

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA NO TRÓPICO ÚMIDO –
PPG/ATU

POTENCIAL DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* PARA O BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS DE INTERESSE AGRÍCOLA

VALDIR DA COSTA MENDES

Manaus, Amazonas

Junho, 2023

VALDIR DA COSTA MENDES

**POTENCIAL DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* PARA O BIOCONTROLE DE
FITOPATÓGENOS DE INTERESSE AGRÍCOLA**

Orientador: Dr. Gilvan Ferreira da Silva

Coorientadora: Dra. Claudia Afras de Queiroz

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Agricultura no Trópico Úmido.

Manaus, Amazonas

Junho, 2023

ATA DE DEFESA



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO MESTRADO

Ata da Defesa Pública de **VALDIR DA COSTA MENDES**, ocorrido no dia 15/06/2023, via videoconferência Google Meet.

Aos quinze dias de junho de 2023, às 14h (horário de Manaus/AM), realizou-se a Defesa Pública de Dissertação de **VALDIR DA COSTA MENDES**, aluno do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Agricultura no Trópico Úmido, intitulada "Potencial de bactérias do gênero *Bacillus* para o biocontrole de fitopatógenos de interesse agrícola", sob a orientação do Dr. Gilvan Ferreira da Silva (Embrapa), em conformidade com o Art. 52 do Regimento Geral da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (MCTI/Inpa) e Art. 60 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido, como parte das atividades para conclusão e obtenção do título de **Mestre em Agricultura no Trópico Úmido**. A **Banca Examinadora** foi constituída pelos seguintes membros: Rogério Eiji Hanada (Inpa), Cláudia Majolo (Embrapa) e Joelma dos Santos Fernandes (Embrapa) e tendo como suplente o seguinte membro: Marcos Antonio Soares (UFMG). O Presidente da Banca Examinadora deu início à Seção e informou os procedimentos do exame. A aluna fez uma exposição do seu estudo e ao término foi arguida oralmente pelos membros da Comissão. Após as arguições os membros da banca se reuniram para avaliação e chegaram ao seguinte parecer:

Nome	Parecer	Assinaturas
Rogério Eiji Hanada	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou <input type="checkbox"/> Reprovou	
Cláudia Majolo	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou <input type="checkbox"/> Reprovou	
Joelma dos Santos Fernandes	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovou <input type="checkbox"/> Reprovou	
Menção:	<input type="checkbox"/> "Com Distinção" <input type="checkbox"/> "Com Distinção e Louvor"	

Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente Ata que, após lida e aprovada, foi assinada pela Coordenação:

Obs: A Banca necessita revisar se as correções e sugestões foram atendidas.

Documento assinado digitalmente
gov.br GILVAN FERREIRA DA SILVA
Data: 16/06/2023 18:42:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gilvan Ferreira da Silva
Orientador

Rogério Eiji Hanada
Coordenador do PPG-ATU
PO. N° 205/2016

FOLHA DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



Folha de Aprovação

Banca Julgadora, abaixo assinada, **aprova** a Dissertação de Mestrado:

Título: Potencial de bactérias do gênero *Bacillus* para o biocontrole de fitopatógenos de interesse agrícola

Autor: Valdir da Costa Mendes

Banca Julgadora:

Dr. Rogério Eiji Hanada (Inpa)
(Membro titular)

Dra. Cláudia Majolo (Embrapa)
(Membro titular)



Documento assinado digitalmente
JOELMA DOS SANTOS FERNANDES
Data: 17/06/2023 16:34:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Joelma dos Santos Fernandes (Embrapa)
(Membro titular)

Manaus (AM), 15 de junho de 2023.

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na Publicação (CIP-Brasil)

M538p Mendes, Valdir da Costa

Potencial de bactérias do gênero *Bacillus* para o biocontrole de Fitopatógenos de interesse agrícola / Valdir da Costa Mendes; orientador Gilvan Ferreira da Silva; coorientadora Claudia Afras de Queiroz. - Manaus:[s. l.], 2023.

3.0 MB

64 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido – PPG-ATU) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. *Bacillus*. 2. Fitopatógenos de interesse agrícola. I. Silva, Gilvan Ferreira da . II. Queiroz, Claudia Afras de. III. Título

CDD 579.362

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo, primeiro a Deus, acredito em uma força maior que nos estimula e indica os caminhos a serem percorridos, ajuda nos desafios e nos ampara nos momentos difíceis.

Meus pais, Valdir Araújo Mendes e Raimunda Carolina da Costa por tudo, do início ao fim seguraram a minha mão e nunca me deixaram desistir. Me apoiaram em todas minhas decisões, me acolheram e me dão todo amor do mundo. Lembro que nas primeiras aulas já batia um desespero e eles me acalmaram dizendo que era um processo, que depois ficaria mais fácil e que no fim valeria a pena, e valeu, muito obrigado, amo vocês.

Aos meus irmãos e irmãs, Antônio, Paulo, Jorge, Diana, Daniela, Adriana, Adriele e Camila, seus maridos, esposas e filhos. Representam minha família, minha origem e tudo que de bom que sou, cada um teve importância em alguma etapa desse processo, seja em uma conversa, em uma festa de natal, um aniversário em família, obrigado.

Aos meus tios Silas Taveira e Joana Carolina, minha prima Suélem Taveira e seu namorado João Paulo Braga por me proporcionar conforto e amizade durante minha estadia em Manaus, cedendo um lugar na sua casa sem pedir nada em troca, vocês com certeza terão sempre um lugar especial e podem contar comigo para tudo.

Aos meus orientadores por compartilhar seus conhecimentos. O Dr. Gilvan Ferreira pela enorme paciência, por sempre possibilitar a partir do seu trabalho toda a estrutura necessária para realização do projeto, sempre atendia meus pedidos para que tudo acontecesse com os melhores materiais. A Dra. Claudia Afras, minha co-orientadora, obrigado pelo seu tempo, muitas vezes deixando suas ocupações de lado para me ajudar, a senhora foi muito importante.

Aos meus colegas de programa Laison e Mikael que foram muito importantes no começo com todas as disciplinas, sempre em parceria para conseguirmos aprovação e boas notas.

