08, NIST08s e FFNSC13.

3.8. Efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo e metabolismo secundário de *Bacillus* spp.

3.8.1. Seleção de isolados

Onze isolados de *Bacillus* spp. (ACB-08, ACB-12, ACB-13, ACB-15, ACB-63, ACB-64, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-83 e ACB-85) foram selecionados para análise de seus metabolismos e seus efeitos sobre o antagonismo frente ao fungo *P. citricarpa*, cultivados em diferentes meios. Tal escolha foi baseada nos resultados anteriormente relatados por Fujimoto & Kupper (2016). Buscou-se isolados que demonstraram os melhores níveis de controle do patógeno nos testes de cultivo pareado em meio BDA e por meio da ação de seus metabólitos livres de células e termoestáveis.

3.8.2. Efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo microbiano

Para estudar o efeito antagônico dos isolados de *Bacillus* spp. no crescimento micelial de *P. citricarpa*, foi utilizada a técnica de cultivo pareado em placa de Petri (DENNIS; WEBSTER, 1971).

Discos de colônias (5 mm de diâmetro) da bactéria e/ou do fitopatôgeno foram transferidos para placas de Petri contendo três meios diferentes (Tabela 2) a 3 cm de distância um do outro. Os controles foram representados pelos microrganismos (*Bacillus* spp. e *P. citricarpa*) cultivados sozinhos. A incubação das culturas se deu em estufa para B.O.D. a 26 °C sob fotoperíodo de 12h. A avaliação foi realizada após 10 dias de incubação, por meio de medições do crescimento micelial das colônias de *P. citricarpa* em dois sentidos perpendiculares. Foi realizado um experimento fatorial, com três repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias foi feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Meios de cultivo

Meio	Sigla	Composição
Batata dextrose ágar	BDA	4 g/L de extrato de batata, 20 g/L de dextrose; 15 g/L de ágar.
Cenoura dextrose ágar	CDA	200 g/L de cenoura; 20 g/L dextrose; 15 g/L ágar.
Citros ágar	CiA	28 g/L folhas de citros; 20 g/L dextrose; 15 g/L ágar.

3.8.3. Preparo das amostras para Cromatografia Líquida Acoplada com Espectrometria de Massas (LC-MS)

Após avaliação do teste de cultivo pareado em placas de Petri, as mesmas foram utilizadas para retirada de amostras para análise dos metabólitos difusíveis no meio de cultura.

Amostras de meio de cultura da zona de inibição (no cultivo pareado), ou da zona de cultivo do fungo ou da bactéria sozinhos (controles) foram colocadas em tubos Falcon® de 15 mL e foi adicionado 1 mL de acetato de etila. Os tubos foram colocados em banho ultrassônico por 1 h, para liberação dos metabólitos para o solvente. Posteriormente, o solvente juntamente com os metabólitos foi retirado e transferido para Eppendorfs, que foram deixados abertos dentro da

capela para evaporação, por aproximadamente 12 h. Após secagem foi adicionado 1 mL de metanol para dissolução dos extratos, filtrados em algodão e transferidos para os frascos que foram inseridos no cromatógrafo.

3.8.4. LC-MS

Para as análises de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) das amostras obtidas anteriormente, foi utilizada uma coluna C18 (Acquity – Waters) de 3 mm de diâmetro, 150 mm de comprimento e com 1,7 µm de tamanho de partícula. Como fase móvel foi utilizado um gradiente entre água e acetonitrila, que variou de 15% a 100% (v/v) de acetonitrila, num tempo de corrida de 20 min por amostra. A fase móvel foi filtrada e degaseificada por 20 min em banho de ultrassom antes de ser utilizada. A vazão foi de 0,3 mL/min e o volume injetado foi de 5 µL no método utilizado. As análises foram realizadas nos modos de ionização positivo e negativo, utilizando-se ionização por eletrospray, num espectrômetro triplo quadrupolo (Waters).

3.8.5. Efeito do cultivo de *Bacillus* spp. em meio líquido na produção de metabólitos

Para se verificar o perfil metabólico de *Bacillus* spp., quando cultivado em meio líquido, uma alçada de cada isolado bacteriano (24h de cultivo) foi transferida para 50 mL de caldo batata dextrose (200 g/L de batata, 20 g/L de dextrose) e mantidos sob agitação a 200 rpm por 3 dias. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 min e filtradas em membrana Millipore® de 0,22 µm. O sobrenadante obtido foi particionado com acetato de etila e, a partir da fase orgânica, foram retiradas alíquotas que foram evaporadas dentro da capela. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 1 mL de metanol e analisadas por LC-MS, como descrito no item 3.8.4.

4. RESULTADOS

4.1. Identificação de isolados de *Bacillus* por amplificação da região 16S rRNA

Os 32 isolados bacterianos utilizados neste trabalho para controle de *Phyllosticta citricarpa* foram identificados como *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*) e *B. methylotrophicus* por meio da amplificação da região 16S rRNA (Figura 8) e, posterior sequenciamento. As seqüências obtidas foram comparadas com a base de dados do NCBI e os resultados encontram-se detalhados na Tabela 3.

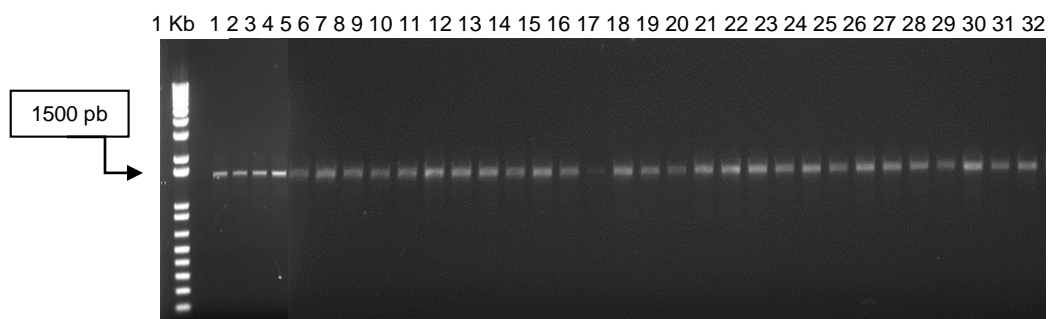


Figura 8. Gel de amplificação da região 16S rRNA de 32 isolados de *Bacillus* spp. 1 Kb- padrão de massa molecular.

Tabela 3. Espécies de *Bacillus* spp. identificadas por amplificação da região 16S rRNA.

Isolado	Espécie	Similaridade	Referência
ACB-08	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99%	KT324616.1*
ACB-12	<i>B. subtilis</i>	99%	KM091703.1
ACB-13	<i>B. subtilis</i>	99%	KC920666.1
ACB-15	<i>B. subtilis</i>	91%	KP184705.1
ACB-16	<i>B. methylotrophicus</i>	93%	HQ831397.1
ACB-18	<i>B. subtilis</i>	98%	KC686715.1
ACB-19	<i>B. amyloliquefaciens</i>	94%	KC441794.1
ACB-20	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%	KM527834.1
ACB-22	<i>B. subtilis</i>	99%	KX129849.1
ACB-24	<i>B. subtilis</i>	96%	KM884947.1
ACB-41	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%	KC441756.1
ACB-46	<i>B. subtilis</i>	97%	JN366775.1
ACB-47	<i>B. methylotrophicus</i>	97%	HQ831404.1
ACB-52	<i>B. amyloliquefaciens</i>	97%	KR045286.1
ACB-54	<i>B. methylotrophicus</i>	97%	KJ009469.1
ACB-56	<i>B. amyloliquefaciens</i>	96%	JN999859.1
ACB-58	<i>B. subtilis</i>	98%	KF135457.1
ACB-59	<i>B. amyloliquefaciens</i>	97%	KF158226.1
ACB-60	<i>B. methylotrophicus</i>	98%	KJ009400.1
ACB-63	<i>B. methylotrophicus</i>	95%	JQ023624.1
ACB-64	<i>B. methylotrophicus</i>	97%	KC790240.1
ACB-65	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%	JX475120.1
ACB-66	<i>B. methylotrophicus</i>	98%	HQ844451.1
ACB-67	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%	KU321524.1
ACB-68	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99%	GQ169782.1
ACB-69	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%	KC441756.1
ACB-70	<i>B. subtilis</i>	97%	KX129849.1
ACB-71	<i>B. amyloliquefaciens</i>	98%	JQ345706.1
ACB-73	<i>B. subtilis</i>	97%	KM884947.1
ACB-81	<i>B. amyloliquefaciens</i>	96%	KF811045.1
ACB-83	<i>B. subtilis</i>	97%	JQ308557.1
ACB-85	<i>B. subtilis</i>	94%	JF783990.1

* código de acesso ao GenBank

4.2. Efeito do meio de cultivo na produção de compostos voláteis por *Bacillus* spp.

Nos Ensaio 1 e 2 onde avaliou-se o efeito de cinco meios de cultivo na produção de COV por 27 isolados *Bacillus* spp., os meios TSA e TSB foram os que proporcionaram maior produção de metabólitos voláteis com efeito inibitório no desenvolvimento da colônia de *P. citricarpa* (Figura 9). No Ensaio 1, o meio TSA favoreceu a produção de voláteis pela bactéria, em quantidade suficiente para inibir o tamanho da colônia do fitopatógeno de 34 a 73%, enquanto que, o meio TSB apresentou valores de 24 a 65% (Tabela 4 e Figura 10). No Ensaio 2, os COV produzidos nos meios TSA e TSB apresentaram valores de inibições da colônia do fitopatógeno de 32 a 63% e de 22 a 63%, respectivamente (Tabela 5 e Figura 11). Quando comparado os dois ensaios, somente ACB-19, ACB-24, ACB-41 e ACB-54 não foram favorecidos pelos meios TSA e TSB quanto à produção de COV, e sim, pelos meios King B (ACB-19) e NA (ACB-24, ACB-41 e ACB-54). Embora os meios NA, BDA e KB tenham favorecido estatisticamente a produção de COV pela bactéria, os valores de inibições da colônia do fungo foram inferiores, quando comparados aos meios TSA e TSB e, em alguns casos, a produção de COV favoreceu o crescimento do patógeno (Figuras 10 e 11).

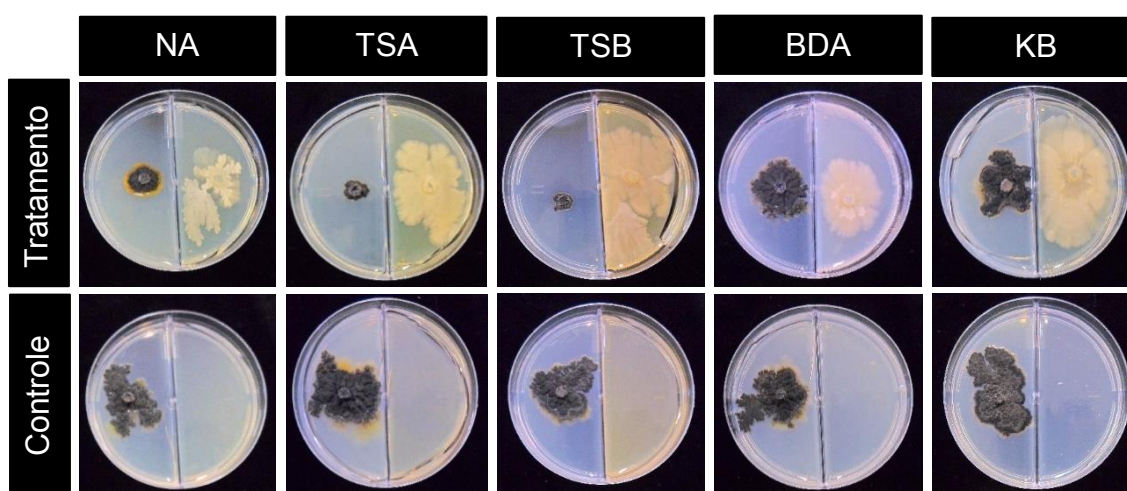


Figura 9. Influência de compostos orgânicos voláteis produzidos por *Bacillus* ACB-73 na colônia de *Phyllosticta citricarpa*, em diferentes meios de cultura (NA, TSA, TSB, BDA e KB).

Tabela 4. Efeito dos diferentes meios de cultura na produção de compostos voláteis de *Bacillus* spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54 e ACB-56), avaliado por meio da medição do tamanho da colônia de *Phyllosticta citricarpa* (cm). Ensaio 1.

Tratamento	Meios de cultivo				
	NA	TSA	TSB	BDA	KB
ACB-15	3,69 bB ⁽¹⁾	2,71 cC	3,21 cB	5,03 aA	2,56 dC
ACB-16	2,79 dB	1,58 dC	1,90 dC	3,79 bA	2,81 dB
ACB-18	3,26 cB	2,66 cB	3,01 cB	4,76 aA	3,16 cB
ACB-19	3,01 Cc	3,84 bB	3,95 bB	4,58 aA	2,89 dC
ACB-20	3,60 bB	2,91 cC	2,15 dD	4,86 aA	4,24 aA
ACB-22	3,46 bB	2,63 cC	2,76 cC	4,55 aA	3,30 cB
ACB-24	3,15 cB	3,31 bB	4,15 bA	4,38 aA	3,60 bB
ACB-41	2,41 dB	3,20 bA	3,45 cA	3,94 bA	3,64 bA
ACB-46	3,26 cB	2,14 dC	3,45 cB	4,66 aA	3,25 cB
ACB-47	3,55 bA	2,54 cB	1,94 dB	3,48 bA	2,40 dB
ACB-52	3,20 cB	1,80 dD	2,63 cC	4,31 aA	2,43 dC
ACB-54	2,51 dB	2,71 cB	3,08 cA	3,61 bA	2,59 dB
ACB-56	4,58 aA	3,03 cB	3,45 cB	4,39 aA	3,74 bB
Controle	4,01 bB	5,83 aA	5,47 aA	4,28 aB	4,58 aB

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

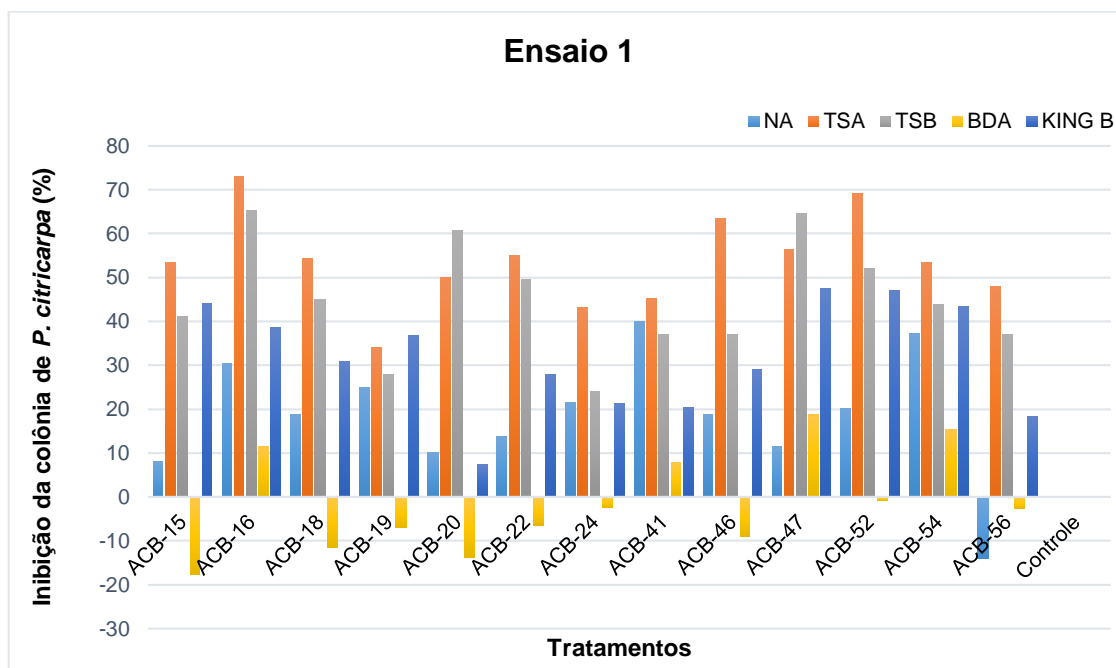


Figura 10. Inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa*, quando submetida à ação de compostos voláteis produzidos pelos *Bacillus* spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54 e ACB-56), em diferentes meios de cultura (NA, TSA, TSB, BDA e King B). Ensaio 1.

Tabela 5. Efeito dos diferentes meios de cultura na produção de compostos voláteis por *Bacillus* spp. (ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81, avaliado por meio da medição do tamanho da colônia de *Phyllosticta citricarpa* (cm). Ensaio 2.

Tratamentos	Meios de cultura				
	NA	TSA	TSB	BDA	KB
ACB-58	3,51 bA ⁽¹⁾	2,10 bB	1,36 dC	3,19 aA	3,24 bA
ACB-59	4,10 aA	2,29 bC	1,34 dD	3,01 bB	3,24 bB
ACB-60	2,89 cB	2,21 bB	2,81 bB	2,59 bB	3,81 aA
ACB-63	3,15 bB	2,41 bC	1,89 cC	2,61 bC	4,50 aA
ACB-64	2,95 cB	2,44 bB	2,23 cB	2,69 bB	3,98 aA
ACB-65	2,83 cB	3,50 aA	1,90 cC	2,31bC	3,79 aA
ACB-66	2,66 cB	2,05 bB	2,35 cB	2,46 bB	3,44 bA
ACB-67	2,03 dB	2,49 bB	1,96 cB	3,98 aA	3,89 aA
ACB-68	3,30 bB	2,20 bC	1,83 cC	4,06 aA	2,90 bB
ACB-69	2,01 dB	1,35 cC	2,25 cB	3,73 aA	3,90 aA
ACB-70	3,01 cA	2,35 bB	2,15 cB	2,58 bB	3,50 bA
ACB-71	4,43 aA	1,91 bC	1,33 dC	2,74 bB	2,70 bB
ACB-73	2,15 dB	1,59 cB	1,34 dB	3,46 aA	3,24 bA
ACB-81	2,45 dB	1,98 bB	2,85 bB	2,80 bB	4,53 aA
Controle	3,26 bA	3,65 aA	3,63 aA	3,36 aA	3,94 aA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

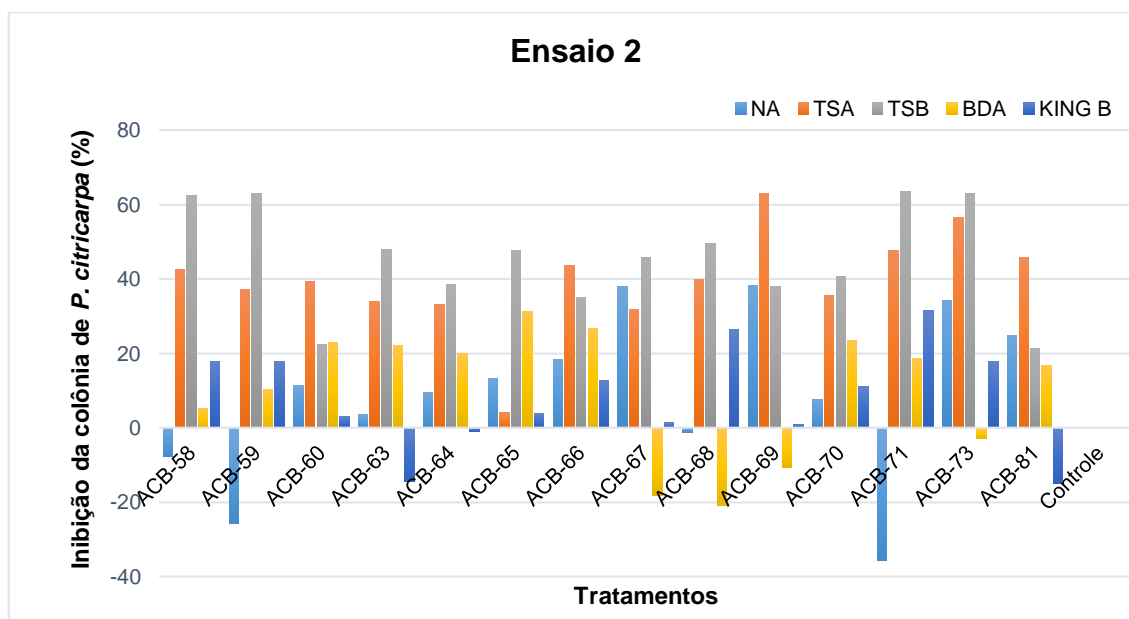


Figura 11. Inibição da colônia de *Phyllosticta citricarpa*, quando submetida à ação de compostos voláteis produzidos pelos *Bacillus* spp. (ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81), em diferentes meios de cultivo (NA, TSA, TSB, BDA e King B). Ensaio 2.

4.3. Efeito dos compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. na evolução de lesões do tipo mancha sardenta para mancha dura, em frutos de laranja

Os resultados sobre o efeito dos compostos voláteis produzidos por *Bacillus* spp. quanto à evolução do sintoma, de mancha sardenta para mancha dura, em frutos de laranja encontram-se nas Tabelas 6 e 7 e Figuras 12 e 13.