Aos meus estimados colegas e amigos de laboratório: Ingride Jarline, sempre dando aquele empurrãozinho, ela quem me direcionava quando eu nem sabia por onde começar, sentava comigo e dizia, “Amigo da para fazer assim”, obrigado por cada minuto do seu tempo para me ajudar; Gerodes Vasconcelos, meu amigo desde a graduação, começamos quase juntos e vamos terminar quase juntos, muito importante quebrando vários galhos e dando força, fora todo o bom humor e as piadas; Izabel Correa, sem dúvidas um ser humano de muita luz, sempre muito atenciosa e preocupada, partilhou muitos conhecimentos sem medir esforços, seu futuro será brilhante; Ícaro Nascimento por toda energia positiva e tempo também, saímos a noite do laboratório junto com a Izabel e a Ingride depois de 10 mil fotos dos experimentos, uma companhia maravilhosa. Caio Césio, sempre animando e contagiando nosso ambiente de trabalho, obrigado pelas cartas, pelo sorriso e contas para preparar as soluções, químico de milhões.

Aos meus colegas Annie de Souza, Carolina de Amorim, Samara Santos e Rafael Pinto por dividir as alegrias, risadas, preocupações diárias e o nervosismo para entrar na sala do chefe.

Ao meu colega de profissão Elison Sevalho por toda instrução durante o desenvolvimento do meu projeto, sempre dando dicas e contribuindo para que tudo desse certo, separados por um laboratório.

Aos técnicos do laboratório de Biologia Molecular da Embrapa, Jefferson Cruz e Irani por todo auxílio no manuseio dos equipamentos, nas dúvidas, sugerindo métodos e facilitando meu trabalho.

Aos meus amigos externos que me ajudaram quando tudo se complicou: Gabriela Rodrigues, Hilcielem Ferreira, Marilson, Tiago Taveira, Rafael Magno, Dennys Libório, Erivan Lima, Patricia Laís, Paula Thaís, Brenner Kássio, Eudson Bernardo, Welisson Alexandre, Manuela Taveira, Juliana Beatriz, Priscila Lima, Dayane Mago, Adeilson Barbosa, Joyciane Araújo, Marcelo Freitas, Diego Fogassa, Ribamar Junior, Thaina Barbosa, Nalbert Neto, Chistian Souza, Victória Edwards, Marcelo Braga, Sandra Souza, Rugeri Costa, Ana Crispim, Walentin Costa.

Ao Programa de Pós Graduação em Agricultura no Trópico Úmido do INPA, na pessoa do Professor Rogério Eiji Hanada. A Empresa Brasileira em Pesquisa Agropecuária- Embrapa por toda estrutura. A Fundação de Amparo a Pesquisas da Amazônia- FAPEAM pela concessão de bolsas de pesquisa e apoio.

RESUMO

O gênero *Bacillus*, inclui espécies de interesse industrial, biotecnológico e é o mais utilizado para diferentes formas de controle biológico na agricultura. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo foi avaliar o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* para o biocontrole de fitopatógenos de interesse agrícola. Para isso, duas linhagens *Bacillus* (MAD 168 e MPUR 39.2) pertencente à coleção biológica do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental-CPAA, foram submetidas a avaliação *in vitro* para verificar o potencial antagonista frente a fitopatógenos, análise *in planta* para testar o controle biológico dos sintomas da *Rhizoctonia* em plantas de feijão-caupi (somente a linhagem MPUR 39.2), análise qualitativa da produção de enzimas hidrolíticas, sequenciamento do genoma visando identificação de genes relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários e análise de microscopia e filogenômica para confirmar a identidade das espécies. Os isolados MAD 168 e MPUR 39.2 foram capazes de inibir acima de 50% *in vitro* o crescimento micelial de 8 e 11 fungos fitopatogênicos com índices variando de 53,3 a 79,5% e 58,1 a 97,1%, respectivamente. Nos testes *in planta* utilizando o isolado MPUR 39.2 no controle do tombamento causado por *Rhizoctonia* sp. em feijão-caupi (cultivar BRS Novaera) não houve diminuição da severidade. Quando avaliado para produção enzimática *in vitro* de amilase, protease, quitinase, lipase, produção de sideróforos e solubilização de fosfato, somente a linhagem MAD 168 apresentou atividade para celulase. A análise filogenômica indicou que o isolado MAD 168 pertence a espécies *Bacillus tropicus* (ANIb 95,38%, ANIm 95,89%) e o isolado MPUR 39.2 a espécie *Bacillus subtilis* (ANIb 97.84, ANIm 98.86). Quanto a identificação de BGC's a linhagem MAD 168 apresenta 10 clusters para produção de metabólitos secundários, destes, três apresentam similaridades de 40 a 85% com clusters já conhecidos, como fengicina, bacilibactina (peptídeos não ribossomais - NRPS), Turincina H (policetídeos sintase-PKS); e a linhagem MPUR 39.2 apresenta 14 clusters para produção de metabólitos secundários, destes, doze apresentam similaridades de 7 a 100% com clusters já conhecidos, como bacilibactina, surfactina e a plipastatina (peptídeos não ribossomais - NRPS); ácido carbapeno, fengicina e bacilo (policetídeos sintase-PKS); carotenóide (terpenos); taislantatina (epipeptídeo); subtilosina A (sactipeptídeo); ácido pulcherrimínico (CDPS).

Palavras Chave: Antagonismo, Mineração genômica, Agrupamento gênico, Biocontrole, Agricultura sustentável.

ABSTRACT

The genus *Bacillus* includes species of industrial and biotechnological interest and is the most used for different forms of biological control in agriculture. Thus, the main objective of this study was to evaluate the potential of bacteria of the genus *Bacillus* for the biocontrol of phytopathogens of agricultural interest. For this, two *Bacillus* strains (MAD 168 and MPUR 39.2) belonging to the biological collection of the Laboratory of Molecular Biology of Embrapa Western Amazonia-CPAA, were submitted to *in vitro* evaluation to verify the antagonistic potential against phytopathogens, *in plant* analysis to test the biological control of *Rhizoctonia* symptoms in cowpea plants (line MPUR 39.2 only), qualitative analysis of the production of hydrolytic enzymes, genome sequencing to identify genes related to the biosynthesis of secondary metabolites and microscopy and phylogenomic analysis to confirm the species identity. MAD 168 and MPUR 39.2 isolates were able to inhibit over 50% *in vitro* mycelial growth of 8 and 11 phytopathogenic fungi with indices ranging from 53.3 to 79.5% and 58.1 to 97.1%, respectively. *In plant* tests using the MPUR 39.2 isolate to control damping off caused by *Rhizoctonia* sp. in cowpea (cultivar BRS Novaera) there was no decrease in severity. When evaluated for *in vitro* enzymatic production of amylase, protease, chitinase, lipase, siderophore production and phosphate solubilization, only the MAD 168 strain showed cellulase activity. The phylogenomic analysis indicated that isolate MAD 168 belongs to *Bacillus tropicus* species (ANIb 95.38%, ANIm 95.89%) and isolate MPUR 39.2 to *Bacillus subtilis* species (ANIb 97.84, ANIm 98.86). As for the identification of BGC's, the MAD 168 lineage presents 10 clusters for the production of secondary metabolites, of these, three present similarities of 40 to 85% with clusters already known, such as fengycin, bacilibactin (non-ribosomal peptides - NRPS), Turincina H (polyketides synthase - PKS); and the MPUR 39.2 strain has 14 clusters for the production of secondary metabolites, of which twelve have similarities from 7 to 100% with already known clusters, such as bacilibactin, surfactin and plipastatin (non-ribosomal peptides - NRPS); carbapene acid, fengycin and bacillus (polyketides synthase-PKS); carotenoid (terpenes); tallantatin (epipeptide); subtylosin A (sactpeptide); pulcherriminic acid (CDPS).

Keywords: Antagonism, Genomic mining, Gene clustering, Biocontrol, Sustainable agriculture.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Gênero <i>Bacillus</i>	12
2.2 Aplicação do gênero <i>Bacillus</i> como agente de Biocontrole	13
2.3 Aplicação de <i>Bacillus</i> spp. na promoção do crescimento em plantas	15
2.4 Aplicação de <i>Bacillus</i> spp. como indutores de resistência em plantas	16
2.5 Mineração genômica e análise filogenômica	18
2.6. Substâncias bioativas identificadas em espécies do gênero <i>Bacillus</i>	19
3.OBJETIVOS	23
3.1 Geral	23
3.2 Específicos	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 Macromorfologia e micromorfologia das linhagens <i>Bacillus</i> sp. MAD 168 e MPUR 39.2	24
4.2 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antagonista de bactérias isoladas de sedimentos de rios amazônicos	24
4.3 Avaliação <i>in planta</i> do isolado MPUR 39.2 no biocontrole de <i>Rhizoctonia</i> INPA 2942	26
4.4 Potencial para produção de enzimas hidrolíticas	29
4.5 Produção de compostos promotores de crescimento de plantas	30
4.6 Extração de DNA, sequenciamento, montagem, anotação e análises	30
4.7 Mineração genômica, identificação e caracterização de BGCs	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Macromorfologia e micromorfologia das linhagens <i>Bacillus</i> sp. MAD 168 e MPUR 39.2	33
5.2 Análise filogenômica	33
5.3 Genômica comparativa de <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168 e <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2	39
5.4 Mineração de clusters gênicos biossintéticos em <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168 e <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2	41
5.5 Potencial antagônico <i>in vitro</i> dos isolados <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168 e <i>Bacillus subtilis</i> 39.2. contra diferentes fitopatógenos <i>in vitro</i>	47

5.6 Análise <i>in planta</i> do efeito do <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2 contra <i>Rhizoctonia</i> INPA 2942 em feijão-caupi	51
5.7 Análise qualitativa da produção de amilase, celulase, protease, quitinase, sideróforos e solubilização de fosfato.	53
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de metabólitos secundários de <i>Bacillus</i> .	19
Figura 2 - Ilustração da escala de nota de severidade da infecção de <i>Rhizoctonia solani</i> em plântulas de feijão.	29
Figura 3 - Macromorfologia e Micromorfologia de <i>Bacillus</i> sp.: a e c) Características morfológicas das linhagens MPUR 39.2 e MAD 168, respectivamente, cultivadas em meio BDA em placas de Petri de 9 mm de diâmetro; b e d) MEV da linhagens MPUR 39.2 e MAD 168 (2 µm), respectivamente.	33
Figura 4 - Heatmap de identidade média de nucleotídeos por ortologia (OrthoANI) entre o isolado <i>Bacillus</i> sp. MAD 168 e diferentes espécies tipo do gênero <i>Bacillus</i> calculados pelo software OAT com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 usado como um grupo externo (<i>outlier</i>).	34
Figura 5 - Relações filogenômica utilizando a plataforma TYGS para isolado MAD 168 e espécies de <i>Bacillus</i> filogeneticamente relacionadas.	36
Figura 6 - Heatmap de identidade média de nucleotídeos por ortologia (OrthoANI) entre o isolado <i>Bacillus</i> sp. MPUR 39.2 e diferentes espécies tipo do gênero <i>Bacillus</i> calculados pelo software OAT com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 usado como um grupo externo (<i>outlier</i>).	37
Figura 7. Ontologia de genes preditos em <i>Bacillus tropicus</i> MAD168.	40
Figura 8 - Ontologia de genes preditos em <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2	41
Figura 9 - Sintenia para identificação de genes pertencentes ao BGCs caracterizados no genoma da espécie <i>B. tropicus</i> MAD 168	44
Figura 10 - Sintenia para identificação de genes pertencentes ao BGCs caracterizados no genoma da espécie <i>B. subtilis</i> MPUR 39.2	46
Figura 11 - Atividade antagônica <i>in vitro</i> das linhagens de <i>Bacillus</i> MAD 168 e MPUR 39.2 obtida por meio do teste de cultura pareada.	50
Figura 12 - Avaliação fenotípica da parte aérea e sistema radicular em feijão-caupi cultivar BRS Novaera sob diferentes tratamentos na avaliação do efeito de <i>Bacillus</i> MPUR 39.2 no tombamento causado por <i>Rhizoctonia</i>	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias utilizadas nas análises <i>in vitro</i> contra fitopatógenos de interesse agrícola.	25
Tabela 2 - Lista de fitopatógenos e respectivos hospedeiros utilizados <i>in vitro</i> .	26
Tabela 3 - Identificação filogenômica de MAD 168 e MPUR 39.2 por meio de comparação entre genomas de espécies de <i>Bacillus</i> mais relacionadas	35
Tabela 4 - Características do genoma do <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168 e da espécie mais relacionada <i>Bacillus tropicus</i> N24 T.	39
Tabela 5 - Análise comparativa do genoma de <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168 e <i>Bacillus tropicus</i> N24 T.	39
Tabela 6 - Características do genoma do <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168 e da espécie mais relacionada <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2	40
Tabela 7 - Análise comparativa do genoma de <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2 e <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051 T	41
Tabela 8 - Grupos de genes de metabólitos secundários identificados no genoma de <i>Bacillus tropicus</i> MAD 168.	43
Tabela 9 - Grupos de genes de metabólitos secundários identificados no genoma de <i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2	45
Tabela 10 - Avaliação do efeito <i>Bacillus</i> MPUR 39.2 na severidade do tombamento causado por <i>Rhizoctonia</i> sp. em feijão-caupi (cultivar BRS Novaera).	51
Tabela 11 - Avaliação qualitativa de atividade enzimática, produção de sideróforos e solubilização de fosfato	54