Ao longo das avaliações, observou-se um aumento nas porcentagens de manchas sardentas que evoluíram para manchas duras, porém, esta evolução foi maior nos frutos não tratados, sendo que todos os isolados de *Bacillus* spp. testados foram capazes de produzir compostos voláteis que inibiram a evolução das manchas ao final dos 21 dias de avaliação (Ensaio 1, Figura 12) e ao final dos 31 dias de avaliação (Ensaio 2, Figura 13).

Os melhores tratamentos foram utilizando o isolado ACB-60 (0h), que apresentou uma inibição média da evolução de 89,83%, quando se considera o valor das três avaliações (7, 14 e 21 dias), seguido do isolado ACB-65 (24 h), que proporcionou uma inibição média das três avaliações de 71,25% (Figura 12).

Já no segundo ensaio, foi avaliado o efeito dos compostos voláteis a partir de seis isolados de *Bacillus* spp. (ACB-46, ACB-60, ACB-65, ACB-69, ACB-71 e ACB-73) na evolução da mancha sardenta para mancha dura de MPC em frutos pós-colheita. Todos os tratamentos foram efetivos em inibir a evolução da mancha sardenta para mancha dura, com valores de inibições de 57% a 86,5% (Figura 13). Os melhores resultados foram utilizando os isolados ACB-65, com inibição média de 86,51% e o ACB-73, com inibição média de 86,48%, cultivados em meio TSB com 0h de idade (Figura 13). Os frutos provenientes desses tratamentos foram posteriormente submetidos à microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 6. Porcentagem de manchas sardentas que evoluíram para manchas duras, sob efeito dos compostos voláteis de *Bacillus* spp. Ensaio 1.

Tratamentos	Avaliações		
	7 dias	14 dias	21 dias
ACB15-24h ⁽¹⁾	29,48 aA ⁽²⁾	29,48 aA	40,87 bA
ACB15-0h	30,00 aB	30,00 aB	46,67 bA
ACB16-24h	16,67 bB	25,00 aB	40,61 bA
ACB16-0h	33,61 aA	45,21 aA	48,24 bA
ACB18-24h	12,03 bB	13,70 bB	36,89 bA
ACB18-0h	13,92 bA	19,21 bA	28,13 cA
ACB19-24h	21,67 aA	28,33 aA	33,33 bA
ACB19-0h	21,67 aB	21,67 bB	36,15 bA
ACB20-24h	30,00 aA	35,00 aA	36,10 bA
ACB20-0h	23,33 aA	30,00 aA	30,00 cA
ACB22-24h	17,22 bA	27,60 aA	33,04 bA
ACB22-0h	32,22 aA	36,91 aA	36,91 bA
ACB24-24h	17,50 bB	31,25 aA	37,08 bA
ACB24-0h	21,67 aA	28,33 aA	38,33 bA
ACB41-24h	26,67 aA	28,33 aA	36,47 bA
ACB41-0h	20,00 aA	21,67 bA	24,51 cA
ACB46-24h	15,00 bB	22,27 bB	32,12 bA
ACB46-0h	10,00 bA	16,67 bA	22,10 cA
ACB47-24h	18,33 bA	21,67 bA	23,67 cA
ACB47-0h	24,16 aA	31,21 aA	40,78 bA
ACB52-24h	15,00 bB	26,28 aB	42,78 bA
ACB52-0h	22,55 aA	29,21 aA	34,51 bA
ACB54-24h	19,60 aB	30,54 aA	40,17 bA
ACB54-0h	13,70 bB	27,58 aA	30,92 cA
ACB56-24h	22,14 aB	21,06 bB	37,12 bA
ACB56-0h	13,33 bB	13,33 bB	28,00 cA
ACB58-24h	15,88 bB	26,21 aA	34,49 bA
ACB58-0h	23,33 aB	27,21 aB	41,09 bA
ACB59-24h	19,76 aA	30,09 aA	32,95 bA
ACB59-0h	20,00 aB	25,00 aB	40,00 bA
ACB60-24h	09,05 bB	22,85 bA	22,86 cA
ACB60-0h	01,75 bA	05,09 bA	06,84 cA
ACB63-24h	28,33 aA	37,81 aA	43,76 bA
ACB63-0h	21,67 aA	27,77 aA	33,88 bA
ACB64-24h	10,00 bB	19,15 bB	30,36 cA
ACB64-0h	15,00 bA	18,33 bA	25,73 cA
ACB65-24h	08,33 bA	11,45 bA	17,16 cA
ACB65-0h	16,84 bA	25,43 aA	25,43 cA
ACB66-24h	25,00 aA	30,92 aA	37,75 bA
ACB66-0h	26,67 aA	32,27 aA	41,67 bA
ACB67-24h	20,00 aA	28,33 aA	34,78 bA
ACB67-0h	20,00 aA	31,67 aA	31,67 bA

ACB68-24h	20,00 aA	23,33 bA	28,13 cA
ACB68-0h	21,67 aA	24,67 aA	31,45 bA
ACB69-24h	16,67 bA	18,33 bA	23,33 cA
ACB69-0h	16,67 bA	18,33 bA	21,67 cA
ACB70-24h	20,00 aA	23,67 bA	32,00 bA
ACB70-0h	21,67 aA	30,00 aA	30,00 cA
ACB71-24h	16,84 bA	16,84 bA	25,33 cA
ACB71-0h	19,48 aB	24,48 aB	37,82 bA
ACB73-24h	10,88 bA	20,00 bA	25,00 cA
ACB73-0h	20,00 aA	20,00 bA	25,00 cA
ACB81-24h	28,13 aA	28,13 aA	34,00 bA
ACB81-0h	17,55 bA	24,80 aA	26,67 cA
Controle	29,00 aB	34,00 aB	72,00 aA

⁽¹⁾ Os isolados bacterianos foram utilizados no Ensaio imediatamente após a repicagem (0h) ou, 24h depois. ⁽²⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

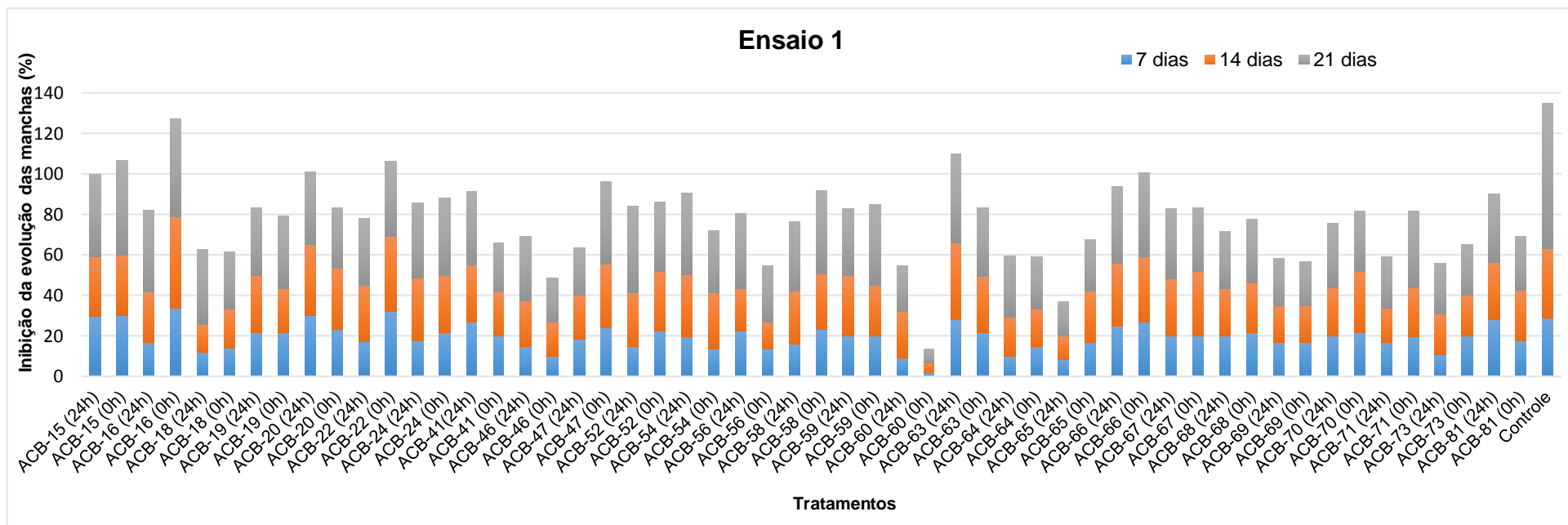


Figura 12. Efeito dos compostos voláteis de 27 isolados de *Bacillus* spp. (ACB-15, ACB-16, ACB-18, ACB-19, ACB-20, ACB-22, ACB-24, ACB-41, ACB-46, ACB-47, ACB-52, ACB-54, ACB-56, ACB-58, ACB-59, ACB-60, ACB-63, ACB-64, ACB-65, ACB-66, ACB-67, ACB-68, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-73 e ACB-81), com 24h e 0h de cultivo em meio BDA, sobre a evolução de lesões de mancha sardenta para mancha dura. Foram realizadas três avaliações, num total de 21 dias.

Tabela 7. Porcentagem de evolução da mancha sardenta para mancha dura sob efeito dos compostos voláteis de *Bacillus* spp. Ensaio 2.

Tratamentos	Avaliações			
	7 dias	14 dias	21 dias	31 dias
Controle TSA	43,68 bA ⁽¹⁾	49,13 bA	52,78 bA	56,29 bA
(ACB46+TSA)-24h ⁽²⁾	15,00 cA	21,67 cA	23,33 cA	23,33 cA
(ACB46+TSA)-0h	16,67 cA	23,33 cA	22,04 cA	23,71 cA
(ACB60+TSA)-24h	08,33 cB	15,00 cB	23,33 cA	25,00 cA
(ACB60+TSA)-0h	05,00 cA	08,63 cA	10,59 dA	15,59 cA
(ACB69+TSA)-24h	06,67 cA	13,33 cA	18,33 dA	21,67 cA
(ACB69+TSA)-0h	06,67 cA	13,51 cA	14,07 dA	20,99 cA
Controle TSB	66,67 aA	68,53 aA	73,53 aA	78,82 aA
(ACB65+TSB)-24h	06,67 cA	08,42 cA	15,26 dA	18,60 cA
(ACB65+TSB)-0h	01,67 cA	10,00 cA	10,00 dA	18,33 cA
(ACB71+TSB)-24h	05,30 cB	14,51 cB	23,59 cA	23,59 cA
(ACB71+TSB)-0h	13,33 cA	16,67 cA	20,00 cA	21,67 cA
(ACB73+TSB)-24h	10,00 cA	13,33 cA	15,00 dA	16,67 cA
(ACB73+TSB)-0h	05,00 cA	05,00 cA	13,33 dA	16,67 cA
Controle BDA	50,00 bA	50,00 bA	55,00 bA	61,86 bA
(ACB46+BDA)-24h	05,00 cA	10,17 cA	13,71 dA	15,37 cA
(ACB46+BDA)-0h	01,67 cB	11,67 cA	15,26 dA	16,93 cA
(ACB60+BDA)-24h	08,33 cB	18,33 cA	21,67 cA	25,00 cA
(ACB60+BDA)-0h	03,33 cB	15,00 cA	15,59 dA	18,29 cA
(ACB69+BDA)-24h	15,00 cA	16,67 cA	21,67 cA	29,51 cA
(ACB69+BDA)-0h	06,83 cB	16,14 cB	23,87 cA	30,19 cA
(ACB65+BDA)-24h	03,33 cB	10,00 cB	22,00 cA	22,00 cA
(ACB65+BDA)-0h	03,33 cB	05,00 cB	16,67 dA	17,88 cA
(ACB71+BDA)-24h	10,00 cB	13,97 cB	24,51 cA	27,08 cA
(ACB71+BDA)-0h	03,33 cB	06,67 cB	26,76 cA	25,76 cA
(ACB73+BDA)-24h	11,67 cB	21,67 cA	27,41 cA	27,41 cA
(ACB73+BDA)-0h	09,17 cB	20,83 cA	27,08 cA	32,92 cA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. ⁽²⁾ Os isolados bacterianos foram cultivados em meio BDA e TSA ou TSB e utilizados no Ensaio imediatamente após a repicagem (0h) ou, 24h depois.

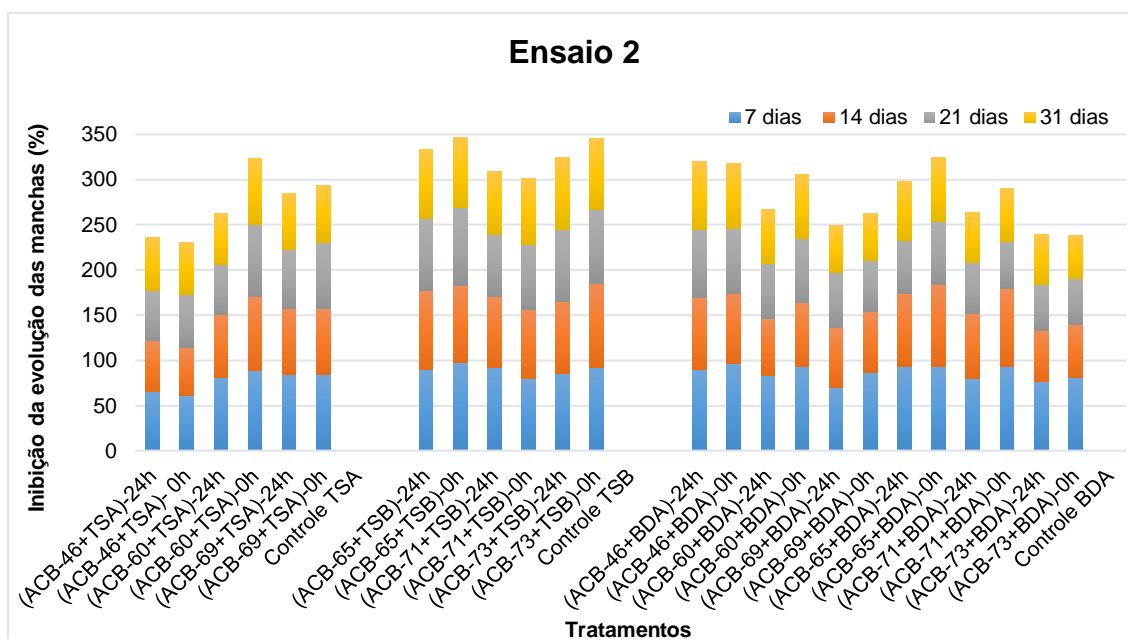


Figura 13. Inibição da evolução dos sintomas de mancha sardenta para mancha dura, após os frutos serem submetidos aos compostos voláteis produzidos por isolados de *Bacillus* spp. (ACB-46, ACB-60, ACB-65, ACB-69, ACB-71 e ACB-73). Os isolados bacterianos foram cultivados em meio BDA e TSA ou TSB e utilizados no ensaio imediatamente após a repicagem (0h) ou 24h depois.

4.4. Compostos fenólicos e atividades enzimáticas

Amostras de tecido foram obtidas de frutos após o tratamento com compostos orgânicos voláteis de *Bacillus* spp., para avaliar a produção de fenóis e enzimas indicativas de indução de resistência.

A produção de compostos fenólicos não mostrou alteração em relação aos tratamentos amostrados, quando comparados com os valores apresentados por seus controles (Figura 14).

De um modo geral, as análises mostraram alta atividade das enzimas polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD), na maioria dos tratamentos e seus controles. O único tratamento que apresentou diminuição de atividade de PPO, quando comparado com seu controle, foi o tratamento ACB-73+TSB (Figuras 15 e 16). Com relação à enzima fenilalanina amônia liase, verificou-se que não houve diferença significativa quanto à sua atividade em nenhum dos tratamentos e seus controles (Figura 17).

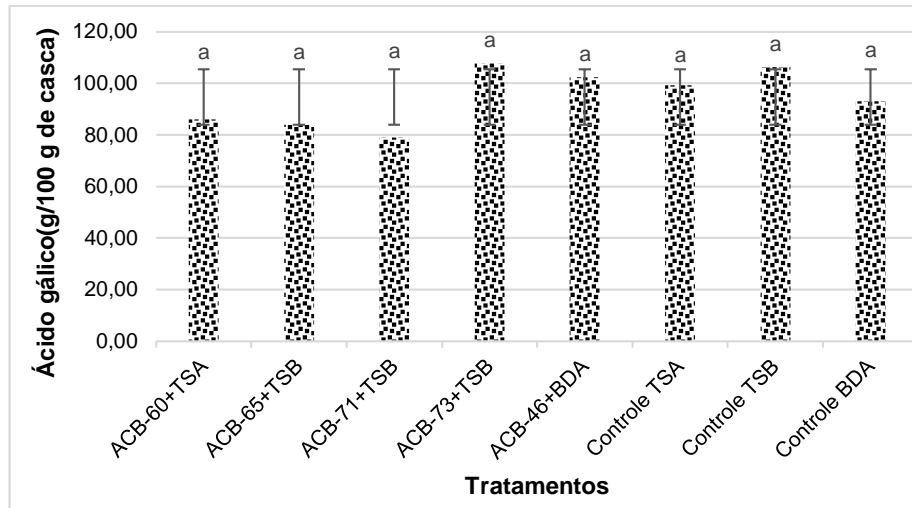


Figura 14. Produção de compostos fenólicos avaliada por meio da formação de ácido gálico (g/100 g de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp. cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

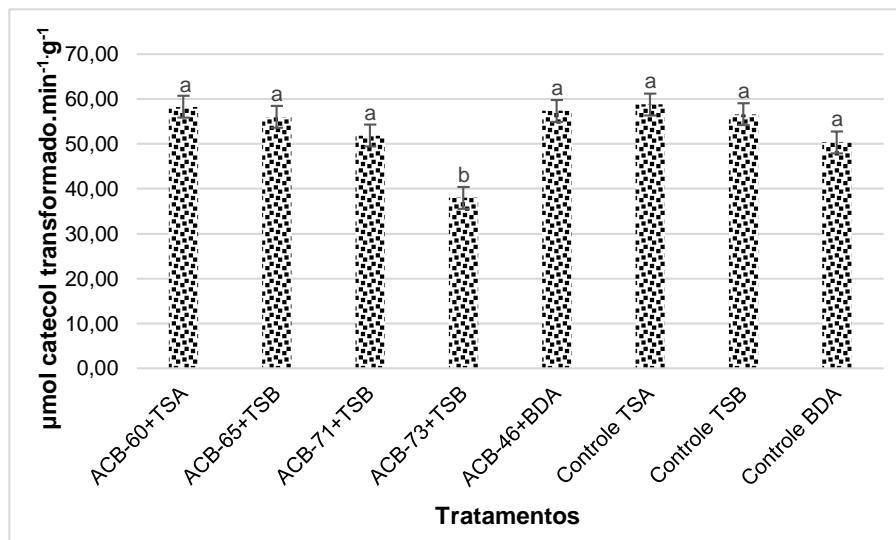


Figura 15. Atividade da enzima polifenoloxidase avaliada por meio da transformação de catecol ($\mu\text{mol catecol transformado}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp., cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

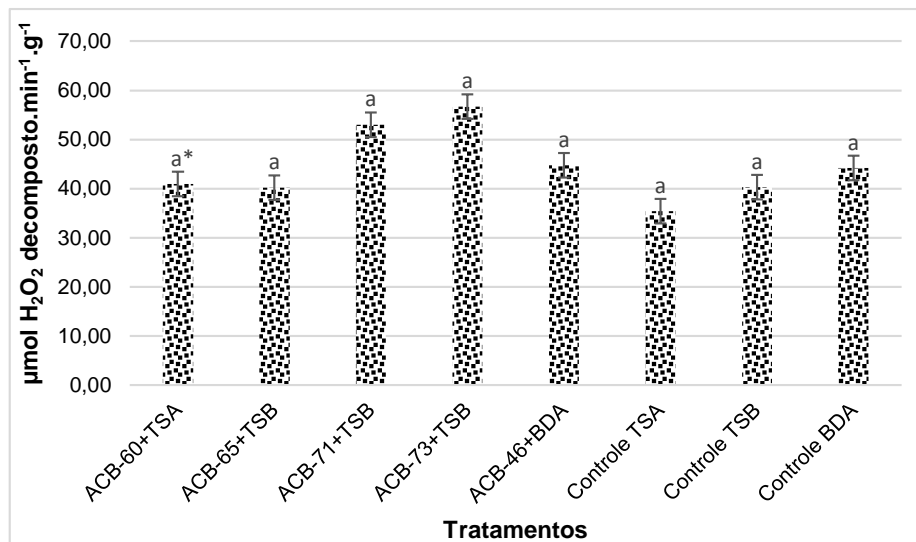


Figura 16. Atividade da enzima peroxidase avaliada por meio da decomposição de H₂O₂ (μmol H₂O₂ decomposto.min⁻¹.g⁻¹ de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp. cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

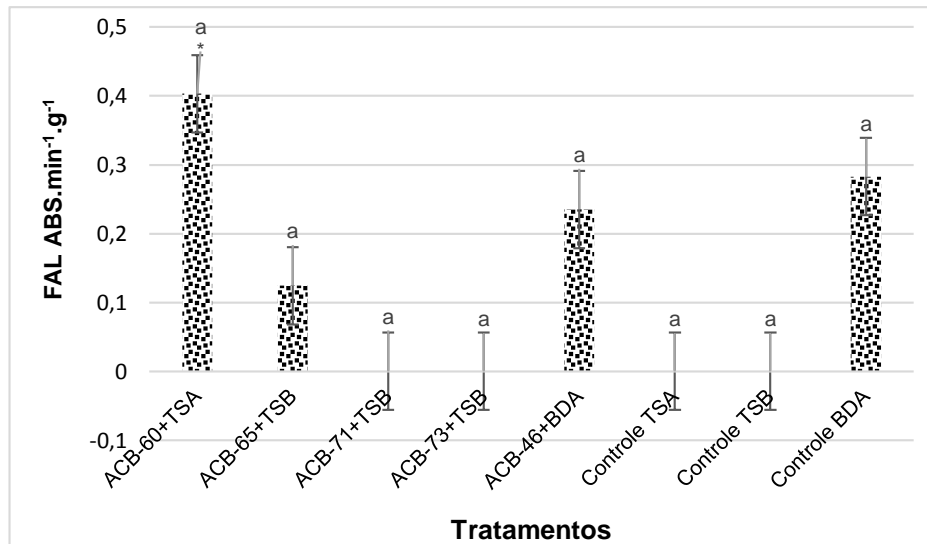


Figura 17. Atividade da enzima fenilalanina amônia liase avaliada por meio da decomposição de fenilalanina (FAL ABS.min⁻¹.g⁻¹ de casca) a partir de amostras de frutos de laranja tratados com voláteis de *Bacillus* spp. cultivados em diferentes meios (TSA, TSB ou BDA). (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.5. Efeito dos compostos voláteis de *Bacillus* spp. na morfologia de hifas e conídios de *Phyllosticta citricarpa* em frutos pós-colheita

Utilizando a microscopia eletrônica de varredura observou-se a ocorrência de alterações na morfologia de hifas e conídios do fungo *P. citricarpa* em frutos pós-colheita, após o tratamento destes com os voláteis produzidos por *Bacillus* spp. (Figura 18).