1. INTRODUÇÃO

As diversas doenças causadas por agentes biológicos como vírus, bactérias, fungos e nematoides limitam a produtividade dos principais cultivos agrícolas ao redor do mundo. Em regiões tropicais, as altas temperaturas e umidade favorecem a proliferação de microrganismos patogênicos, isso pode ocasionar a diminuição da produção agrícola, levando a perdas de até 100% da lavoura, gerando prejuízos econômicos e sociais (Pereg e Tolessa, 2019).

Atualmente, a utilização de compostos químicos de alto e médio risco, é a alternativa mais utilizada pelo setor agrícola para diminuir a incidência de patógenos de plantas, contudo, o uso intensivo desses produtos vem causando problemas ambientais à saúde humana (Lopes-Ferreira *et al.*, 2021). Tal fato se dá, por conta da utilização contínua desses compostos, o que tem provocado doenças como câncer e problemas respiratórios (Dhananjayan e Ravichandran, 2018).

Um desses patógenos é a espécie de fungos *Rhizoctonia solani*. As perdas agrícolas causadas por esse fitopatógeno variam de campo para campo e podem diminuir até 60% do rendimento das cultivares (Buhre, *et al.*, 2009). Os sintomas da *R. solani* agem nas raízes das plantas causando uma redução significativa do seu comprimento, o que afeta negativamente o desenvolvimento da parte aérea e consequentemente o produto final (Klutch, *et al.*, 2010).

Responsável pelo tombamento em culturas de beterraba, os sintomas causados por esse fungo são caracterizados por lesões marrons a pretas no hipocótilo e nas raízes das plantas (Harveson, *et al.*, 2006). Em condições ambientais desfavoráveis, o patógeno *R. solani* se adapta às condições climáticas adversas formando escleródios, essas estruturas vão permitir que ele sobreviva no solo por muitos anos. Quando as condições ambientais favoráveis são retomadas, esses escleródios germinam e produzem micélios infecciosos que se inserem no córtex radicular das plantas e induzem doenças no tecido interno (Farhaoui, *et al.*, 2023).

Como estratégia para reduzir os efeitos negativos do uso dos defensivos químicos tem-se investido em produtos de origem biológica, sendo este, um método de controle de pragas e doenças, ambientalmente mais seguro e sustentável (Carmona-Hernandez *et al.*, 2019).

Os principais agentes de biocontrole são os microrganismos, mais especificamente, fungos e bactérias. Neste trabalho, abordaremos as bactérias do gênero *Bacillus*, estas, destacam-se devido à formação de endósporo e da grande versatilidade nos mecanismos de ação contra fitopatógenos (Zhou *et al.*, 2021), podem ser encontrados em uma vasta diversidade de ambientes, o cultivo é simples, possuem rápido crescimento em grande número de substratos e não há relatos de patogenicidade em plantas superiores (Jan *et al.*, 2019). São ainda capazes de inibir fitopatógenos por meio de competição, produção de metabólitos primários e secundários (Stoica *et al.*, 2019).

Devido à alta similaridade entre as linhagens de *Bacillus*, existe uma grande dificuldade de identificação das espécies. Contudo, o sequenciamento de nova geração (NGS), tem permitido a obtenção de genoma completo com baixo custo facilitando desta forma a identificação confiável por meio da comparação filogenômica de centenas ou milhares de segmentos de DNA que compõem cada genoma. O sequenciamento do genoma combinado com ferramentas de bioinformática para mineração genômica de metabólitos secundários, também contribui para identificação de novos compostos que podem, ou não, estar sendo expressos sob condições laboratoriais (Albarano *et al.*, 2020 e Lebedeva *et al.*, 2021).

Diante do exposto, este trabalho propõe a investigação do potencial biotecnológico de linhagens de bactérias do gênero *Bacillus*, visando o desenvolvimento de bioprodutos para o controle de doenças de importância agrícola.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* foi descrito pela primeira vez em 1872 por Ferdinand Cohn, que observou o ciclo de vida desta bactéria e suas principais características, como, resistência ao calor, germinação e formação de endósporos (Zeigler, 2021). Espécies desse gênero habitam diferentes habitats que incluem solos, lagos, sedimentos marinhos, fontes termais, areias do deserto, tecidos de plantas e animais (Liu *et al.*, 2019). São bactérias Gram-positivas, formadoras de endósporos, com baixo teor de conteúdo G+C, possuem forma de bastonete, são aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas com 631 espécies publicadas validamente deste gênero até o momento da pesquisa (<https://lpsn.dsmz.de/phylum/bacillota>) (Son *et al.*, 2019). A macromorfologia das colônias de *Bacillus* spp. varia de aspecto viscoso a cremoso, esbranquiçado com bordas circulares ou arredondadas (Mandic-Mulec *et al.*, 2015).

As colônias possuem habilidades fisiológicas diversificadas e podem ser: mesofílicas, termofílicas, acidofílicas e alcalifílicas. Devido a isto, podem ser resistentes a condições ambientais adversas e onipresentes em uma ampla gama de habitats, principalmente em solos e rizosferas, compreendendo até 95% das populações de bactérias Gram-positivas destes ambientes (Shafi *et al.*, 2017).

O gênero *Bacillus* está classificado no Domínio Bacteria, Filo Firmicutes; Classe Bacilli; Ordem Bacillales; e Família Bacillaceae. Segundo LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (<https://www.bacterio.net/genus/bacillus>), atualmente existem aproximadamente 620 espécies reconhecidamente descritas (até o momento desta pesquisa).