As imagens obtidas demonstraram que as lesões da MPC nos frutos controle foram mais proeminentes (Figura 18A) e bem mais profundas (Figura 18D) do que aquelas encontradas em frutos tratados e as hifas de *P. citricarpa* apresentavam-se uniformemente tubulares e íntegras (Figura 18B). Nos frutos tratados com os metabólitos voláteis de *Bacillus* spp. ACB-65 e ACB-73, as lesões da MPC foram mais superficiais (Figura 18E e 18I) e as hifas do patógeno apresentavam-se deformadas (Figura 18F, 18J, 18K e 18L). É importante mencionar que nos frutos tratados com os voláteis produzidos pelo ACB65, haviam esporos do fungo rompidos, deformados (Figura 18G) e enrugados (Figura 18H).

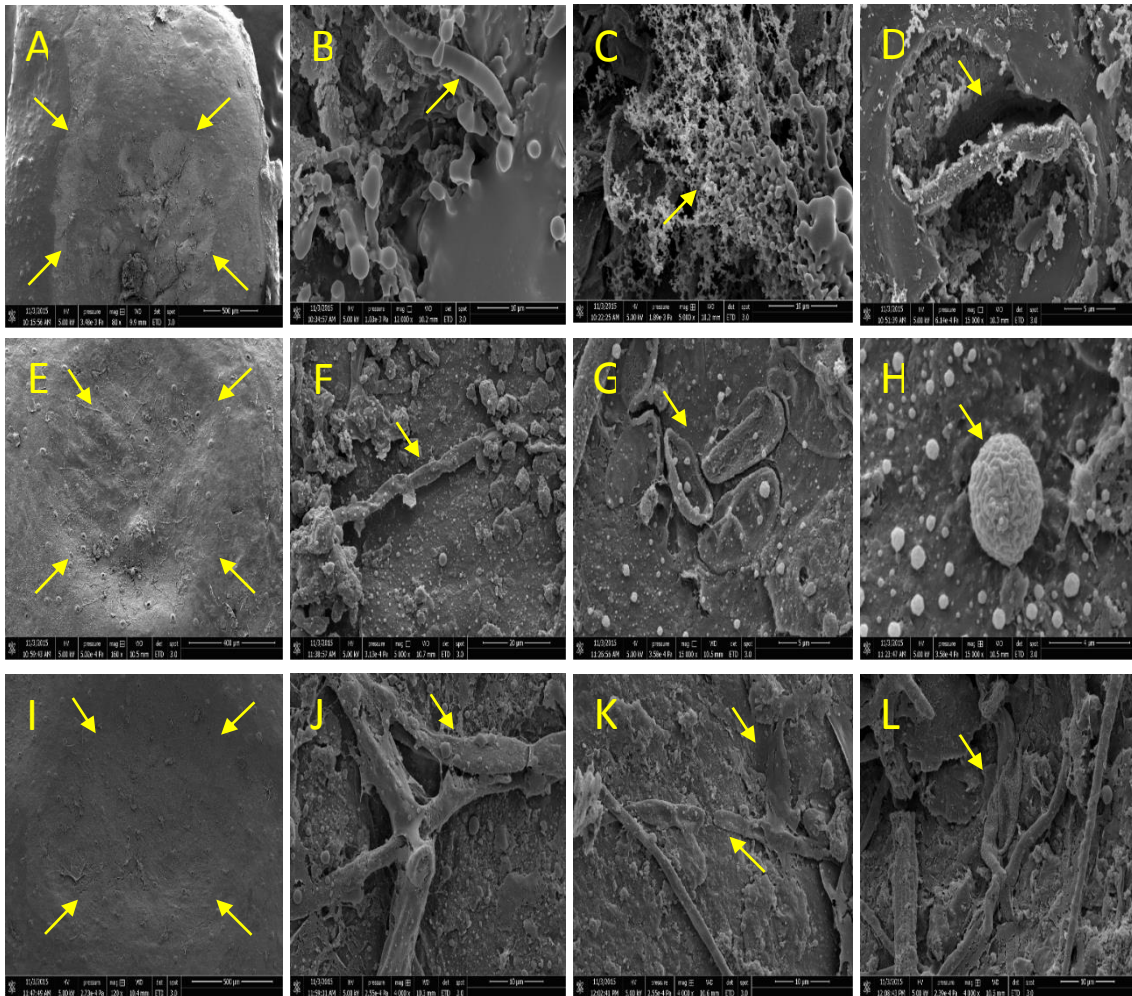


Figura 18. Elétron-micrografias de varredura de lesões da mancha preta dos citros (MPC) em frutos de laranja. A – D: fruto controle (A- lesão da MPC; B- hifas de *Phyllosticta citricarpa* uniformemente tubulares e íntegras; C- emaranhado de conídios de *P. citricarpa*; D- lesão de MPC), E – H: fruto tratado com metabólitos voláteis do isolado *Bacillus amyloliquefaciens* ACB-65 (E- lesão da MPC; F- hifa de *P. citricarpa* achatada; G- conídios fúngicos deformados; H- conídio de *P. citricarpa* enrugado), I – L: fruto tratado com metabólitos voláteis do isolado *Bacillus subtilis* ACB-73 (I- lesão da MPC; J- K e L- hifas do fitopatógeno deformadas).

4.6. Análise dos metabólitos voláteis de *Bacillus* spp. por GC-MS

A fração volátil dos metabólitos de isolados de *Bacillus* (ACB-65 e ACB-73) foi extraída utilizando SPME e posteriormente submetida à análise por GC-MS para identificação dos metabólitos voláteis produzidos. De acordo com os cromatogramas gerados (Figura 19) nota-se um perfil metabólico semelhante entre os isolados testados.

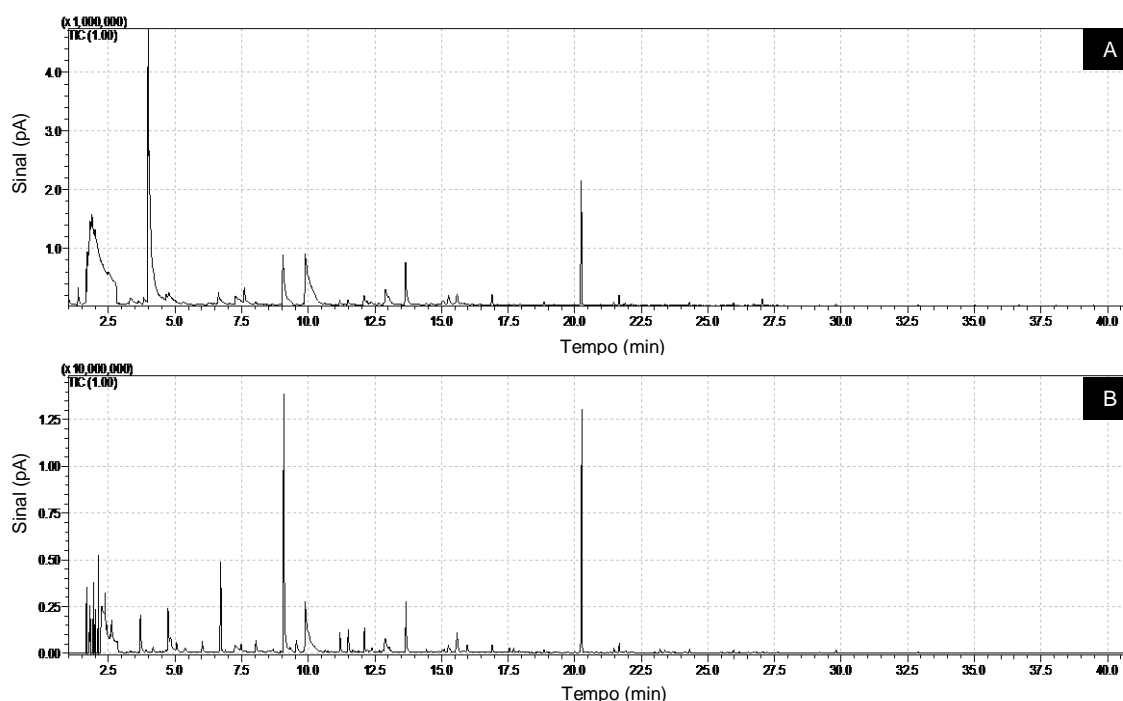


Figura 19. Cromatogramas de íons totais obtidos por GC-MS a partir de compostos orgânicos voláteis de (A) *Bacillus amyloliquefaciens* ACB-65 e (B) *Bacillus subtilis* ACB-73 cultivados em meio TSB. Condições de extração: 1h de extração a 27 °C com fibra DVB/CAR/PDMS. Condições cromatográficas: coluna HP-5MS (26 m x 0,25 mm x 0,25 µm), H₂ (1 mL/min), temperatura do injetor 250 °C, programação de temperatura 40 °C a 180 °C (5 °C/min); 180 °C a 250 °C (10 °C/min).

Analisando os espectros de massas obtidos a partir de cada pico (Figuras 19 a 50), constatou-se a presença de doze álcoois, nove cetonas, quatro aminas, três éteres, dois aldeídos e um ácido carboxílico (Tabela 8).

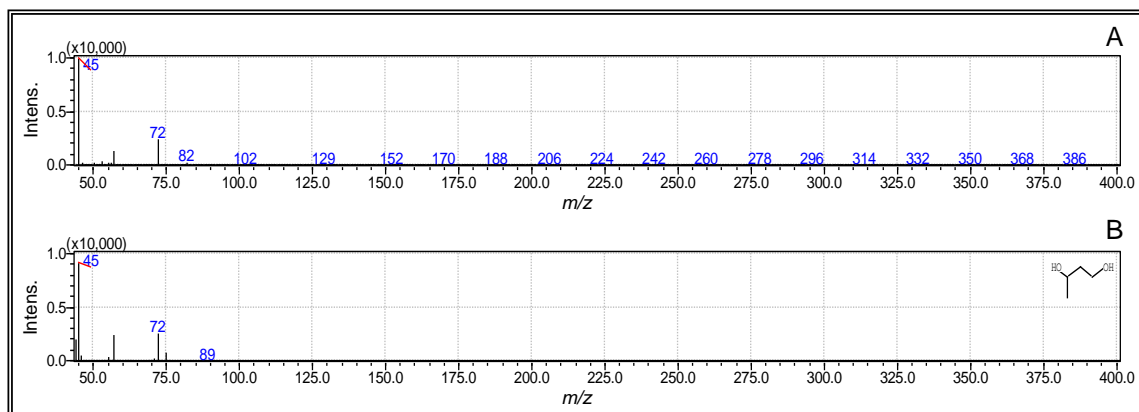


Figura 20. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 2,60 min e (B) – espectro do composto 1,3-butanodiol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.

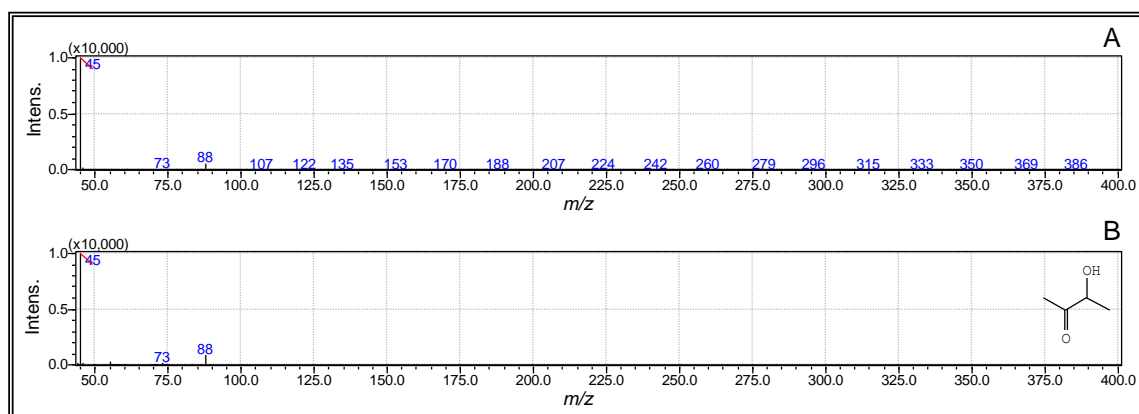


Figura 21. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,00 min e (B) – espectro do composto 3-hidroxi-2-butanona, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 96% de similaridade com o obtido experimentalmente.

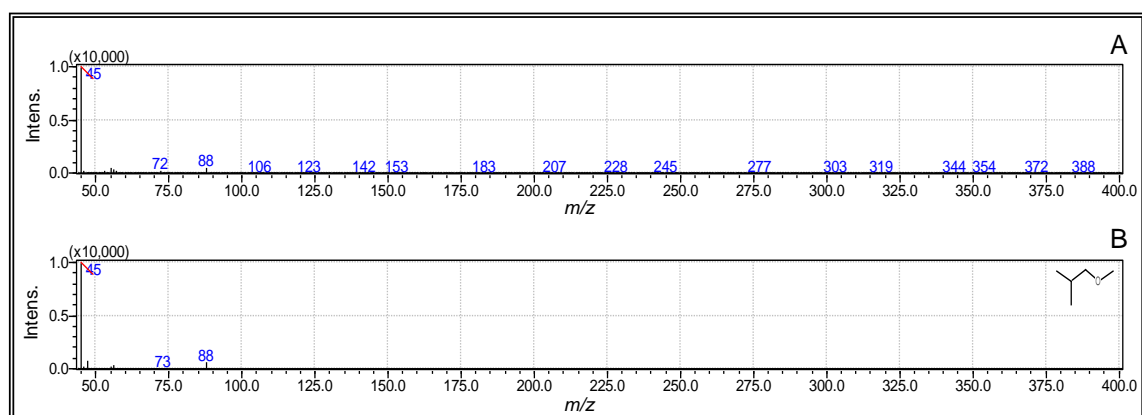


Figura 22. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,00 min e (B) – espectro do composto 1-metoxi-2-metilpropano, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 90% de similaridade com o obtido experimentalmente.

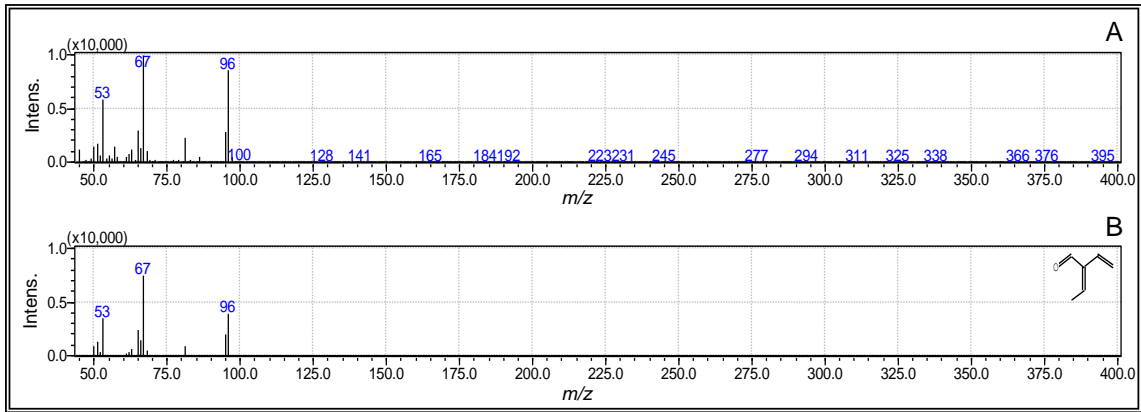


Figura 23. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,19 min e (B) – espectro do composto 2-vinil-2-butenal, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 87% de similaridade com o obtido experimentalmente.

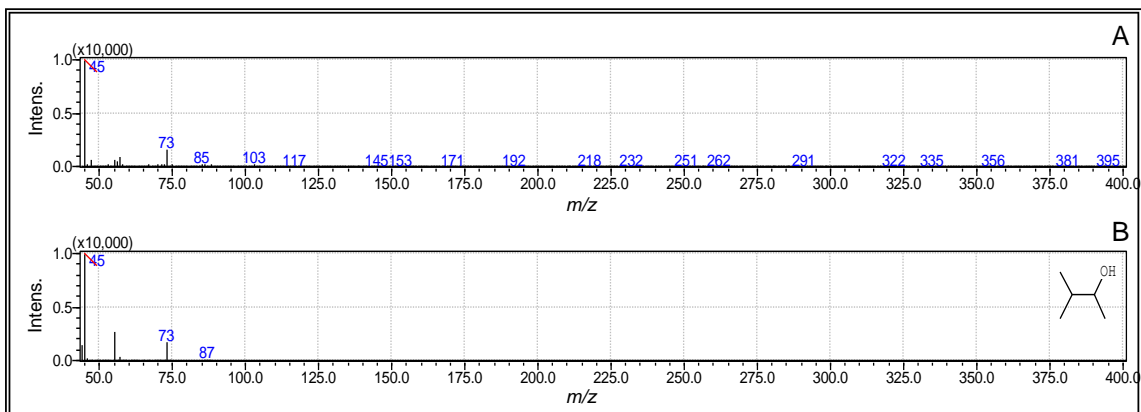


Figura 24. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,56 min e (B) – espectro do composto 3-metil-2-butanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 86% de similaridade com o obtido experimentalmente.

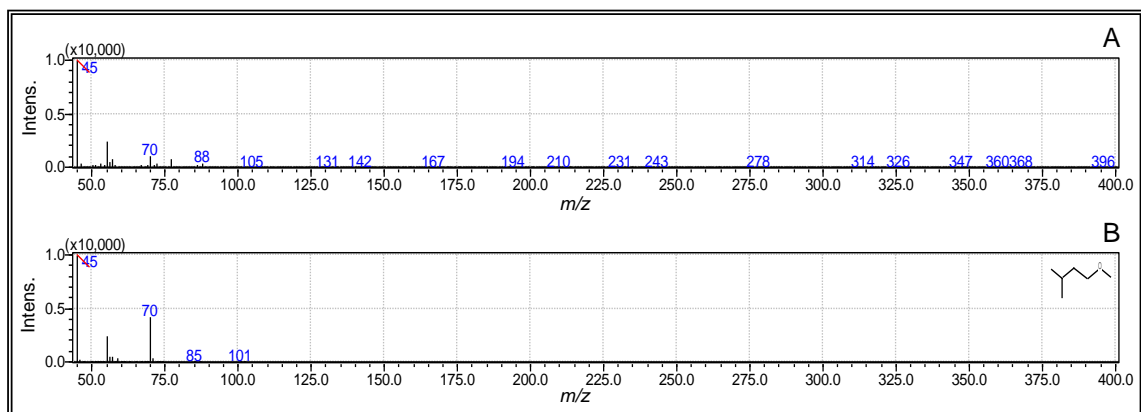


Figura 25. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,62 min e (B) – espectro do composto 1-metoxi-3-metilbutano, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 85% de similaridade com o obtido experimentalmente.

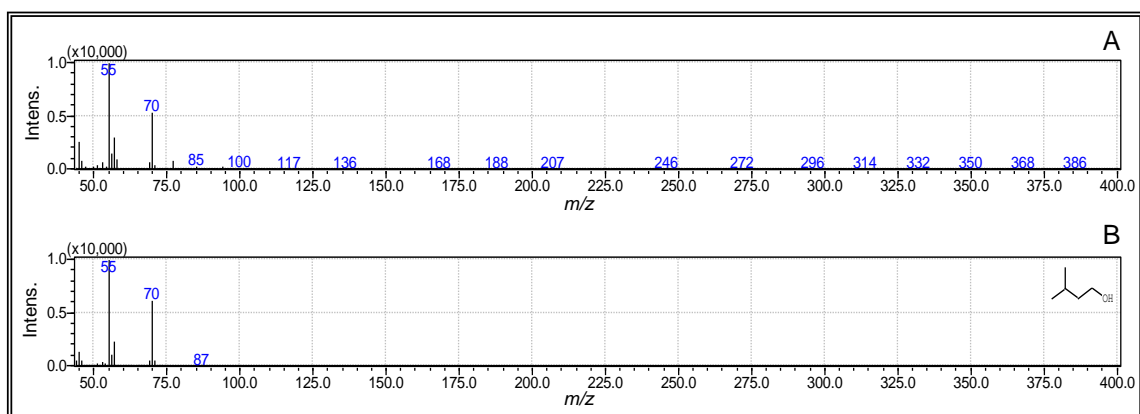


Figura 26. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 4,74 min e (B) – espectro do composto 3-metil-1-butanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 91% de similaridade com o obtido experimentalmente.

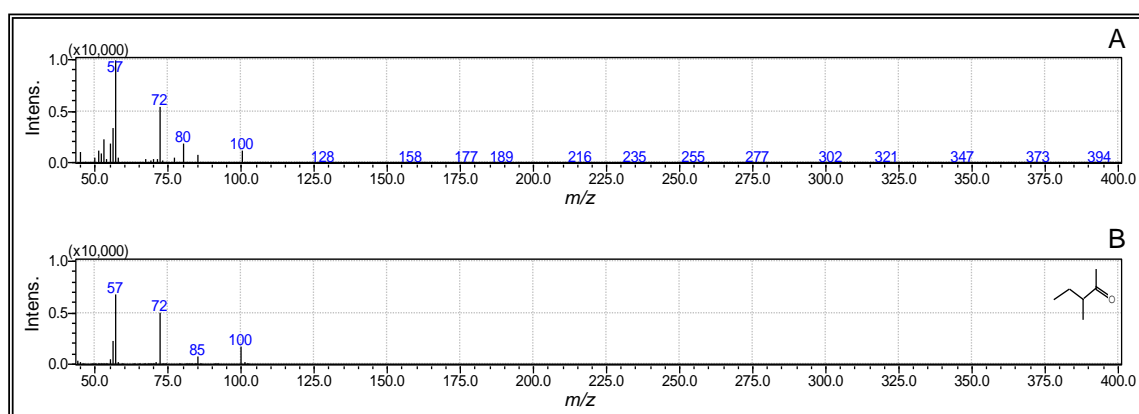


Figura 27. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 5,05 min e (B) – espectro do composto 3-metil-2-pentanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 86% de similaridade com o obtido experimentalmente.

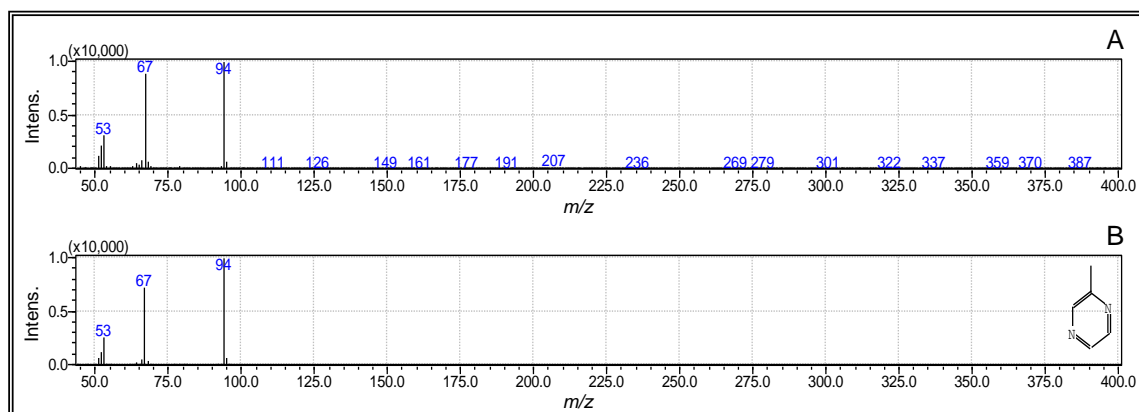


Figura 28. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 7,37 min e (B) – espectro do composto metil-pirazina, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.

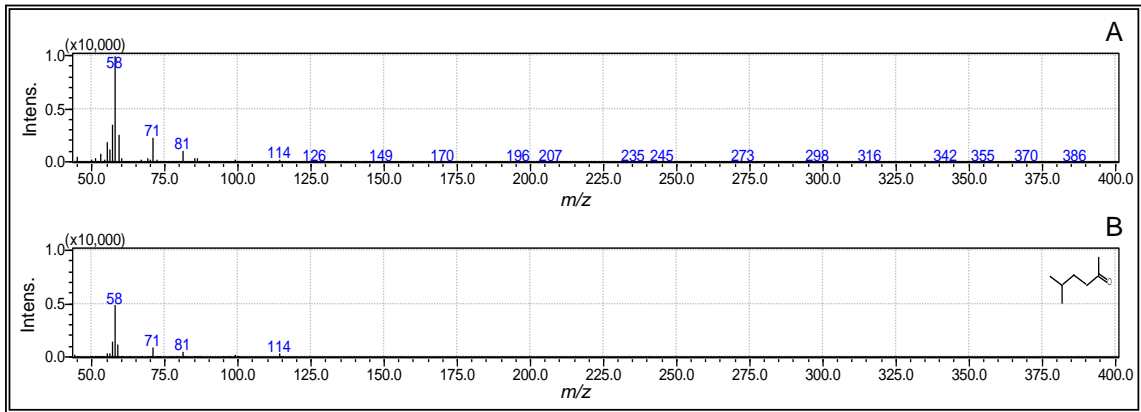


Figura 29. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 8,04 min e (B) – espectro do composto 5-metil-2-hexanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.

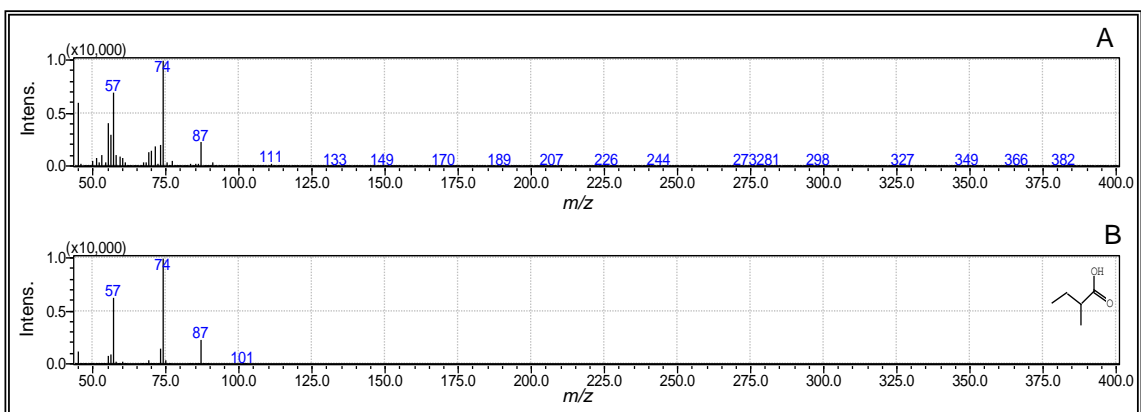


Figura 30. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 8,61 min e (B) – espectro do composto ácido-2-metil-butanóico, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 81% de similaridade com o obtido experimentalmente.

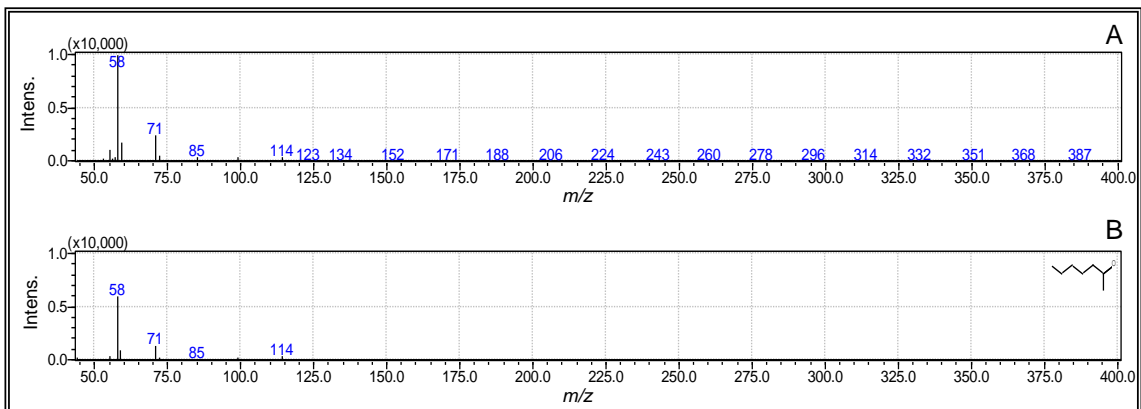


Figura 31. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 9,20 min e (B) – espectro do composto 2-heptanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 95% de similaridade com o obtido experimentalmente.

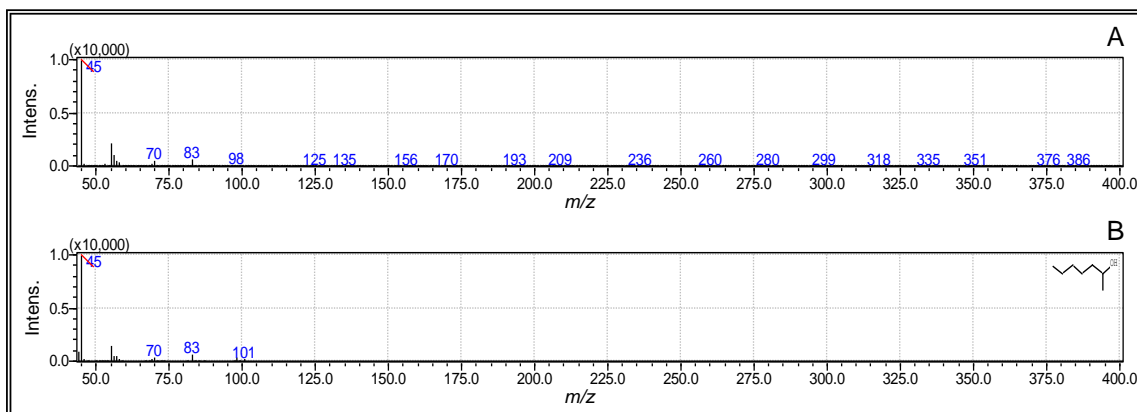


Figura 32. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 9,57 min e (B) – espectro do composto 2-heptanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 96% de similaridade com o obtido experimentalmente.

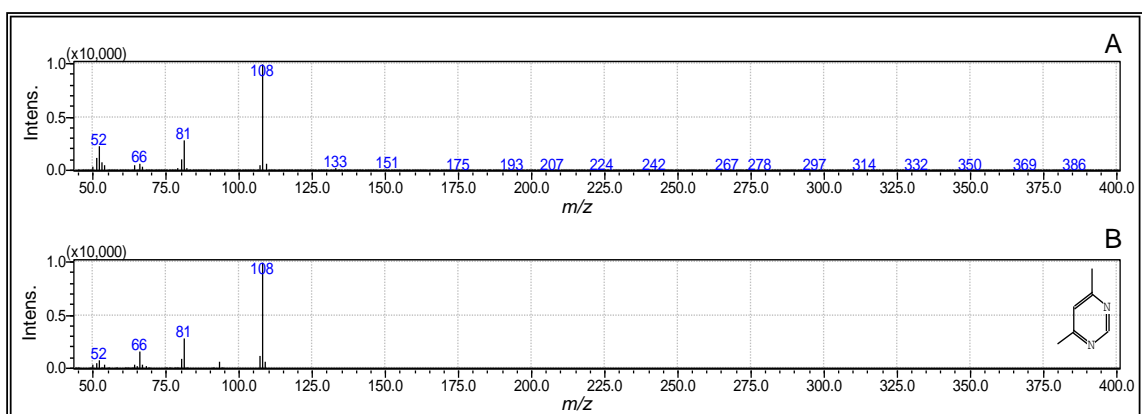


Figura 33. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 10,08 min e (B) – espectro do composto 4,6-dimetil-pirimidina, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.

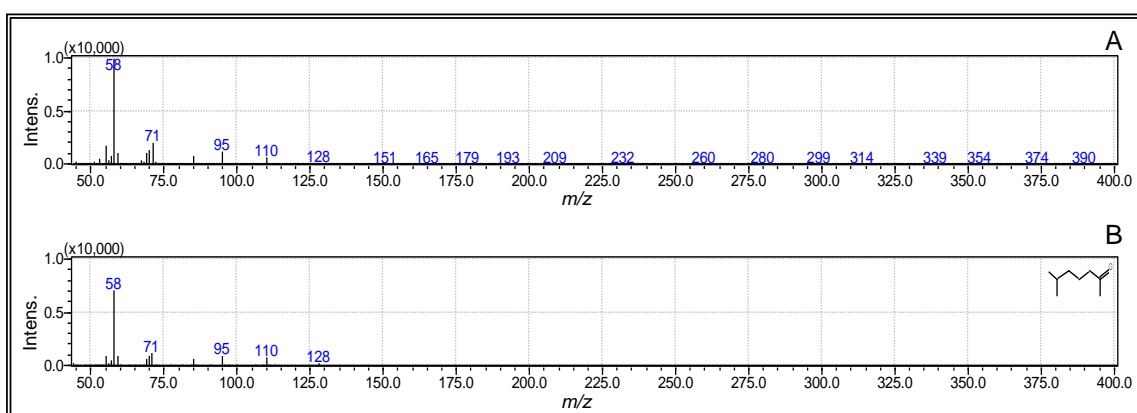


Figura 34. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 11,19 min e (B) – espectro do composto 6-metil-2-heptanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 95% de similaridade com o obtido experimentalmente.

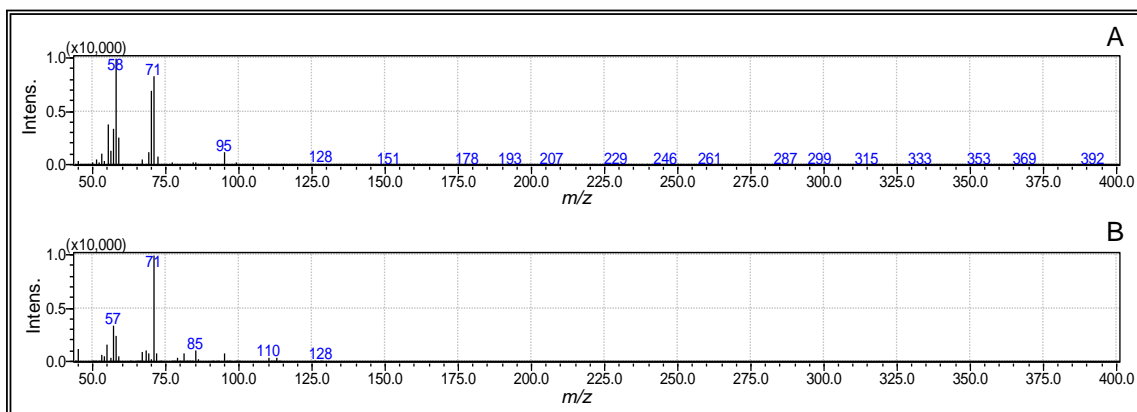


Figura 35. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 11,50 min e (B) – espectro do composto 3-octen-2-ol, a partir da biblioteca FFNSC13.lib, que apresentou 81% de similaridade com o obtido experimentalmente.

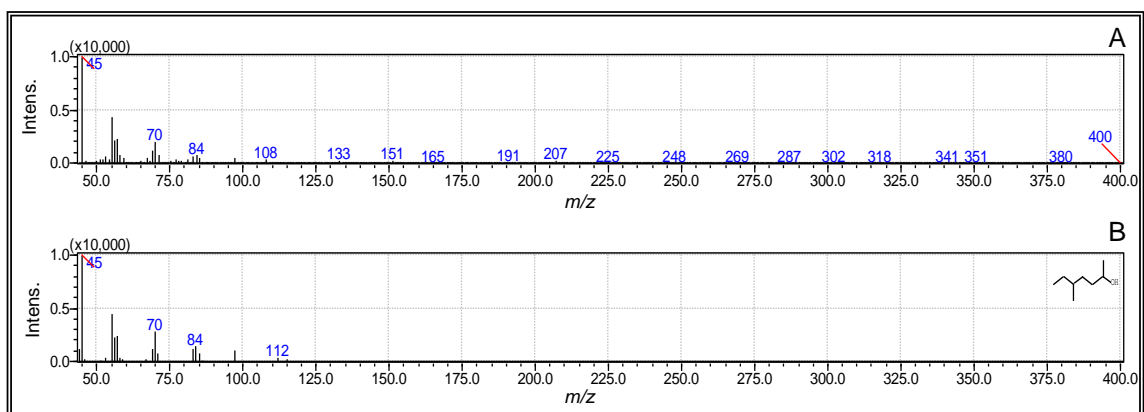


Figura 36. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 11,89 min e (B) – espectro do composto 5-metil-2-heptanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 86% de similaridade com o obtido experimentalmente.

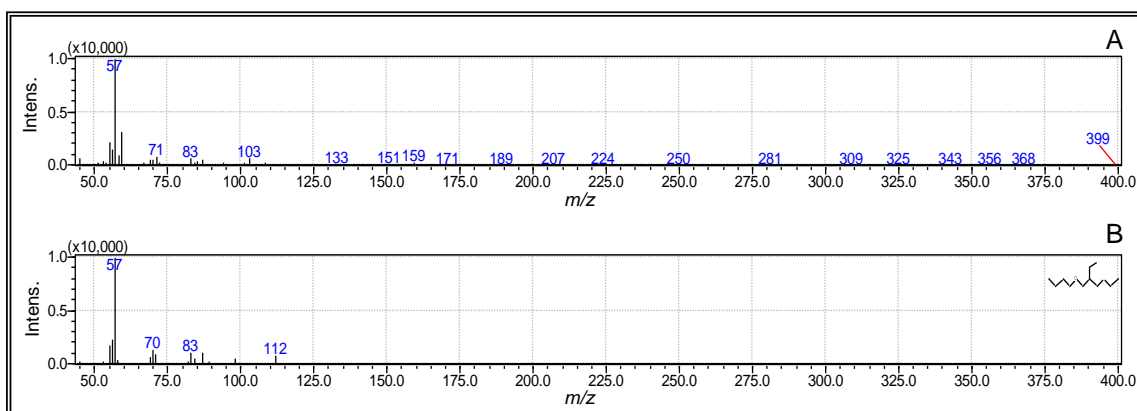


Figura 37. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 12,67 min e (B) – espectro do composto 3-(Butoximetil)heptano, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 84% de similaridade com o obtido experimentalmente.

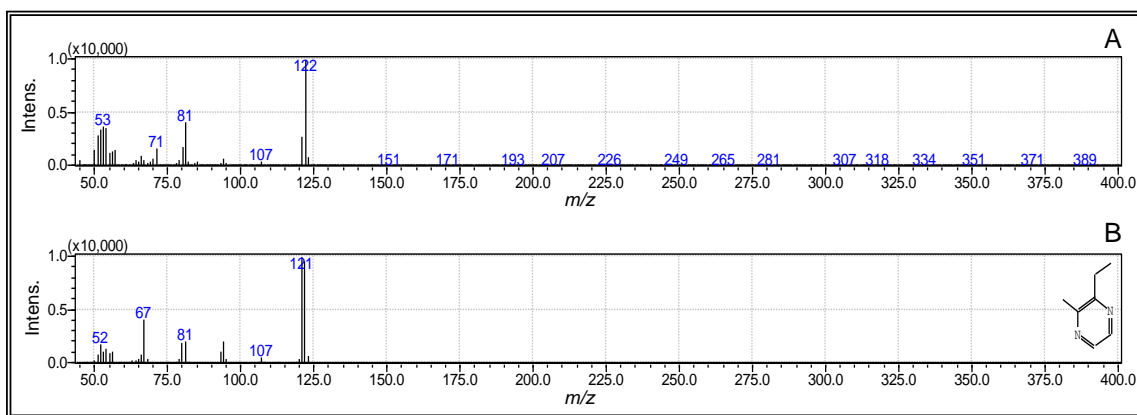


Figura 38. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 12,98 min e (B) – espectro do composto 2-etil-3-metil-pirazina, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.