Bactérias do gênero *Bacillus*, além de produzirem endósporos extremamente tolerantes e crescimento rápido em diferentes meios de culturas, são fontes promissoras de metabólitos bioativos, possuindo a capacidade de sintetizar uma ampla variedade de antibióticos e enzimas hidrolíticas, sendo desta forma, cobijado por indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, têxtil e agrícolas (Petrillo *et al.*, 2021).

No contexto agrícola, alternativas sustentáveis como os produtos biológicos, são fundamentais para diminuir ou substituir a utilização de defensivos químicos de

alta toxicidade. O gênero *Bacillus* spp. se tornam fortes candidatos no desenvolvimento de produtos de origem biológica, uma vez que possuem potencial para o combate de pragas e doenças prejudiciais à agricultura (Luo, *et al.*, 2023).

2.2. Aplicação do gênero *Bacillus* como agente de Biocontrole

Uma importante estratégia para o desenvolvimento integrado de práticas sustentáveis é a utilização de microrganismos no manejo agrícola com a finalidade de melhorar o aproveitamento de nutrientes, reduzir doenças e pragas, diminuir o uso de produtos químicos e aumentar a produtividade das culturas (Jiang *et al.*, 2018). O biocontrole de fitodoenças ocorre devido a interações entre o microrganismo biocontrolador e os agentes patogênicos, sendo a antibiose, a atividade mais comum (Myo *et al.*, 2019).

A antibiose ocorre quando uma ou mais moléculas produzidas pelo microrganismo biocontrolador tem impacto sobre o patógeno. As bactérias do gênero *Bacillus* spp., estão entre as mais bem estudadas quanto ao seu potencial como agentes de ação em biocontrole, isto porque, estas bactérias são metabolicamente versáteis, permitindo assim a biossíntese de compostos bioativos estruturalmente complexos, tornando-as excelentes candidatas em diversas aplicações biotecnológicas (Gautam *et al.*, 2019).

As espécies do gênero *Bacillus* podem atuar como rizobactérias com atividade antagonista capaz de ser resistente a condições adversas na forma de endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos, podendo estimular mecanismos desejáveis às plantas cultiváveis, como a nodulação em leguminosas, fixação biológica de nitrogênio e absorção de nutrientes e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com versatilidade nos mecanismos de ação e inibição das defesas dos fitopatógenos (Jiang *et al.*, 2018; Hashem *et al.*, 2019). Resultados positivos na inibição de crescimento micelial de fungos por *Bacillus* spp. tem sido amplamente demonstrado.

Estudos recentes mostraram que o isolado de *Bacillus subtilis* V26 conseguiu inibir o crescimento de diferentes fitopatógenos do gênero *Fusarium* como: *F. oxysporum*, *F. Solani*, *F. graminearum*, e *F. sambucinum* de 54,7 a 85,3%, em batata (*Solanum tuberosum* L.). a linhagem testada, também diminuiu significativamente a severidade da podridão seca, ocasionada por *Fusarium*, em 42,8–63,8%, após 21

dias de inoculação, mostrando eficientes mecanismos de controle (Khedher *et al.* 2021).

Gautam *et al.*, (2019) relataram em seus estudos, alto potencial antagonista da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, principal agente causador de cancro-bacteriano em tomate estaqueado, evidenciando a redução *in vitro* da severidade da doença em aproximadamente 65%. Como resultados, os autores concluíram que os testes forneceram um amplo espectro de atividades antifúngicas, podendo ser uma alternativa eficaz em relação aos fungicidas químicos.

No estudo de Jiang *et al.*, (2018) foi comprovada a eficácia da formulação de biopesticida produzidos com *Bacillus velezensis* 5YN8 contra o patógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*. Foi observada a inibição do crescimento micelial, diminuição da incidência do mofo cinzento em folhas de pimenta e maior eficácia no tratamento preventivo em relação ao curativo, essas três observações indicam que a formulação pode atuar como um pesticida em potencial.

Os resultados experimentais com *Bacillus velezensis* NKG-2, mostraram que esta bactéria exibiu atividade antagônica contra os principais patógenos fúngicos do tomate (*Solanum lycopersicum* L.), sendo eles: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fulvia fulva* e *Ustilaginoidea virens*. O ensaio de biocontrole *in vivo* com plantas de tomate inoculadas apenas com fungos fitopatogênicos mostraram uma severidade da doença de 65%, enquanto as plantas inoculadas com bactérias não apresentavam quaisquer sintomas até o 6º dia, entretanto, duas semanas após a infecção, a gravidade da doença aumentou para 38,5% (Myo *et al.*, 2019).

Toral *et al.* (2018) mostraram a capacidade antagônica de uma linhagem de *Bacillus velezensis* XT1 CECT 8661 contra o fitopatógeno necrotrófico *Botrytis cinerea*, agente causal da "podridão cinzenta". O mesmo ainda enfatizou que o isolado foi capaz de co-produzir três diferentes tipos de lipopeptídeos: surfactina, fengicina e iturina, onde estas moléculas podem estar relacionadas com atividade inibitória do crescimento fúngico, além de promover alterações morfológicas das hifas, como danos, quebras e inchaços.

Os estudos acima relacionados, vem mostrando o potencial que *Bacillus* spp. têm para a produção de inoculantes biológicos aplicados à agricultura. Além disso,

também podemos destacar que esses microrganismos colaboram para promoção de crescimento vegetal.

2.3. Aplicação de *Bacillus* spp. na promoção do crescimento em plantas

Nos últimos anos, muitos avanços têm sido alcançados na promoção do crescimento com base em microrganismos capazes de fixar nutrientes no solo favorecendo diretamente o crescimento das plantas. Nesse contexto, podemos destacar as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), sendo estas capazes de colonizar as raízes das plantas e estimular o crescimento e rendimento das cultivares de interesse agrícola (Chen *et al.*, 2019).

Entre estas, existem as RCPC (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas), estas, são capazes de entrar no interior da raiz, induzir resistência à ampla gama de patógenos vegetais, bem como promover crescimento via mecanismos como fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, síntese de sideróforos e a solubilização de fosfato, além de outros benefícios indiretos para o desenvolvimento das plantas (Franco-Sierra *et al.*, 2020).

A capacidade de produção de hormônios vegetais (fitoestimulação) pelas BPCP é considerada um dos mecanismos mais importantes pelo qual muitas bactérias promovem o crescimento das plantas, a divisão celular e a extensão das raízes. Podemos destacar como os principais fitormônios: as auxinas, as citocininas e as giberelinas (Kashyap *et al.*, 2019).