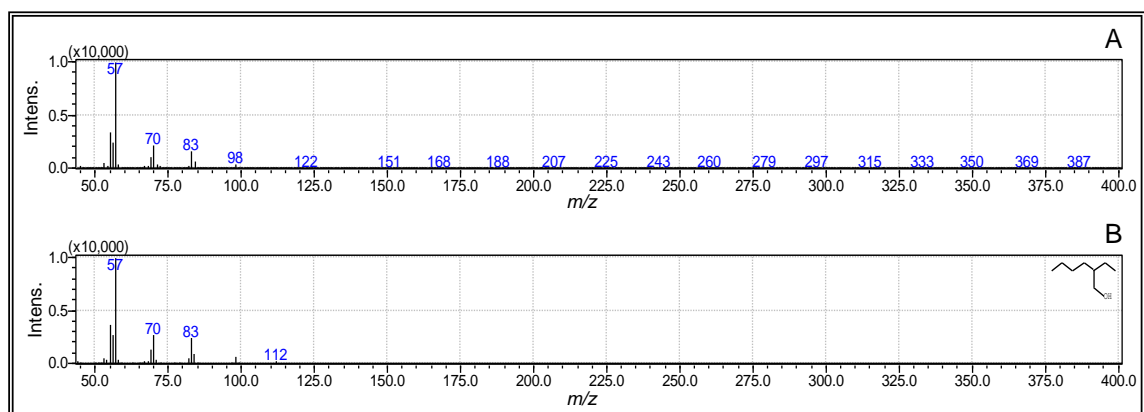


Figura 39. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 13,71 min e (B) – espectro do composto 2-etil-1-hexanol, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 96% de similaridade com o obtido experimentalmente.

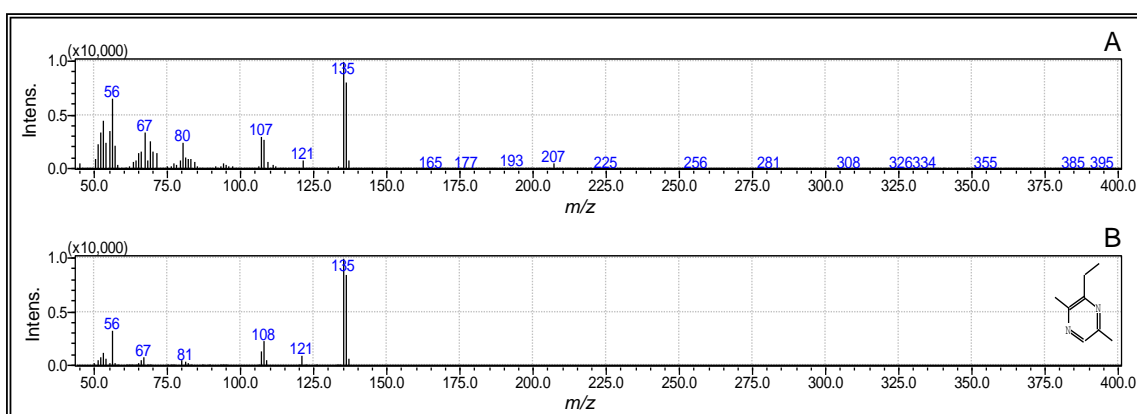


Figura 40. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,31 min e (B) – espectro do composto 3-etil-2,5-dimetil-pirazina, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.

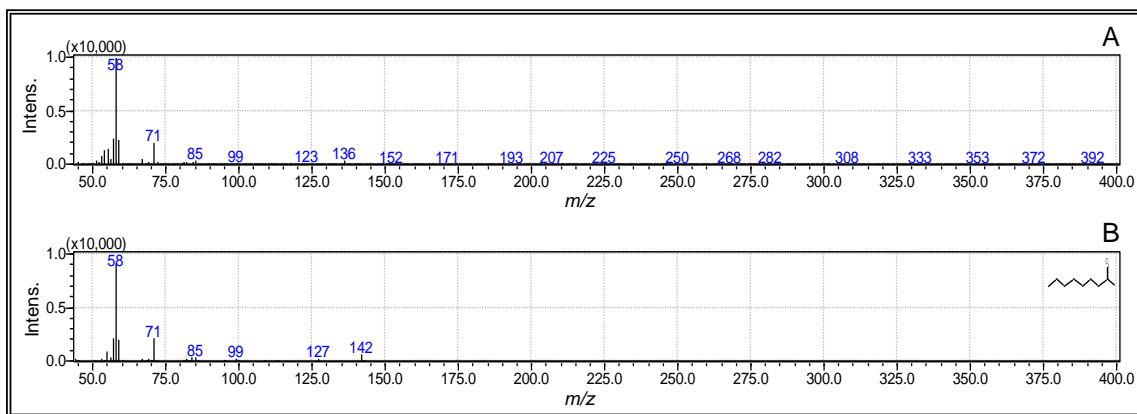


Figura 41. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,60 min e (B) – espectro do composto 2-Nonanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 90% de similaridade com o obtido experimentalmente.

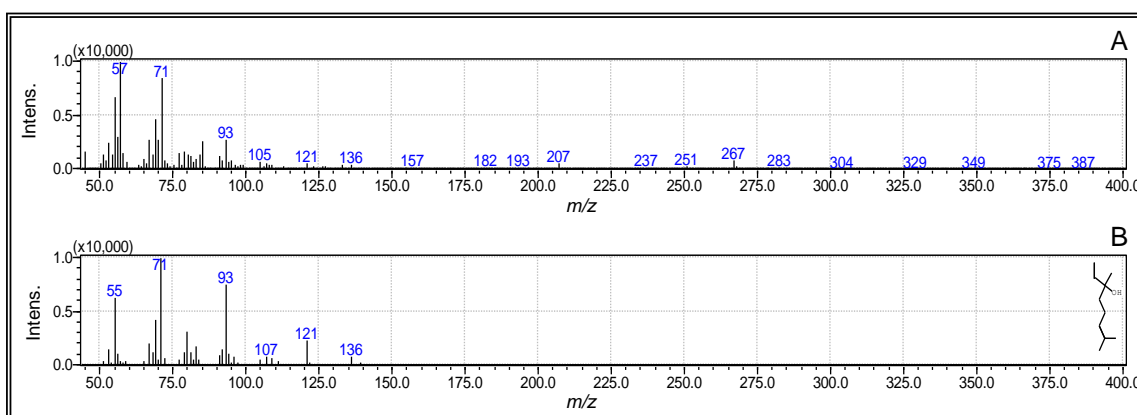


Figura 42. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,86 min e (B) – espectro do composto 3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.

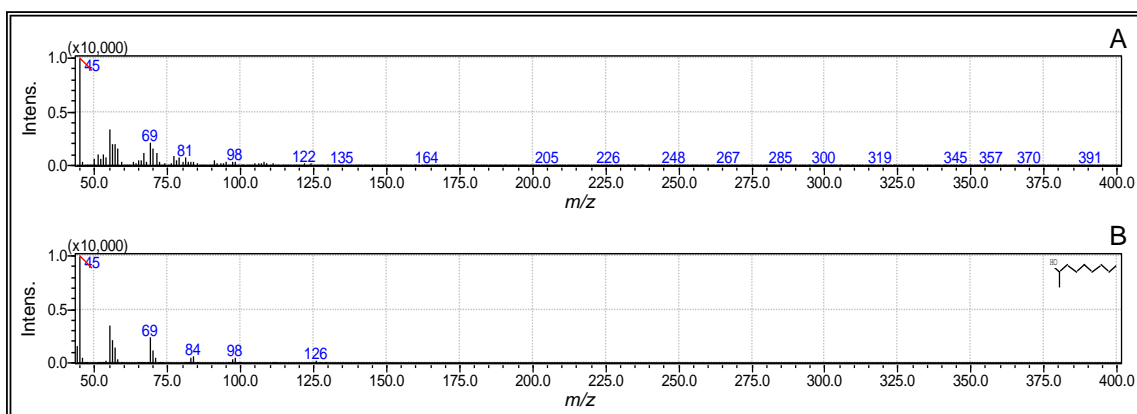


Figura 43. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 15,99 min e (B) – espectro do composto 2-Nonanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 92% de similaridade com o obtido experimentalmente.

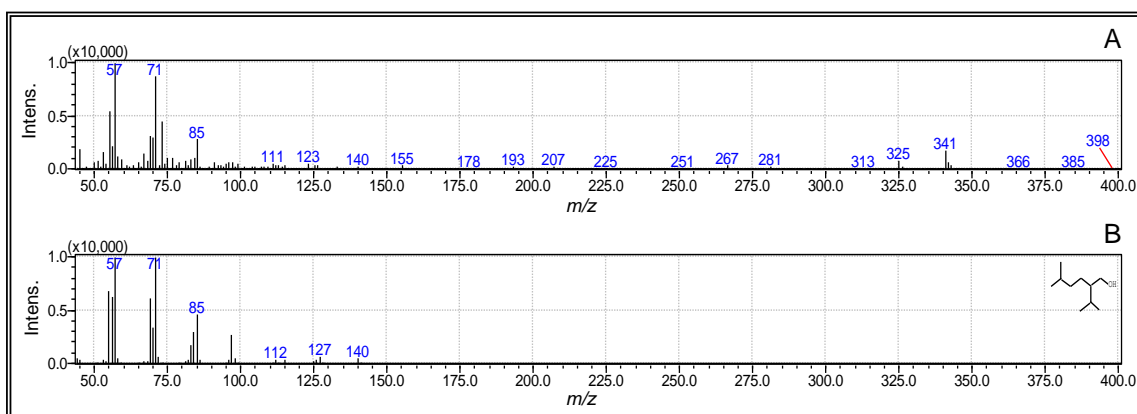


Figura 44. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 19,76 min e (B) – espectro do composto 2-isopropil-5-metil-1-hexanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 80% de similaridade com o obtido experimentalmente.

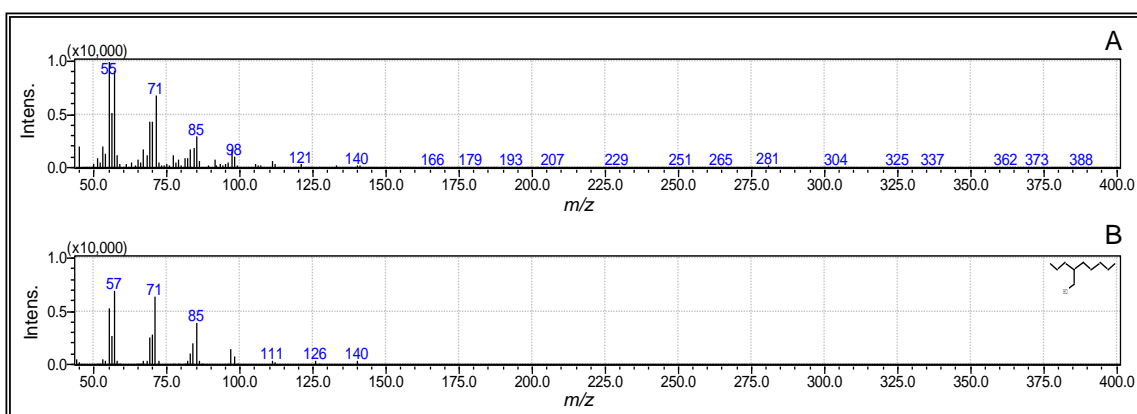


Figura 45. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 20,10 min e (B) – espectro do composto 2-propil-1-heptanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 81% de similaridade com o obtido experimentalmente.

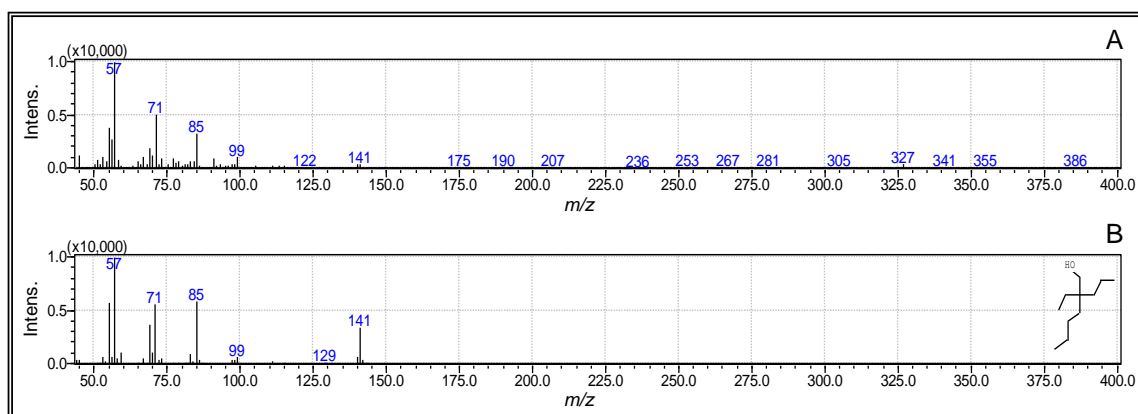


Figura 46. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 20,67 min e (B) – espectro do composto 2-etil-2-propil-1-hexanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 82% de similaridade com o obtido experimentalmente.

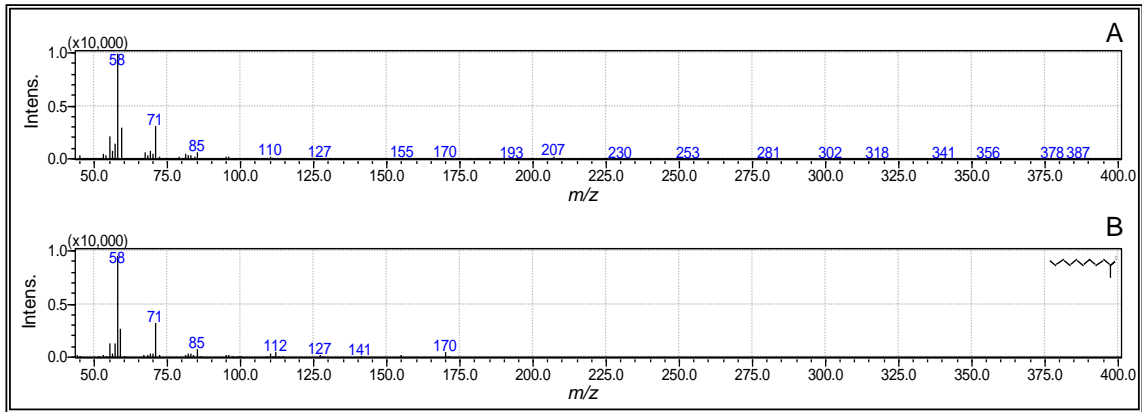


Figura 47. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 21,47 min e (B) – espectro do composto 2-undecanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 93% de similaridade com o obtido experimentalmente.

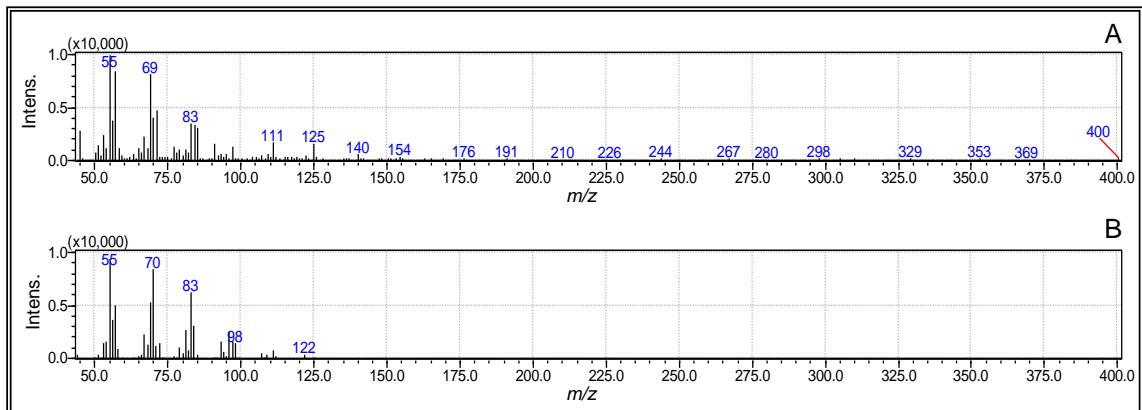


Figura 48. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 22,13 min e (B) – espectro do composto 2-nonenal, a partir da biblioteca FFNSC13.lib, que apresentou 82% de similaridade com o obtido experimentalmente.

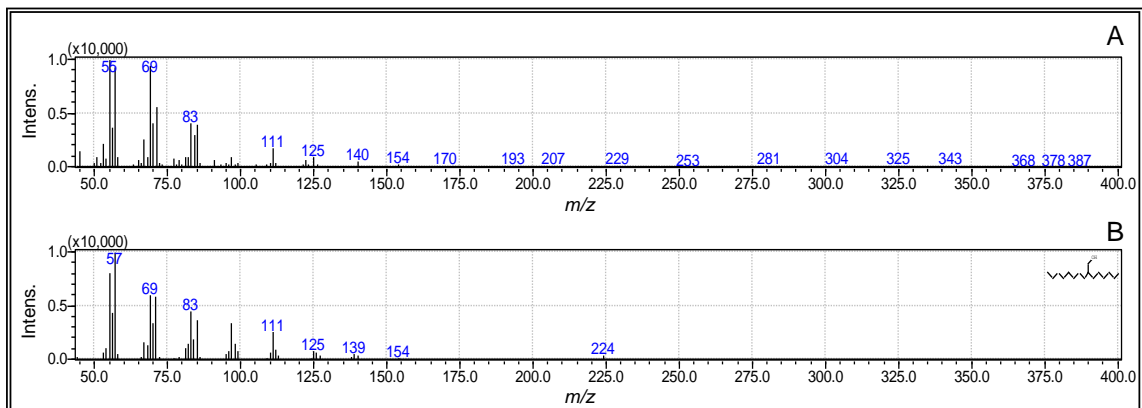


Figura 49. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 22,34 min e (B) – espectro do composto 2-hexil-1-decanol, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 89% de similaridade com o obtido experimentalmente.

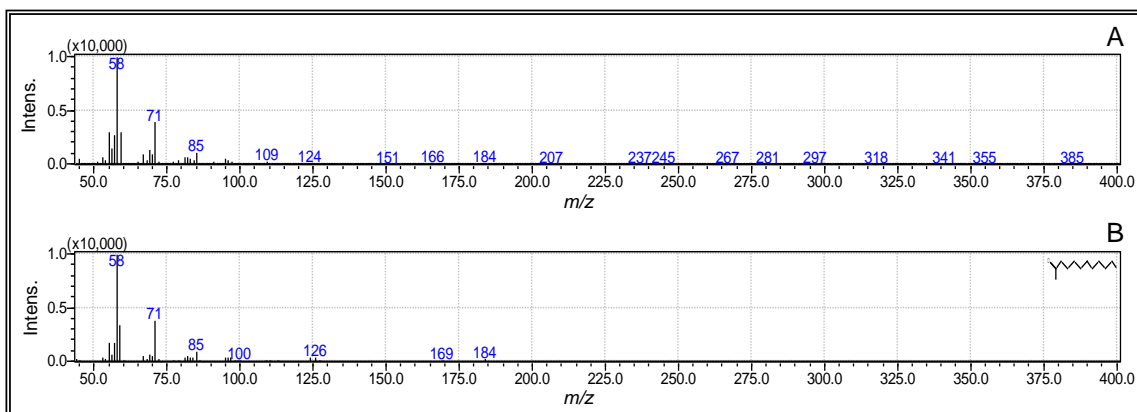


Figura 50. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 23,20 min e (B) – espectro do composto 2-dodecanona, a partir da biblioteca NIST08s.LIB, que apresentou 90% de similaridade com o obtido experimentalmente.

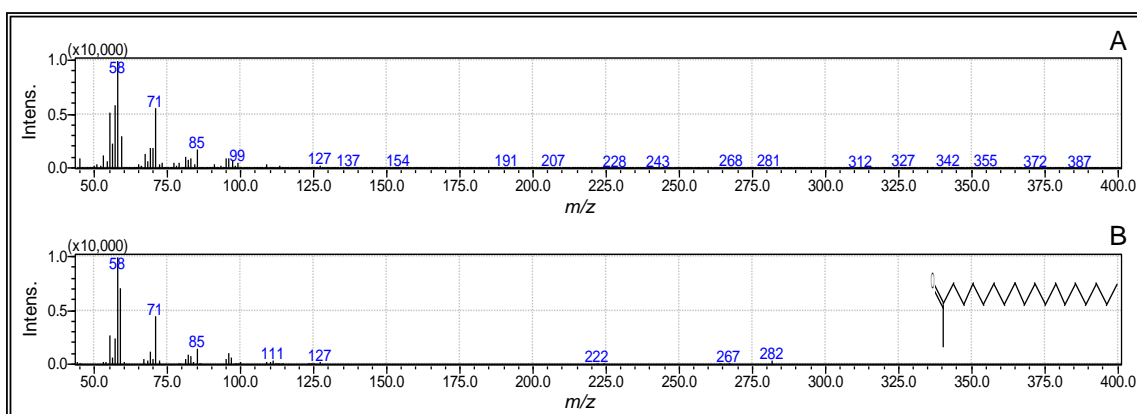


Figura 51. Comparação dos espectros de massas. (A) – espectro experimental, com tempo de retenção de 26,72 min e (B) – espectro do composto 2-Nonadecanona, a partir da biblioteca NIST08.LIB, que apresentou 87% de similaridade com o obtido experimentalmente.

Tabela 8. Compostos orgânicos voláteis de *Bacillus* ACB-65 e ACB-73, comuns em ambas as espécies, identificados pelo método SPME – GC-MS, após 7 dias de cultivo em meio TSB acrescido de ágar.

TR*	COMPOSTOS	FUNÇÃO ORGÂNICA	FÓRMULA MOLECULAR	BIBLIOTECA
2,60	1,3-Butanodiol	Álcool	C ₄ H ₁₀ O ₂	NIST08.LIB
4,00	3-Hydroxi-2-butanona	Cetona	C ₄ H ₈ O ₂	NIST08.LIB
4,19	2-Vinil-2-butenal	Aldeído	C ₆ H ₈ O	NIST08s.LIB
4,22	1-Methoxi-2-metilpropano	Éter	C ₅ H ₁₂ O	NIST08.LIB
4,56	3-Metil-2-butanol	Álcool	C ₅ H ₁₂ O	NIST08s.LIB
4,62	1-Methoxi-3-metilbutano	Éter	C ₆ H ₁₄ O	NIST08.LIB
4,74	3-Metil-1-butanol	Álcool	C ₅ H ₁₂ O	NIST08s.LIB
5,05	3-Metil-2-pentanona	Cetona	C ₆ H ₁₂ O	NIST08s.LIB
7,37	Metil-pirazina	Amina	C ₅ H ₆ N ₂	NIST08s.LIB
8,04	5-Metil-2-hexanona	Cetona	C ₇ H ₁₄ O	NIST08s.LIB
8,61	Ácido-2-metil-butanoico	Ácido carboxílico	C ₅ H ₁₀ O ₂	NIST08s.LIB
9,20	2-Heptanona	Cetona	C ₇ H ₁₄ O	NIST08s.LIB
9,57	2-Heptanol	Álcool	C ₇ H ₁₆ O	NIST08s.LIB
10,08	4,6-Dimetil-pirimidina	Amina	C ₆ H ₈ N ₂	NIST08s.LIB
11,19	6-Metil-2-heptanona	Cetona	C ₈ H ₁₆ O	NIST08s.LIB
11,50	3-Octen-2-ol	Álcool	C ₈ H ₁₆ O	FFNSC13.lib
11,89	5-Metil-2-heptanol	Álcool	C ₈ H ₁₈ O	NIST08s.LIB
12,67	3-(Butoximetil)heptano	Éter	C ₁₂ H ₂₆ O	NIST08.LIB
12,98	2-Etil-3-metil-pirazina	Amina	C ₇ H ₁₀ N ₂	NIST08.LIB
13,71	2-Etil-1-hexanol	Álcool	C ₈ H ₁₈ O	NIST08s.LIB
15,31	3-Etil-2,5-dimetil-pirazina	Amina	C ₈ H ₁₂ N ₂	NIST08s.LIB
15,60	2-Nonanona	Cetona	C ₉ H ₁₈ O	NIST08s.LIB
15,86	3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol	Álcool	C ₁₀ H ₁₈ O	NIST08.LIB
15,99	2-Nonanol	Álcool	C ₉ H ₂₀ O	NIST08s.LIB
19,76	2-Isopropil-5-metil-1-hexanol	Álcool	C ₁₀ H ₂₂ O	NIST08.LIB
20,10	2-Propil-1-heptanol,	Álcool	C ₁₀ H ₂₂ O	NIST08.LIB
20,67	2-Etil-2-propil-1-hexanol	Álcool	C ₁₁ H ₂₄ O	NIST08.LIB
21,47	2-Undecanona	Cetona	C ₁₁ H ₂₂ O	NIST08s.LIB
22,13	2-Nonenal	Aldeído	C ₉ H ₁₆ O	FFNSC13.lib
22,34	2-Hexil-1-decanol	Álcool	C ₁₆ H ₃₄ O	NIST08.LIB
23,20	2-Dodecanona	Cetona	C ₁₂ H ₂₄ O	NIST08s.LIB
26,72	2-Nonadecanona	Cetona	C ₁₉ H ₃₈ O	NIST08.LIB

*TR: tempo de retenção (min).

4.7. Efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo microbiano

Na avaliação sobre o efeito de diferentes meios de cultivo no antagonismo microbiano entre 11 isolados de *Bacillus* spp. (ACB-08, ACB-12, ACB-13, ACB-15, ACB-63, ACB-64, ACB-69, ACB-70, ACB-71, ACB-83 e ACB-85), os meios de citros ágar (CiA) e cenoura dextrose ágar (CDA) favoreceram o antagonismo microbiano frente ao fungo *P. citricarpa* (Figuras 52 e 53).

Em relação ao meio BDA, com exceção dos isolados ACB-64 e ACB-71, o restante dos isolados foram favorecidos nestes meios de cultura, promovendo a inibição do crescimento do patógeno (Figura 54).

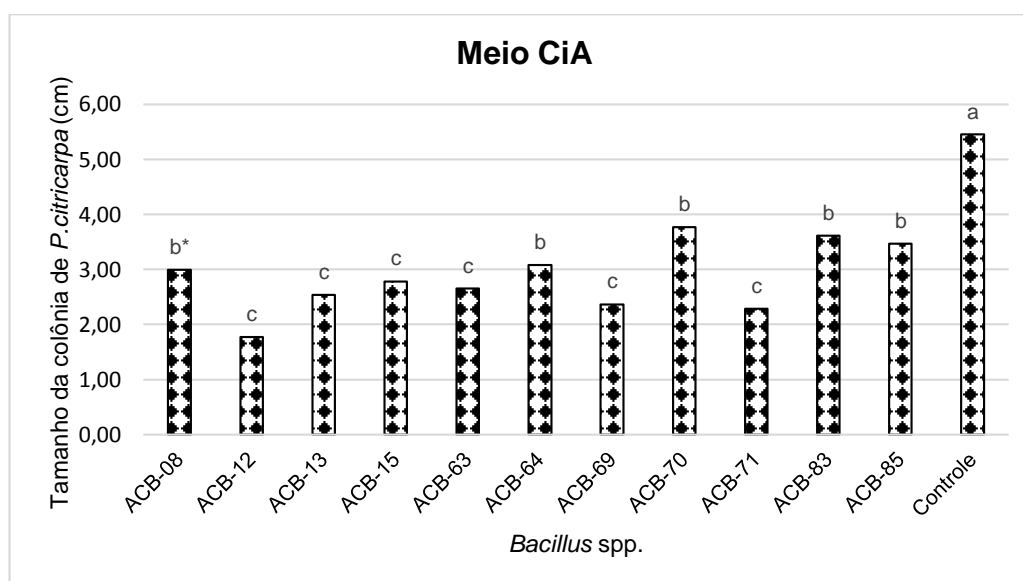


Figura 52. Efeito do meio citros ágar (CiA) no antagonismo proporcionado por *Bacillus* spp. ao fungo *Phyllosticta citricarpa*. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

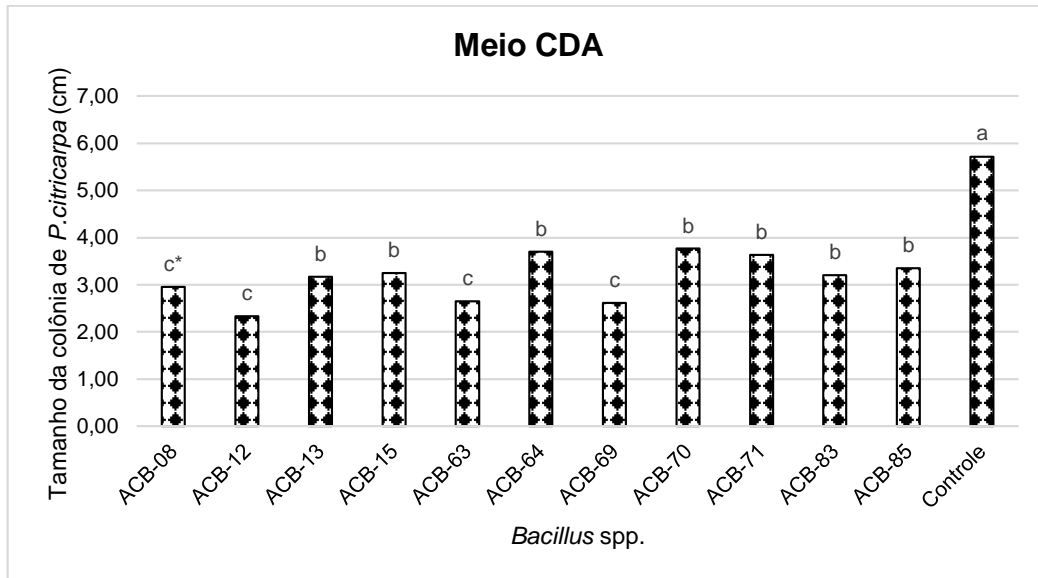


Figura 53. Efeito do meio cenoura-dextrose-ágar (CDA) no antagonismo proporcionado por *Bacillus* spp. ao fungo *Phyllosticta citricarpa*. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

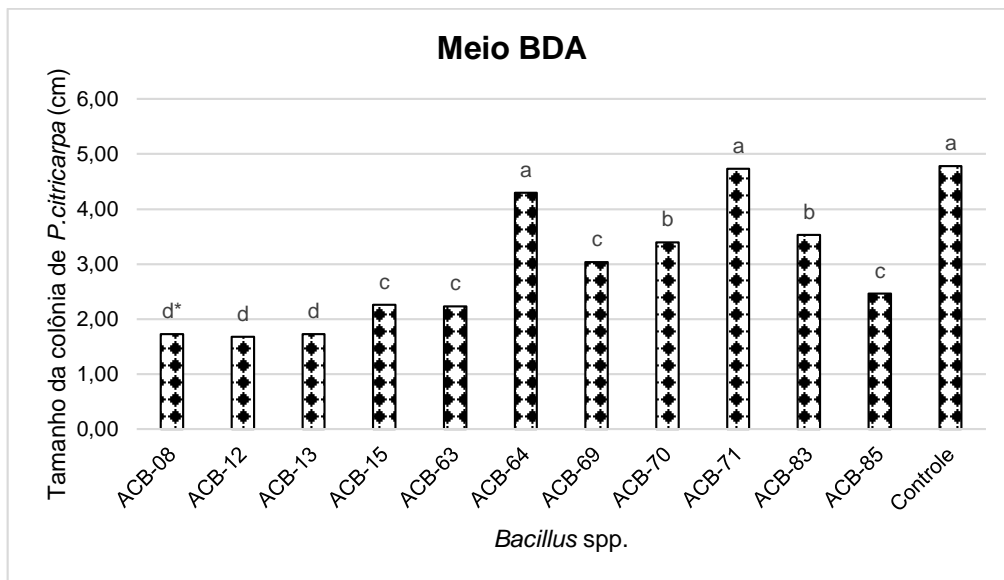


Figura 54. Efeito do meio cenoura dextrose ágar (BDA) no antagonismo proporcionado por *Bacillus* spp. ao fungo *Phyllosticta citricarpa*. (*) Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.8. LC-MS

De acordo com os perfis cromatográficos obtidos a partir de amostras do teste de cultivo pareado, pôde-se constatar que não houve diferença no metabolismo dos isolados de *Bacillus* spp. quando estes foram cultivados em diferentes meios de cultura, como exemplificado na Figura 55, referente ao ACB-08.

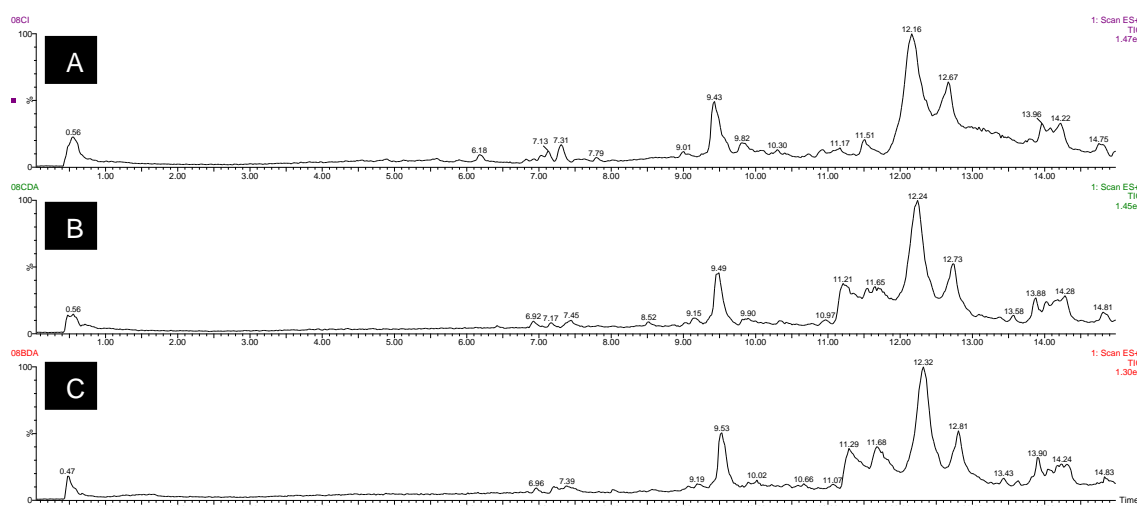


Figura 55. Perfis cromatográficos obtidos quando *Bacillus* ACB-08 foi cultivado em diferentes meios de cultura. (A) – meio citros ágar, (B) – meio cenoura dextrose ágar e (C) – meio batata dextrose ágar.

Como o crescimento dos microrganismos trabalhados neste estudo tem o crescimento mais acelerado em meio de cenoura-dextrose-ágar, prosseguiu-se os experimentos utilizando somente este meio para cultivo.

De acordo com os espectros de massas obtidos a partir de cada pico dos cromatogramas, foi possível identificar a produção de duas classes de antibióticos (iturinas e surfactinas). Em relação às amostras obtidas a partir do teste de antagonismo, todos os isolados avaliados produziram tais antibióticos.

Os isolados ACB-08, ACB-70 e ACB-71 quando cultivados isoladamente, não sofreram alterações em seus perfis metabólicos quando comparados com aqueles obtidos no co-cultivo com o fungo *P. citricarpa*, como mostrado na Figura 56.

Os isolados ACB-12, ACB-15 e ACB-69 não tiveram a produção de surfactinas alterada, porém, apresentaram ligeira diminuição na quantidade de iturinas na presença do patógeno (Figura 57).

Analisando os cromatogramas gerados em relação aos *Bacillus* ACB-63 e ACB-85, notou-se por algum motivo que o patógeno não permite a produção dos metabólitos antibióticos no co-cultivo (Figura 58)

O perfil metabólico do isolado ACB-13 não sofreu alterações em relação à produção de surfactinas e, sim, a produção de iturinas que foi favorecida na presença de *P. citricarpa* (Figura 59).

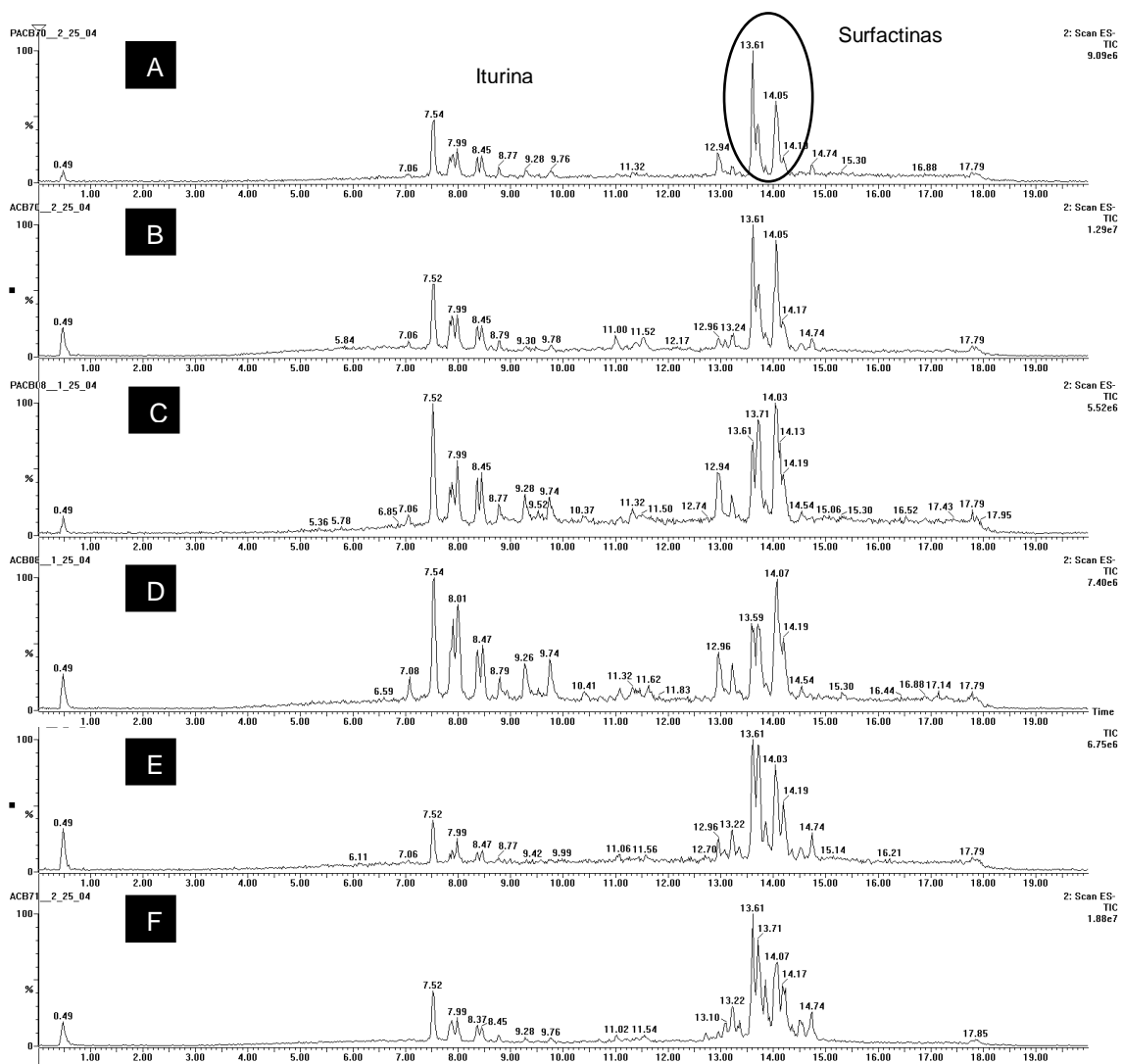


Figura 56. Perfis metabólicos dos isolados de *Bacillus*. (A) – ACB-08 em co-cultivo com o *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-08 cultivado sozinho; (C) – ACB-70 em co-cultivo *P. citricarpa* e (D) – ACB-70 sozinho; (E) – ACB-71 em co-cultivo *P. citricarpa* e (F) – ACB-71 sozinho.

Em relação ao metabolismo do ACB-64 o perfil não mostrou alteração em relação a iturina, quando comparou-se seu cultivo sozinho com o cultivo pareado com o fungo, mas apresentou alta diminuição na produção de surfactinas (Figura 60).

E por fim, o *Bacillus* ACB-83 que apresentou diminuição na produção de iturina e aumento na produção de surfactinas, na presença de *P. citricarpa* (Figura 61).