As auxinas são produzidas como resultado do metabolismo das BPCP e juntamente com os hormônios endógenos da planta influencia no crescimento vegetal, divisão, expansão e diferenciação de células e tecidos vegetais, além do alongamento da raiz. As citocininas são derivadas de purinas que promovem e participam da divisão celular e do crescimento primário das raízes das plantas, dentro das diversas espécies de bactérias, os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Azospirillum* se destacam por serem os principais produtores desse composto. As giberelinas também podem ser sintetizadas por bactérias, elas estimulam o sistema radicular, melhorando a aquisição de nutrientes para facilitar o crescimento da parte aérea da planta (Miljaković *et al.*, 2020).

A espécie *Bacillus subtilis* EA-CB0575 isolada da rizosfera de bananeira mostrou potencial RPCP devido à sua capacidade genômica e fenotípica

relacionada aos mecanismos de promoção do crescimento vegetal. Essas características foram determinadas usando testes bioquímicos *in vitro*. A linhagem mostrou-se produtora de lipopeptídeos (surfactina e fengicina), solubilizadora de fosfato, além de fixar nitrogênio e produzir compostos de indol e sideróforos (Franco-Sierra *et al.*, 2020).

2.4. Aplicação de *Bacillus* spp. como indutores de resistência em plantas

Os diferentes mecanismos de defesa de uma planta (estruturais e bioquímicos) são geneticamente controlados e dependem da expressão dos mesmos no momento e magnitude adequados após o contato do patógeno com o hospedeiro. A possibilidade de ativação desses genes, em determinadas condições, torna as plantas mais resistentes aos patógenos, criando-se então o fenômeno da indução de resistência em plantas (Gorshkov *et al.*, 2022).

A ocorrência da resistência pode ser de caráter específico (atinge determinadas espécies de patógenos), ou de caráter não específico (atinge várias doenças ao mesmo tempo), ambos os casos são chamados de resistência sistêmica. Vale ressaltar que o aumento do nível de resistência usando agentes externos, sem a modificação do genoma da planta, é conhecido como resistência induzida ou adquirida (Rajamanickam e Nakkeeran, 2020).

Pode-se definir como resistência sistêmica induzida (RSI) aquela que acontece quando plantas, após a exposição a agentes bióticos (microrganismos) ou abióticos (fatores químicos) passam a induzir à defesa contra o patógeno, enquanto permanecem espacialmente separados do agente indutor (Lastochkina *et al.*, 2019).

A resistência sistêmica adquirida (SAR) ocorre após uma infecção local pelos patógenos microbianos nas plantas, o que faz com que elas produzam forte resistência nos tecidos distais para lidar com os ataques bióticos subsequentes. A SAR pode conferir grandes respostas de defesa e resistências de amplo espectro a doenças em plantas. Em geral, é ativada por substâncias sinalizadoras geradas nos locais de infecção, e estas podem ser rapidamente transportadas para os tecidos sistêmicos através do floema (GAO *et al.*, 2021).

Como potenciais agentes indutores bióticos, têm sido avaliadas as Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP) que habitam o solo e com frequência são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas. Dentre os

mecanismos de ação das rizobactérias no solo a competição por nutrientes, antibiose, produção de enzimas extracelulares e indução de resistência são os mais citados para explicar o controle de patógenos de solo, como também de doenças foliares (Dutta *et al.*, 2019).

O controle biológico com rizobactérias relacionado à indução de resistência já é um método comprovado. Rajamanickam e Nakkeeran (2020) utilizaram *Bacillus amyloliquefaciens* como um promissor produtor do gene flagelina contra a doença de necrose da pimenta (*Capsicum annuum* L.). No tocante, o antagonismo a fitopatógenos, o isolado mostrou-se ineficiente no controle de doenças foliares de pimenta quando pulverizado preventivamente nas folhas. Este fato, aliado ao aumento da peroxidase nas folhas e resistência não específica, sugere que o controle das doenças foliares proporcionadas pela inoculação do isolado na rizosfera pode ter sido fundamentado na resistência induzida.

Ao avaliar os custos adaptativos da indução de resistência, antes da chegada do patógeno, em feijoeiro induzido por um indutor biótico (*Bacillus subtilis*) e um abiótico (ácido salicílico - AS) Lastochkina *et al.* (2019) estudaram resistência induzida à cultura de trigo (*Triticum aestivum* L.) contra a podridão radicular instigada por *Fusarium culmorum* (FRR). O estudo com *B. subtilis*, AS, e especialmente *B. subtilis* + AS aumentou o crescimento da planta (raiz e comprimento do rebento, biomassa fresca e seca), os resultados indicam que *B. subtilis* sozinho e em mistura com AS pode ser usado como um agente ecológico eficaz para melhorar o crescimento do trigo e a tolerância sob a influência de seca.

Saengchan *et al.* (2022) investigaram o efeito de elicitores como ácido salicílico juntamente com *Bacillus subtilis* isolado JN2-007 na indução de resistência à podridão radicular por *Fusarium solani* em mandioca. Os resultados sugeriram ácido salicílico e a linhagem JN2-007 reduziram o crescimento micelial de *F. solani* de (11,83%–57,73% até o 7º dia, bem como a severidade da doença nas plantas de mandioca em 39,58.

Estes resultados somados às pesquisas com as novas tecnologias ômicas, podem contribuir e avançar significativamente os estudos a partir de *Bacillus* spp. em prol do desenvolvimento de um produto biológico capaz de induzir resistência. Não somente resistência, mas também pode vir a trazer benefícios para a planta na questão nutricional, uma vez que, este microrganismo também está associado a solubilização de nutrientes facilitando a absorção pela planta.

2.5 Mineração genômica e análise filogenômica

A abordagem genômica está mudando profundamente a taxonomia bacteriana atual. O conhecimento de toda a sequência do genoma de linhagens bacterianas e as análises da composição funcional de genes e clusters gênicos relacionados ao metabolismo secundário, tem somado valor às características fenotípicas para a classificação bacteriana e a identificação taxonômica. As comparações de genomas completos das espécies tipo usando identidade média de nucleotídeos (ANIs) ou cálculos de distância genoma-genoma (GGDCs) são os novos padrões de ouro para circunscrição de espécies (Adeniji e Babalola, 2019).

O genoma completo ainda pode ser utilizado para estudos de predição metabolômica e esta abordagem é importante visto que metabólitos derivados de microrganismos constituem uma importante fonte de antibióticos, agentes anticâncer, inseticidas, imunossupressores, herbicidas, entre outros. Muitos metabólitos especializados em bactérias e fungos são biossintetizados por vias metabólicas cujos os genes encontram-se fisicamente um ao lado do outro formando grupos de genes responsáveis pela biossíntese de um produto natural, este conjunto de genes é conhecido como cluster gênico biossintético (do inglês *Biosynthetic Gene Cluster -BGC*) (Zhang *et al.*, 2019).

Em outras palavras, os BGCs compreendem um grupo de genes fisicamente co-localizados os quais codificam enzimas para a biossíntese de um metabólito específico. A descoberta de novas vias metabólicas está sendo habilitada pela crescente disponibilidade de alta qualidade de sequenciamento de genomas juntamente com o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para identificar clusters de genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos primários e secundários (Othoum *et al.*, 2018).

Dezenas de ferramentas estão disponíveis para a mineração genômica de BGCs e para a identificação, caracterização e classificação de classes de produtos naturais, como os peptídeos antimicrobianos que podem ser auxiliados por ferramentas online como o algoritmo antiSMASH e o *Antimicrobial Peptide Database* (APD), utilizadas para análise de sequências de peptídeos (Zhang *et al.*, 2019).

Algoritmos destinados especificamente à mineração de genes bacteriocinas têm sido desenvolvidos e aperfeiçoados nos últimos anos. Por exemplo, o software BAGEL 4 permite identificar e visualizar agrupamentos de genes no DNA

procariótico envolvido na biossíntese de peptídeos ribossômicos sintetizados e pós-translacionalmente modificados (RiPPs) e bacteriocinas (não modificadas) (Pahalagedara *et al.*, 2021). Portanto o sequenciamento dos genomas e posterior análises de BGCs com o suporte das ferramentas da bioinformática, tornam possível a descoberta, classificação e previsão de novos produtos naturais.

2.6. Substâncias bioativas identificadas em espécies do gênero *Bacillus*

As espécies de *Bacillus* são importantes produtoras de metabólitos bioativos, com aplicação em diferentes setores das indústrias, principalmente o agrícola (Engelbrecht *et al.*, 2018). Diversos compostos bioativos têm sido usados no intuito de desenvolver novos produtos para o controle de doenças de importância agrícola (Belbahri *et al.*, 2017).

Os compostos produzidos por *Bacillus* podem ser classificados em ribossomais (composto por aminoácidos de origem ribossomal) e não-ribossomais (sintetizado por mega sintases) como pode ser observado na Figura 1.

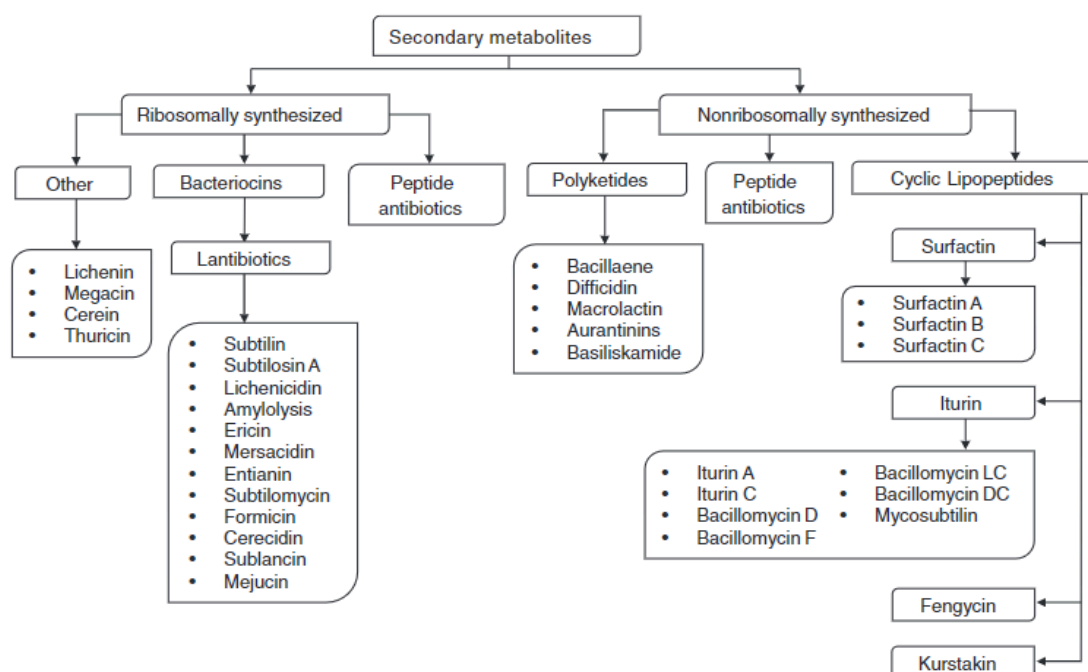


Figura 1. Classificação de metabólitos secundários de *Bacillus*. **Fonte:** Horak *et al.*, (2019).

As cadeias que formam a estrutura principal dos policetídeos são sintetizadas pelo grupo de enzimas policetílicas sintetases (PKSs). De forma similar, os

peptídeos não ribossomais são biossintetizados pelos peptídeos sintetases não-ribossomais (NRPSs), que, ao contrário dos ribossomos, são independentes do RNA mensageiro, esses peptídeos não ribossomais possuem, muitas vezes, estruturas lineares, cíclicas e/ou ramificadas ((Horak *et al.*, 2019; Fazle e Baek, 2020).

Os lipopeptídeos destacam-se por possuírem duas propriedades desejáveis: tolerância e seletividade (Kaspar *et al.*, 2019). A iturina, produzida por *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. megaterium* com ótima atividade microbiana (Wang *et al.*, 2020); e a Gageostatina que é um lipopeptídeo linear produzido por *B. subtilis*, tendo em sua composição a atividade antifúngica. Essas substâncias tornam-se apropriadas para aplicações agrícolas, como agentes de biocontrole e fertilizantes (Kaspar *et al.*, 2019).