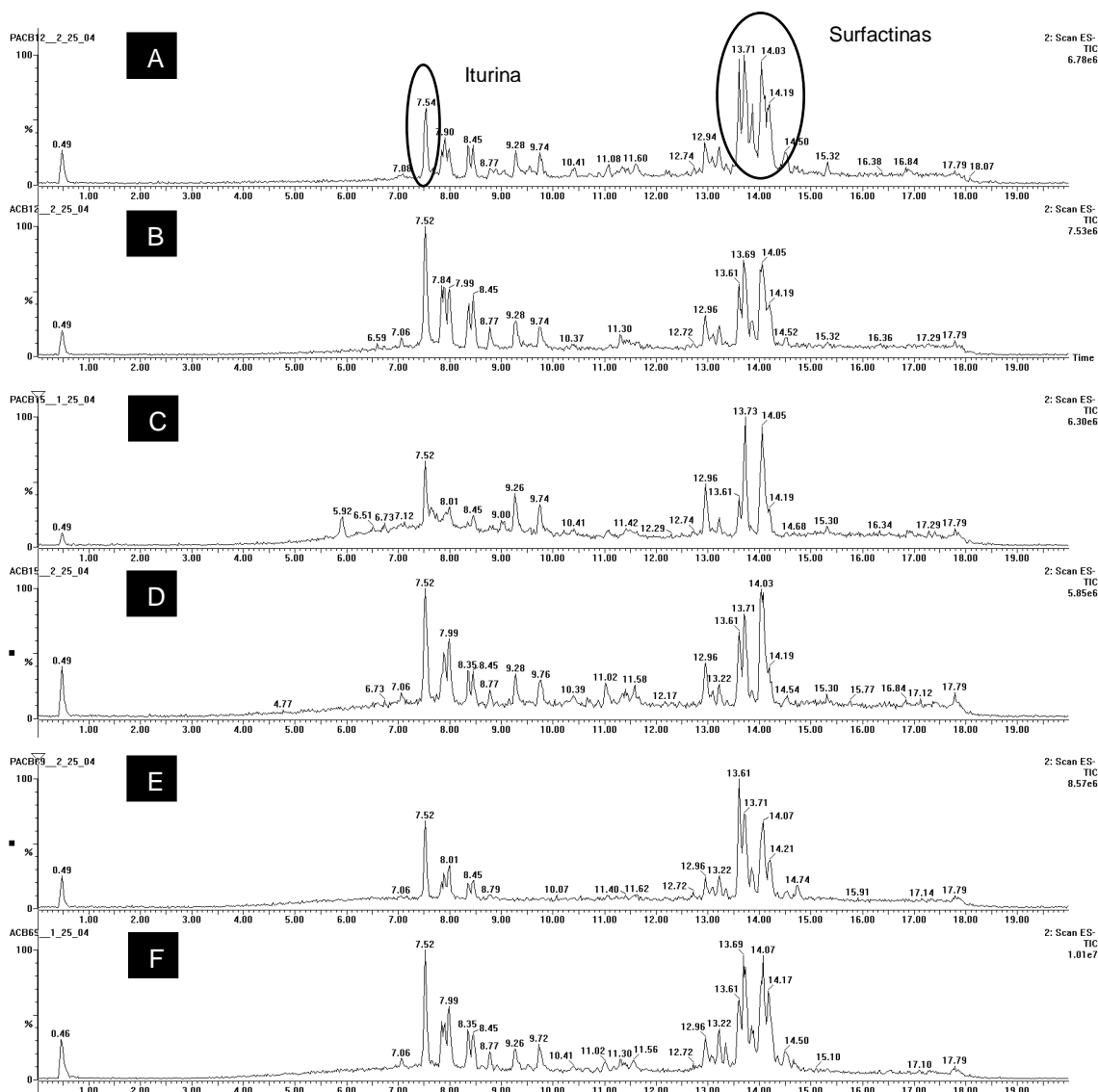


Figura 57. Perfis metabólicos dos isolados de *Bacillus*. (A) – ACB-12 em co-cultivo com o *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-12 cultivado sozinho; (C) – ACB-15 em co-cultivo *P. citricarpa* e (D) – ACB-15 sozinho; (E) – ACB-69 em co-cultivo *P. citricarpa* e (F) – ACB-69 sozinho.

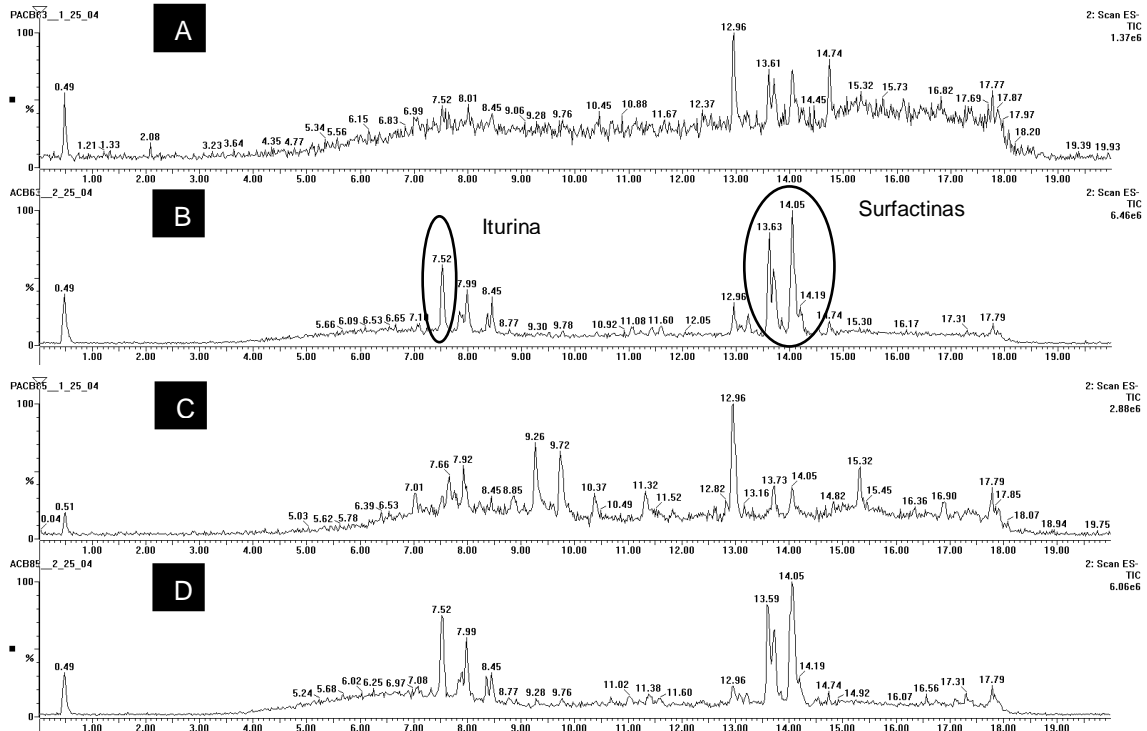


Figura 58. Perfis metabólicos dos isolados de *Bacillus*. (A) – ACB-63 em co-cultivo com o *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-63 cultivado sozinho; (C) – ACB-85 em co-cultivo *P. citricarpa* e (D) – ACB-85 sozinho.

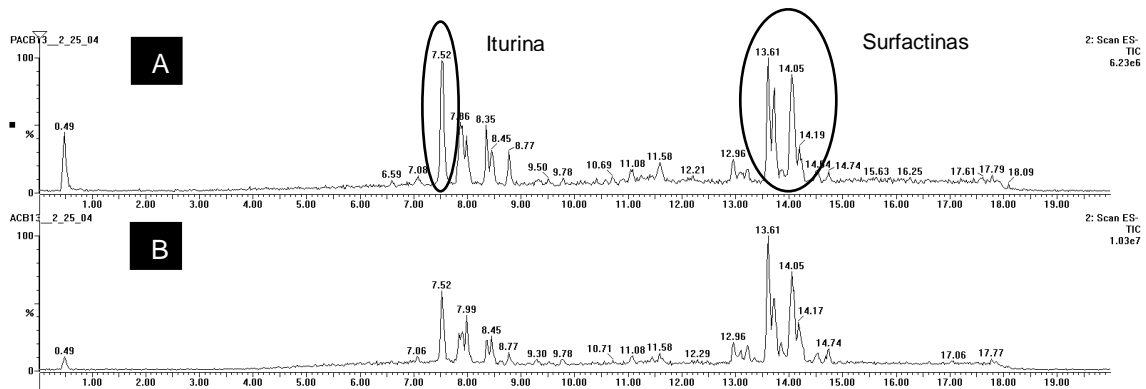


Figura 59. Perfis metabólicos do isolado de *Bacillus*. (A) – ACB-13 em co-cultivo com *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-13 cultivado sozinho.

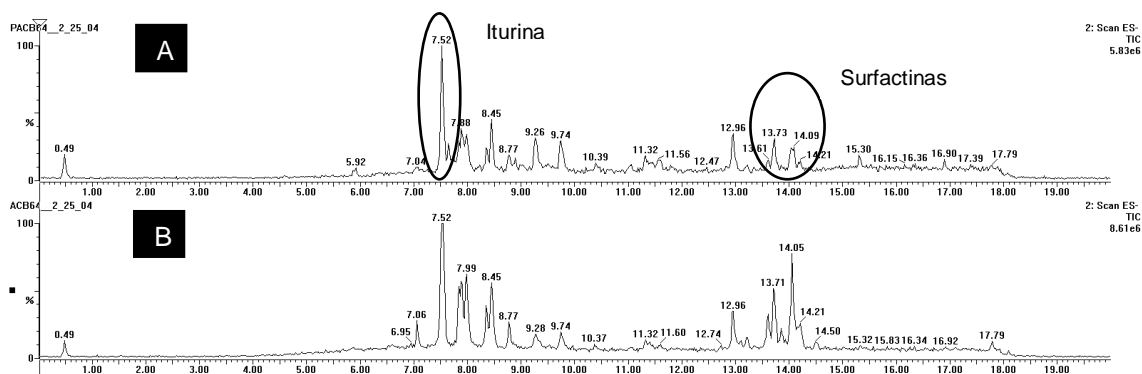


Figura 60. Perfis metabólicos do isolado de *Bacillus*. (A) – ACB-64 em co-cultivo com *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-64 cultivado sozinho.

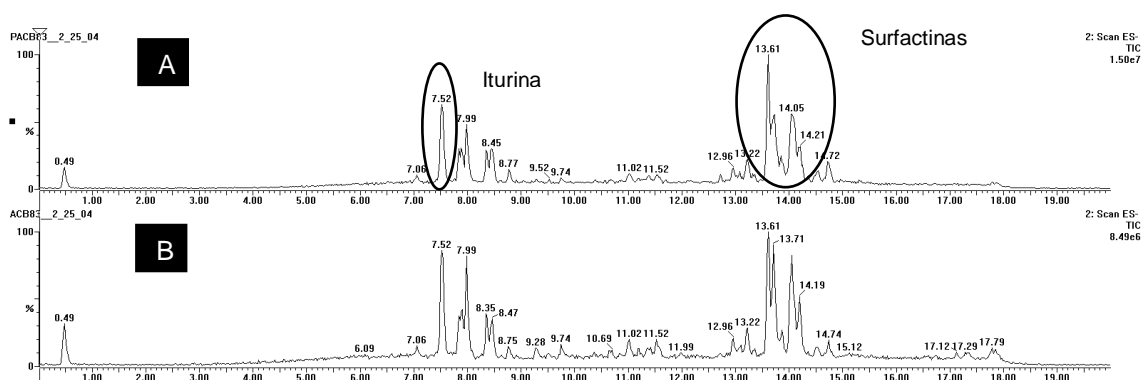


Figura 61. Perfis metabólicos do isolado de *Bacillus*. (A) – ACB-83 em co-cultivo com *Phyllosticta citricarpa* e (B) – ACB-83 cultivado sozinho.

4.9. Efeito do cultivo de *Bacillus* spp. em meio líquido na produção de metabólitos

Com relação ao efeito do meio líquido sobre a produção de metabólitos secretados, observaram-se diferentes respostas em relação ao isolado de *Bacillus* spp. avaliado. O ACB-71 produziu alta atividade de iturinas e surfactinas (Figura 62).

Já com relação aos perfis metabólicos dos isolados ACB-63, ACB-69 e ACB-83, houve maior produção de iturinas do que de surfactinas em meio líquido (Figura 63).

Os demais isolados de *Bacillus* spp. (ACB-08, ACB-12, ACB-13, ACB-15, ACB-64, ACB-70 e ACB-85) apresentaram o favorecimento da produção de surfactinas quando foram cultivados em meio líquido (Figuras 64)

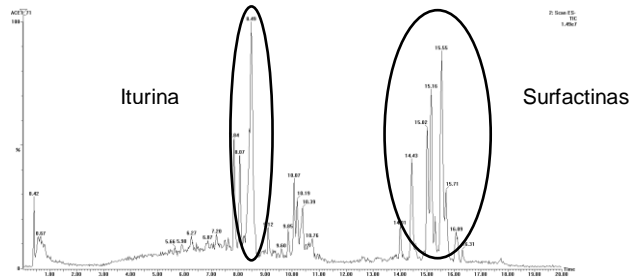


Figura 62. Isolado de *Bacillus* ACB-71 que apresentou alta atividade de iturinas e surfactinas quando foi cultivado em meio líquido.

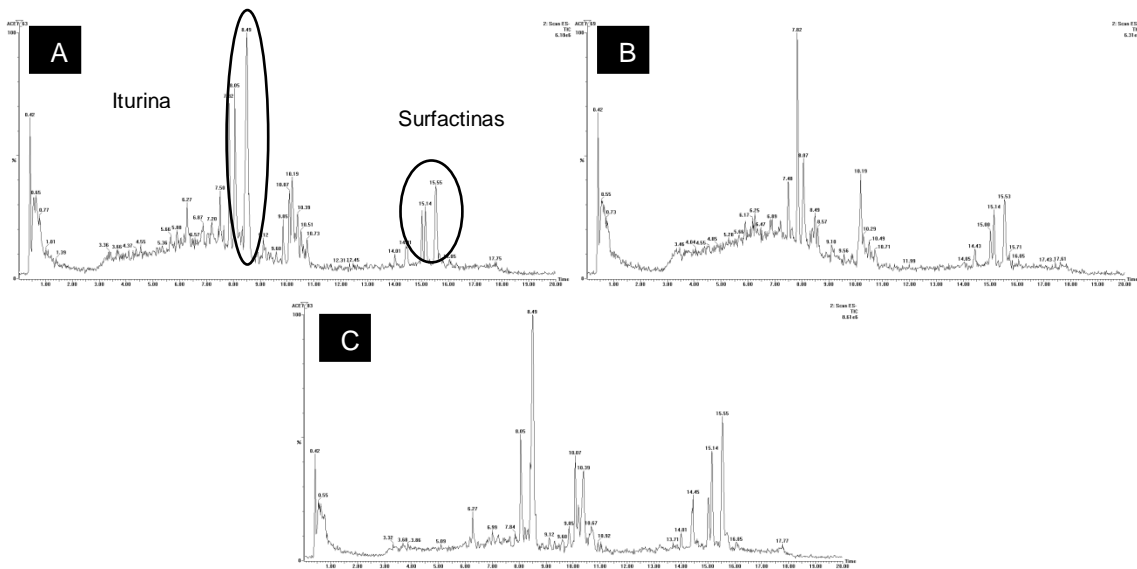


Figura 63. Isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram maior produção de iturinas, quando foram cultivados em meio líquido. (A) - ACB-63, (B) - ACB-69 e (C) – ACB-83.

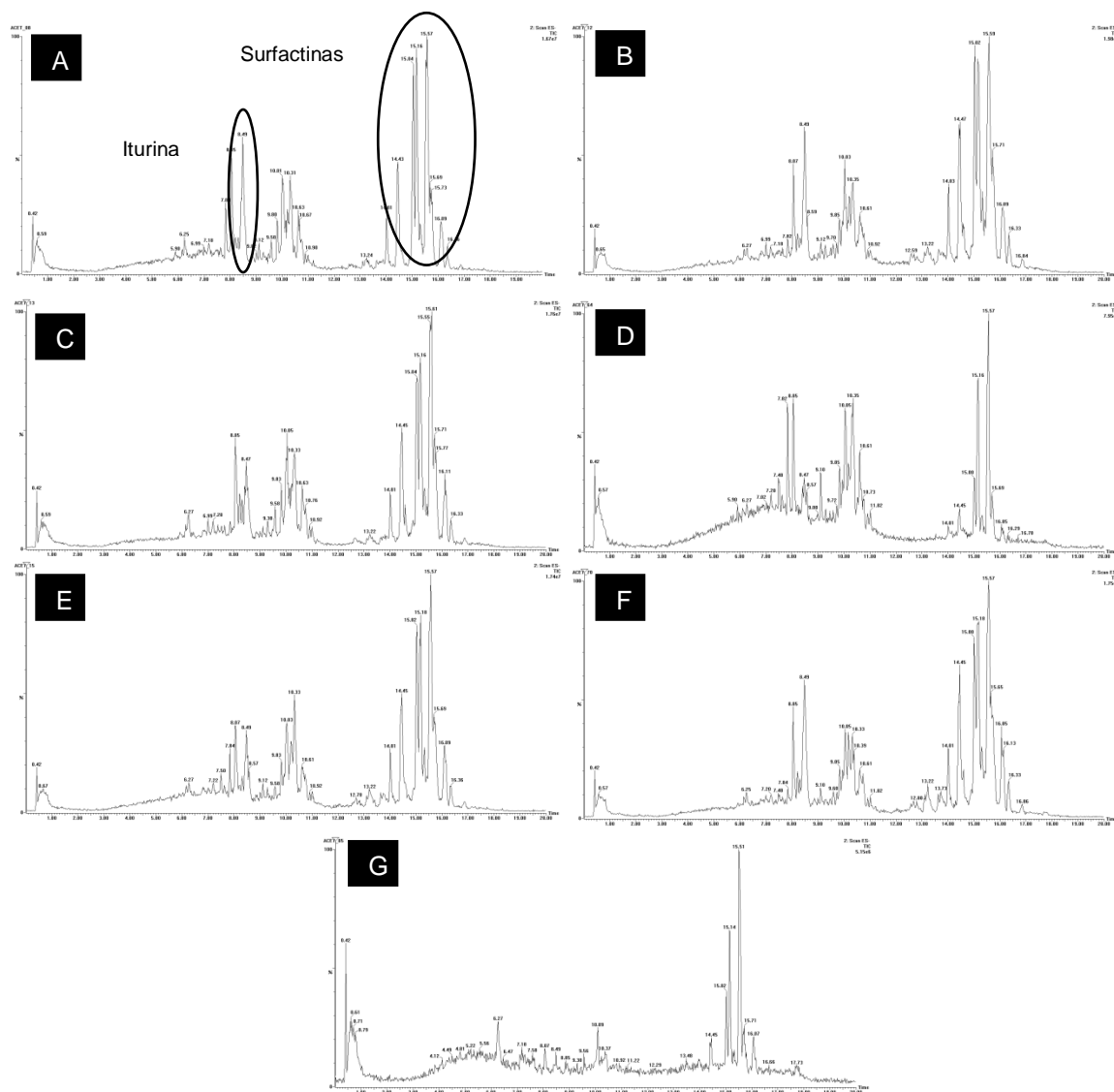


Figura 64. Isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram maior produção de surfactinas, quando foram cultivados em meio líquido. (A) - ACB-08, (B) - ACB-12, (C) - ACB-13, (D) - ACB-15, (E) - ACB-64, (F) - ACB-70 e (G) - ACB-85.

5. DISCUSSÃO

Em virtude dos prejuízos causados por *Phyllosticta citricarpa* na citricultura mundial e os problemas decorrentes da utilização de fungicidas sintéticos, o controle biológico surge como alternativa. Dentro deste contexto, espécies de *Bacillus* estão entre as mais utilizadas, pois proporcionam o controle de fitopatógenos utilizando COV e antibióticos não-voláteis (ASARI *et al.*, 2016).

Neste trabalho, foi avaliada a produção de compostos orgânicos voláteis (COV) por 27 isolados de *Bacillus* spp. e sua atividade antagônica contra o fungo *P. citricarpa*. Todos os isolados bacterianos testados foram capazes de controlar o patógeno, *in vitro* e *in vivo*, proporcionando diferentes níveis de inibição e o meio de cultivo da bactéria foi importante para a produção desses compostos e para o antagonismo. Tal fato corrobora com o obtido por Asari *et al.* (2016) que, estudando os múltiplos efeitos de COV de *B. amyloliquefaciens* na promoção de crescimento de plantas e no controle de fitopatógenos, observaram que utilizando diferentes meios de cultivo, houve diferenças no efeito desses compostos. No respectivo estudo, nos dois ensaios realizados, houve maior controle do patógeno quando se utilizou os meios TSA e TSB, para cultivo da bactéria em decorrência da produção de COV, com valores de inibição da colônia do fungo de até 73% (Figuras 9 e 10). Acredita-se que a presença da triptona e peptona nesses meios tenha sido importante para a produção desses metabólitos, ou mesmo, tenha estimulado a produção de compostos voláteis bioativos diferentes. Resultados semelhantes foram obtidos por Liu *et al.* (2008) que trabalhando com os COV de um isolado de *B. subtilis*, obtiveram mais de 75% de inibição de patógenos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora kikuchii*), quando a bactéria foi cultivada em meio TSB. Estudos evidenciam que a composição do meio de cultura influencia no metabolismo dos microrganismos, conferindo modificações que acarretam na produção diferencial de metabólitos em função do substrato a que é submetido (EZRA & STROBEL, 2003; EZRA *et al.*, 2004).

No teste *in vivo*, com frutos cítricos sintomáticos de mancha preta, os 27 isolados bacterianos estudados foram capazes de produzir COV que inibiram a evolução de manchas sardentas para manchas duras, ao final de 21 dias de avaliação e, dentre os melhores tratamentos, estão o ACB-60, quando utilizado

imediatamente após a repicagem (0h) e o ACB-65 com 24h de cultivo em BDA (Tabela 3). Quando se avaliou a produção de COV pela bactéria em diferentes meios de cultivo e o seu efeito no controle do patógeno em frutos cítricos (Ensaio 2), verificou-se que os melhores resultados (86%), em termos de inibições de manchas sardentas que evoluíram para manchas duras, foram obtidos com o ACB-65 e ACB-73, quando cultivados em meio de cultura TSB e a bactéria utilizada imediatamente após a repicagem (0h) (Tabela 4). A não evolução da mancha sardenta para mancha dura apresenta um controle interessante, considerando a depreciação estética dos frutos e o desenvolvimento da doença. Di Francesco *et al.* (2015) estudando COV produzidos por estirpes de *Aureobasidium pullulans* contra patógenos de pós-colheita demonstraram que 96% das lesões foram reduzidas, quando os frutos foram inoculados artificialmente com conídios patogênicos e depois fumigados com COV emitidos pelos antagonistas.

Foram realizadas análises de atividades enzimáticas relacionadas à defesa dos citros na busca da compreensão dos mecanismos pelos quais os COV de *Bacillus* spp. foram capazes de inibir o desenvolvimento de lesões de MPC em frutos na pós-colheita. Segundo Xu *et al.* (2013), as plantas sintetizam e acumulam proteínas durante processos de patogênese e resistência induzida, que pode ser um dos mecanismos utilizado por microrganismos no controle de doenças. Compostos fenólicos e enzimas como a polifenoloxidase (PPO), peroxidase (POD) e fenilalanina amônia liase (PAL), estudadas no respectivo trabalho, são compostos envolvidos na resistência das plantas e que podem ser induzidos por várias razões, como a infecção por fitopatógenos ou aplicação de um agente de biocontrole (PASCHOLLATI, 2011; LU *et al.*, 2013). Este estudo não demonstrou aumento na produção de compostos fenólicos e nas atividades enzimáticas da PPO, POD e PAL em frutos que foram tratados com os metabólitos voláteis de *Bacillus* spp., quando comparados com seus controles. Muito provavelmente, os COV tiveram efeito direto sobre o fungo *P. citricarpa* e as altas atividades enzimáticas apresentadas pelos tratamentos, de forma geral, podem ser decorrentes da infecção do patógeno no campo, antes da colheita. Contrariando os resultados obtidos nesse trabalho, muitos autores atribuem o controle de doenças de plantas à indução de resistência através da utilização direta de microrganismos antagonistas ou de seus metabólitos que podem atuar

como elicitores (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007; ARAUJO; MENEZES, 2009; CHOWDAPPA, *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2013).

Nos frutos tratados com os metabólitos voláteis dos *Bacillus* ACB-65 e ACB-73, as hifas de *P. citricarpa* apresentaram-se achatadas, retorcidas e deformadas, além de, aparentemente, terem diminuído a quantidade de conídios do fitopatógeno no local da lesão. Pode-se dizer, pela visualização das imagens de microscopia eletrônica de varredura, que o isolado bacteriano ACB-65 afetou os esporos do fungo (Figura 17). Resultados semelhantes foram encontrados por Solanki *et al.* (2015) que ao estudarem isolados de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* contra o fungo *Rhizoctonia solani* obtiveram até 87% de inibição no desenvolvimento do fitopatógeno utilizando COV produzidos pelas bactérias. Segundo os autores, esses compostos provocaram deformações e mortes das hifas, fatos confirmados por MEV. Outros autores também verificaram deformações nas hifas e nos esporos de fungos fitopatogênicos utilizando compostos voláteis a partir de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* contra *Macrophomina phaseolina* (TORRES *et al.*, 2016). Chaves-López *et al.*, (2015) trabalhando com as mesmas espécies de bactérias encontraram resultados semelhantes para diferentes fitopatógenos.

A análise dos metabólitos voláteis produzidos por *Bacillus* ACB-65 e ACB-73 por GC-MS demonstrou a presença de 33 compostos, distribuídos entre álcoois, cetonas, aminas, éteres, aldeídos e ácido carboxílico que podem servir como um arsenal de compostos no antagonismo microbiano. Todos os compostos identificados foram previamente relatados como produzidos por espécies de *Bacillus* (LIU *et al.*, 2008; CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2015; ASARI *et al.*, 2016). Os compostos 2-etil-1-hexanol e o 2-nonanol descritos neste trabalho, foram estudados por Fernando *et al.* (2005) que demonstraram que os mesmos podem inibir completamente o crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum*. O composto 2-undecanona também foi identificado por estes autores, porém, não apresentou atividade inibitória. O linalool (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol) identificado no presente trabalho foi relatado por vários autores, apresentando grande potencial antimicrobiano. Queiroba *et al.* (2007), trabalhando com óleo de *Bursera aloexylon*, verificaram que este continha um nível elevado de linalool (96,7%) e apresentou atividade antimicrobiana contra *Rhodococcus equi* e *Staphylococcus epidermidis*. Resultados semelhantes foram obtidos por

Herman *et al.* (2015), que demonstraram o potencial do composto no controle de *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Neste trabalho também foi avaliada a produção de antibióticos difusíveis no meio de cultura por onze isolados de *Bacillus* spp. que apresentaram alta atividade antagônica ao fungo *P. citricarpa*, em estudo realizado previamente (FUJIMOTO; KUPPER, 2016). Os autores relataram até 100% de inibição do fitopatógeno, devido à ação de metabólitos secundários produzidos pelas bactérias, porém, não relataram quais antibióticos estavam envolvidos nesse antagonismo. Baseando-se nisto, técnicas de espectrometria de massas foram utilizadas para analisar a produção diferencial e a identificação de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. na presença e ausência do fitopatógeno. Os resultados mostraram a produção de iturinas e surfactinas pelos isolados bacterianos, que tiveram sua produção afetada na presença do fungo (ACB-63), potencializada (ACB-13) ou mesmo indiferente (ACB-08). Tais antibióticos identificados são conhecidos por apresentarem poderosa atividade antifúngica, afetando uma variedade de patógenos (KLICH, 1994; HAGELIN *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010; ABRIOUEL *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015). Arrebola *et al.* (2009) estudando o antagonismo proporcionado por *B. amyloliquefaciens* contra sete patógenos de pós-colheita, relataram a iturina como sendo a maior inibidora da atividade de controle biológico.

Os isolados de *Bacillus* estudados no presente trabalho provavelmente produzem diferentes compostos bioativos que determinaram os diferentes níveis de antagonismo apresentados. A utilização desses compostos no controle de doenças é muito vantajosa e, segundo Wheatley (2002), os COV são infoquímicos ideais, uma vez que, poderiam atuar em amplas distâncias, através da difusão no ar, inclusive, nos poros do solo. Nesse aspecto, considerando a epidemiologia da mancha preta dos citros, tais compostos poderiam ser utilizados para impedir a formação de ascósporos (Inédito). Além disso, os diferentes metabólitos produzidos pelos isolados de *Bacillus* podem agir isoladamente ou em sinergismo no controle de patógenos.

O conhecimento da produção de substâncias inibidoras de *P. citricarpa*, produzidas pelos isolados de *Bacillus* é importante para o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos no controle do fitopatógeno, abrindo a

possibilidade de controle da doença também pelo uso dos metabólitos produzidos e não apenas pela introdução massal de agentes de biocontrole.

6. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que:

- a) Foram identificadas três espécies de *Bacillus*: *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. methylotrophicus*;
- b) A maior produção de compostos voláteis por *Bacillus* spp. e com atividade contra *P. citricarpa* foi obtida quando a bactéria foi cultivada nos meios TSA e TSB;
- c) Os COV produzidos pelas espécies de *Bacillus* foram capazes de inibir a evolução dos sintomas, de mancha sardenta para mancha dura, em frutos cítricos;
- d) Possivelmente, os compostos voláteis não induziram resistência à doença nos frutos cítricos;
- e) Os COV produzidos pela bactéria foram capazes de causar deformações das hifas e conídios de *P. citricarpa*, em frutos com lesões;
- f) A análise dos metabólitos voláteis produzidos por *Bacillus* ACB-65 e ACB-73 demonstrou a presença de 33 compostos, distribuídos entre álcoois, cetonas, aminas, éteres, aldeídos e ácido carboxílico;
- g) As espécies de *Bacillus* estudadas também produziram duas classes de antibióticos, iturinas e surfactinas, que estão associadas com sua atividade antagonista contra *P. citricarpa*.

Como alternativa ao uso de fungicidas sintéticos para o controle da MPC, alguns dos voláteis e/ou antibióticos produzidos pelos isolados bacterianos poderiam ser utilizados para o desenvolvimento de novos bioprodutos, sendo necessários estudos mais aprofundados.

7. REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M.; OMAR, N.B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. 201-232, 2011.

ADASKAVEG, J. E.; FÖRSTER, H.; SOMMER, N. F. Principles of postharvest pathology and management of decays of edible horticultural crops. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**, v. 3311, p. 163-195, 2002.

AGOSTINI, J.P.; PERES, N.A.; MACKENZIE, S.J.; ADASKAVEG, J.E.; TIMMER, L.W. Effect of Fungicides and Storage Conditions on Postharvest Development of Citrus Black Spot and Survival of *Guignardia citricarpa* in Fruit Tissues. **Plant Disease**, v. 90, n. 11, p. 1419-1424, 2006.

ALAMRI, S. A. Enhancing the efficiency of the bioagent *Bacillus subtilis* JF419701 against soil-borne phytopathogens by increasing the productivity of fungal cell wall degrading enzymes. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 48, n. 2, p. 159-170, 2015.

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.G.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemical**, v.120, n. 4, p. 470-475, 1974

ALLWOOD, J.W.; ELLIS, D.I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. **Physiologia Plantarum**, v. 132, n. 2, p. 117-135, 2008.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ARAÚJO, F.F. de; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 2, p. 386-395, 2010.

ASARI, S.; MATZÉN, S.; PETERSEN, M.A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 6, p. fiw070, 2016.

ASHWINI, N.; SRIVIDYA, S. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. **3 Biotech**, v. 4, n. 2, p. 127-136, 2014.

BALDASSARI, R.B., WICKERT, E; GOES, A. Pathogenicity, colony morphology and diversity of isolates of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae* isolated from Citrus spp. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 103-110. 2008.

BAUTISTA-BAÑOS, S. (Ed.). **Postharvest Decay: Control Strategies**. Elsevier, 2014.

CANO, M.P., ANCOS, B. DE, MATAALLANA, M.C., CÁMARA, M., REGLERO, G., TABERA, J. Differences among Spanish and Latin-American banana cultivars: morphological, chemical and sensory characteristics. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 411-419, 1997.

CAPDEVILLE, G. D.; SOUZA JÚNIOR, M.T.; SANTOS, J.R.P.; MIRANDA, S.P.; CAETANO, A.R.; FALCÃO, R.; GOMES, A.C.M.M. Scanning electron microscopy of the interaction between *Cryptococcus magnus* and *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1537-1544, 2007.

CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L.M.S.; TRIVEDP, I.; KUMAR,B.; COLVIN, N. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 160, p. 75-81, 2005.

CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; GIANOTTI, A.; SACCHETTI, G.; NDAGIJIMANA, M.; CICCARONE, C.; STELLARINI, A.; CORSETTI, A.; PAPARELLA, A. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 487-499, 2015.

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, S.M.; LAKSHMI, M.J.; UPRETI, K.K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 41N4-48, 1971.

DI FRANCESCO, A.; UGOLINI, L.; LAZZERI, L.; MARI, M. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. **Biological Control**, v. 81, p. 8-14, 2015.

DONAHAYE, E. J. Current status of non-residual control methods against stored product pests. **Crop Protection**, v. 19, n. 8, p. 571-576, 2000.

DUMAS, M.E.; KINROSS, J.; NICHOLSON, J.K. Metabolic phenotyping and systems biology approaches to understanding metabolic syndrome and fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 1, p. 46-62, 2014.

ECKERT, J.W.; OGAWA, J.M. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. **Annual Review Phytopathology**, v. 23, p. 421-454, 1985.

EFFMERT, U.; KALDERÁS, J.; WARNKE, R.; PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. **Journal of Chemical Ecology**, v. 38, n. 6, p. 665-703, 2012.

EZRA, D.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. **Microbiology**, v. 150, n. 12, p. 4023-4031, 2004.

EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodora albus*. **Plant Science**, v. 165, n. 6, p. 1229-1238, 2003.

FELIZIANI, E.; ROMANAZZI, G. Preharvest application of synthetic fungicides and alternative treatments to control postharvest decay of fruit. **Stewart Postharvest Review**, v. 9, n. 3, p. 1-6, 2013.

FERNANDO, W.D.; RAMARATHNAM, R.; KRISHNAMOORTHY, A.S.; SAVCHUK, S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 955-964, 2005.

FILL, T.P. **Estudos biossintéticos de amidas bis-fenilpropanoídicas produzidas pelo fungo *Penicillium brasilianum*, um endófito de *Melia azedarach* (Meliaceae)**. 2009. 157p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

FUJIMOTO, A.; KUPPER, K.C. Production of Antifungal Compounds and Hydrolytic Enzymes by *Bacillus* spp. As Mechanisms of Action against *Phyllosticta citricarpa*. **IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 9, n. 11, p. 19-27, 2016.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, C.R. Ocorrência e controle da pinta-preta (*Guignardia citricarpa*) dos citros no Estado do Amazonas. **Comunicado Técnico Embrapa** n°22. Manaus, AM. Abril 2004.

GOES, A. Etiologia, aspectos epidemiológicos e controle de *Guignardia citricarpa*, agente causal da mancha preta do citros. 100 p. **Relatório Técnico**, 2005.

GOES, A.; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**, Orlando, Florida, p.1001-1002, 2000.

GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W.; BERGAMIN FILHO, A., VAN DEN BOSCH, F., IREY, M.S.; TAYLOR, E.; MAGAREY, R.D.; TAKEUCHI, Y. Response to “Potential distribution of citrus black spot in the United States based on climatic conditions”, Er et al. 2013. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 2, p. 231–234, 2014.

HAGELIN, G.; OULIE, I.; RAKNES, A.; UNDHEIM, K.; Clausen, O. G. Preparative high-performance liquid chromatographic separation and analysis of the Maltacine complex—a family of cyclic peptide antibiotics from *Bacillus subtilis*. **Journal of Chromatography B**, v. 811, n. 2, p. 243-251, 2004.

HARRIGAN, G.G.; GOODACRE, R. (Ed.). **Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis**. Springer Science & Business Media, 2012.

HARWOOD, Colin R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends in Biotechnology**, v. 10, p. 247-256, 1992.

HENDRIKS, M.M.; VAN EEUWIJK, F.A.; JELLEMA, R.H.; WESTERHUIS, J.A.; REIJMERS, T.H.; HOEFSLOOT, H.C.; SMILDE, A.K. Data-processing strategies for metabolomics studies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1685-1698, 2011.

HERMAN, A.; TAMBOR, K.; HERMAN, A. Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 165-172, 2016.

HYNES, J.; MÜLLER, C.T.; JONES, T.H.; BODDY, L. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicolor*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 1, p. 43-57, 2007.

KIELY, T.B. **Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales**. New South Wales: Department of Agriculture Science, p.88. (Bulletin), 1948.

KIM, P. I.; RYU, J.; KIM, Y. H.; CHI, Y. T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of

Colletotrichum gloeosporioides. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KIM, P.I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; PARK, R.; CHI, Y. T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 5, p. 942-949, 2004.

KIM, P.I.; RYU, J.; KIM, Y.H.; CHI, Y.T. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 138-145, 2010.

KIMATI, H; BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Manual de Fitopatologia. 4^a.ed. São Paulo, SP, Agronômica Ceres, v. 2. **Doenças das Plantas Cultivadas**. p. 261-263, 2005.

KLICH, M.A.; ARTHUR, K.S.; LAX, A.R.; BLAND, J.M. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. **Mycopathologia**, v. 127, n. 2, p. 123-127, 1994.

KLOEPPER, J.W. Current status and future trends in biocontrol research and development in the U.S. **Proceedings of the International Symposium of Clean Agriculture**, Japan, p. 49-52, 1997.

KOTZÉ, J.M. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. **Plant Disease**, v. 65, p. 945-950, 1981.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic Acid techniques in Bacterial Systematics**, p. 115-175, 1991.

LIMA, F.B. DE; FÉLIX, C.; OSÓRIO, N.; ALVES, A.; VITORINO, R.; DOMINGUES, P.; CORREIA, A.; RIBEIRO, R.T.S.; ESTEVES, A.C. Secretome analysis of *Trichoderma atroviride* T17 biocontrol of *Guignardia citricarpa*. **Biological Control**, v. 99, p. 38-46, 2016.

LIMA, P.F.; FURLAN, M.F.; RIBEIRO, F.A.; PASCHOLATI, S.F.; AUGUSTO, F. *In vivo* determination of the volatile metabolites of saprotroph fungi by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 11, p. 1924-1932, 2015.

LIMA, G.P.P.; BRASIL, O.G.; OLIVEIRA, A.M. Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sob estresse salino. **Scientia Agrícola**, v. 56, n.1, 1999.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnology:Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 1-18, 1975.

LISKER, N., COHEN, L., CHALUTZ, E., FUCHS, Y. Fungal infections suppress ethylene-induced phenylalanine ammonia-lyase activity in grapefruitst. **Physiological Plant Pathology**, v. 22, p. 331-338, 1983.

LIU, W.; MU, W.; ZHU, B.; LIU, F. Antifungal activities and components of VOCs produced by *Bacillus subtilis* G8. **Current Research in Bacteriology**, v. 1, p. 28-34, 2008.

LOPES, M.R.; KLEIN, M.N; FERRAZ, L.P.; SILVA, A.C.; KUPPER, K.C. *Saccharomyces cerevisiae*: a novel and efficient biological control agent for *Colletotrichum acutatum* during pre-harvest, **Microbiological Research**, v. 175, p. 93–99, 2015.

LU, L.; LU, H.; WU, C.; FANG, W.; YU, C.; YE, C.; SHI, Y.; YU, T.; ZHENG, X. *Rhodospiridium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.85, p. 196–202, 2013.

MAGET-DANA, R.; THIMON L.; PEYPOUX, F.; PTACK, M. Surfactin/Iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v. 74, p. 1047-1051, 1992.

MARI, M.; DI FRANCESCO, A.; BERTOLINI, P. Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. **Stewart Postharvest Review**, v. 10, n. 1, p. 1-4, 2014.

MERCIER, J.; JIMENEZ, J.I. Control of decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodora albus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, p. 1–8, 2004.

MONGKOLTHANARUK, W. Classification of *Bacillus* beneficial substances related to plants, humans and animals. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 12, p. 1597-1604, 2012.

MORATH, S.U.; HUNG, R.; BENNETT, J.W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 73-83, 2012.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

NOZAKI, M.H. **Produção de estruturas reprodutivas e efeito do ambiente nos tipos de sintomas produzidos por *Guignardia citricarpa* em *Citrus* spp.** 2007. 85f. Tese (Doutorado em agronomia, produção vegetal.) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PAL, K.K.; GARDENER, B. M. Biological control of plant pathogens. **The Plant Health Instructor**, v. 2, p. 1117-1142, 2006.

PALOU, L.; VALENCIA-CHAMORRO, S.A.; PÉREZ-GAGO, M.B. Antifungal edible coatings for fresh citrus fruit: a review. **Coatings**, v. 5, n. 4, p. 962-986, 2015.

PASCHOLATI, S.F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, v. 1 p. 593- 636, 2011.

PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

PAUL, I.; VAN JAARSVELD, A.S.; KORSTEN, L.; HATTINGH, V. The potential global geographical distribution of Citrus Black Spot caused by *Guignardia citricarpa* Kiely: The likelihood of disease establishment in the European Union. **Crop Protection**, v. 24, p. 297–308, 2005.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 400-407, 2003.

QUEIROGA, C.L.; DUARTE, M.C.T.; RIBEIRO, B.B.; MAGALHÃES, P.M. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. **Fitoterapia**, v. 78, n. 4, p. 327-328, 2007.

SHODA, M. Review: Bacterial control of plant diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

SILVA, F.D.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.D.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha Preta Dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **LARANJA**, Cordeirópolis, v.30, n.1-2, p.45-64, 2009.

SOLANKI, M.K.; SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, S.; KASHYAP, P.L.; SRIVASTAVA, A.K. Characterization of antagonistic-potential of two *Bacillus*

strains and their biocontrol activity against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Journal of Basic Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 82-90, 2015.

SPADARO, D.; GULLINO, M.L. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**. v. 91, p. 185– 194, 2004.

SPOSITO, M.B. **Dinâmica temporal e espacial da mancha preta (*Guignardia citricarpa*) e quantificação dos danos causados à cultura dos citros**. 2003. 112 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOFFANO, L. **Efeito dos extratos de albedo de *Citrus sinensis*, *Lentinula edodes*, *Agaricus blazei* e dos compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* no controle da mancha preta dos citros**. 2010. 76p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TORRES, M.J.; BRANDAN, C.P.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M.C. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research**, v. 182, p. 31-39, 2016.

VAN DER AA, H.A. Studies in *Phyllosticta* I. **Studies in Micology**, v.5, 1973.

WANG, T.; LIANG, Y.; WU, M.; CHEN, Z.; LIN, J.; YANG, L. Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 744-754, 2015.

WHEATLEY, R.E. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 81, n. 1-4, p. 357-364, 2002.

WORAPONG J.; STROBEL G.A.; FORD EJ, LI J.Y.; BAIRD G.; HESS, W.M. *Muscodor albus* gen. et sp. nov., an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, v. 79, p. 67–79, 2001.

XU, B., ZHANG, H., CHEN, K., XU, Q., YAO, Y., GAO, H. Biocontrol of postharvest *Rhizopus* decay of peaches with *Pichia caribbica*. **Current Microbiology**, v. 67, p. 255–261, 2013.

YAMAMOTO, S.; SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y.; MOCHIZUKI, M.; SUZUKI, S. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. **Pest Management Science**, v. 71, n. 5, p. 722-727, 2015.

ZOHORA, U.S.; ANO, T.; RAHMAN, M.S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. **Advances in Microbiology**, v. 6, n. 06, p. 424, 2016.