Vários outros lipopeptídeos foram caracterizados pela ação de suas aplicações biológicas. No estudo de Ajesh *et al.* (2013), foi caracterizado um novo lipopeptídeo isolado a partir de *B. cereus*, o composto kannurin, esse lipopeptídeo pertencente à classe das surfactinas apresenta uma cadeia heptapeptídica cíclica composta pela sequência de aminoácidos Leu-Asp-Val-Leu-Leu-Leu-Leu, possuindo propriedades antifúngicas.

Zhou *et al.* (2020) identificaram dois novos lipopeptídeos homólogos isolados de *Bacillus* sp., a C14 iturina W e a C15 iturina W, elas possuem como característica, sequências de β -aminoácidos graxos idênticas (Asn-Ser-Asn-Pro-Tyr-Asn-Gln). Isso se torna importante, uma vez que a iturina W possui potencial para o controle biológico de doenças de plantas, especialmente para a brusone do arroz causada por *Magnaporthe grisea*.

Recentemente, foi isolado um lipopeptídeo cíclico da espécie *Bacillus amyloliquefaciens* SJ100001, o Epichlicin, este composto teve maior inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* SJ300024 quando comparado com Hymexazol um pesticida comercial, indicando sua ótima aplicação como biocontrolador (Ren *et al.*, 2022).

Além dos lipopeptídeos, são conhecidos também os policetídeos. Esta é uma classe de substâncias bioativas com estruturas diversas que exibem propriedades farmacológicas. Exemplos destas substâncias e suas propriedades, são os policetídeos bacilane, difcidina e macrolactina, que agem como antibióticos e também na inibição da síntese proteica em organismos procariontes com estrutura

linear composta por ligações amidas. Estes policetídeos são produzidos pelas espécies de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* (Oliševska *et al.*, 2019).

As bacteriocinas, outra classe de substâncias bioativas, são produzidas por mais de 99% das bactérias, e são de origem ribossomal. As espécies *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* produzem uma variedade de bacteriocinas incluindo a subitilina, amilociclicina e a mersacidina (Kumariya *et al.*, 2019). Para a espécie *Bacillus coagulans* CGMCC 9951, as bacteriocinas identificadas como compostos bioativos incluem em sua composição, a Circularina A e a Amilociclicina, ambas apresentaram nos resultados, atividade antibacteriana elevada (Zhang *et al.*, 2022).

Outras substâncias bioativas identificadas de espécies do gênero *Bacillus* são os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs), descritos como agentes de biocontrole de fitopatógenos e como indutores do crescimento de plantas. Os COVs são metabólitos hidrofóbicos de baixo peso molecular (<400 Da) e apresentam alta pressão de vapor em condições ambientais (Rios-Navarro *et al.*, 2021).

Esses compostos pertencem a diferentes classes químicas, que incluem principalmente compostos de origem terpênica, derivados de ácidos graxos, álcoois, cetonas, lactonas, compostos aromáticos e ésteres (Ngo *et al.*, 2021).

Os COVs identificados no estudo de Wu *et al.* (2019), compreende nove cetonas (acetoina; 2-heptanona; 2-nonanona; 2-nonadecanona; 2-undecanona; 2-dodecanona; 2-tridecanona; e Bíciclo[2.2.1]heptona, 2,2,3-trimetil-), três álcoois (2,3-butanediol; 2-etil-1-hexanol; e o 2-undecanol) e três alcoílas (2,3-dimetildecano, 2,4,6-trimetil-decano e o 2,6,11-trimetil-dodecano), estes compostos produzidos pelo *B. amyloliquefaciens* L3, demonstraram ação de promoção do crescimento de plantas e atividade antifúngica contra *F. oxysporum*, agente causal da murcha da melância.

Recentemente, Ghazala *et al.* (2022) demonstrou mais um exemplo de atividade antagônica realizada pelos COVs, neste estudo foram observadas *in vitro* a ação inibitória desses compostos contra três fitopatógenos (*F. verticillioides*, *F. graminearum* e *Rhizoctonia solani*). Responsáveis pelas atividades antagônicas, os compostos descritos foram o ácido 2-piridinocarboxílico, benzaldeído, pentadecano, tridecano 1-(2-Hidroxyethoxy), fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletil), 3-hidroxi-4,4-dietil dihidro(2–13 C), hexadecano, 3-hidroxibutano-2-1, hexanona, ácido benzóico, undecano e docosano.

Além dos metabólitos secundários, bactérias do gênero *Bacillus* ainda são produtores de enzimas hidrolíticas, elas são representadas pela lipase, protease e quitinase, e exibem uma variedade de propriedades antagônicas, como atividade antifúngica (Horak *et al.*, 2019). Tem-se descrito por exemplo, a produção de collagenase, quitinase, lipase e protease por *Bacillus subtilis* K-C3 (Pongsetkul *et al.*, 2018). Recentemente, no estudo realizado, com as espécies *Bacillus velezensis* BZR 86 e *Bacillus velezensis* BZR 277 foram relatadas a produção de protease, amilase, celulase e quitinase (Asaturova *et al.*, 2022).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* para o biocontrole de fitopatógenos de interesse agrícola.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar *in vitro* o potencial antagonista de *Bacillus* spp. contra diferentes fitopatógenos de interesse agrícola em culturas como guaranazeiro, hortaliças, leguminosas e outros;

Avaliar características funcionais de isolados de *Bacillus* spp. relacionadas à promoção de crescimento *in vitro*;

Realizar a mineração genômica voltada a identificação e caracterização Clusters de Genes Biossintéticos aplicados a biocontrole;

Avaliar *in planta* o potencial do isolado MPUR 39.2 no biocontrole dos sintomas da *Rhizoctonia* INPA 2942 em plantas de feijão-caupi.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Macromorfologia e micromorfologia das linhagens *Bacillus* sp. MAD 168 e MPUR 39.2

Para a macromorfologia foi utilizado placas de Petri contendo meio BDA (*Batata Dextrose Ágar*) com pH 7,2, foi feito estrias em formato S, a partir disso, os isolados foram incubados em BOD a 28 °C por 24h.

Para a micromorfologia os isolados também foram crescidos em BDA (*Batata Dextrose Ágar*), por 12h a 28 °C, após isso discos de meio de cultura de aproximadamente 0,5 cm contendo as amostras foram seccionados e transferidos para uma placa de 24 poços, a fixação ocorreu por meio da submersão das amostras em fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M pH 7.2) por 24 horas, em temperatura ambiente, a lavagem foi feita 4 vezes sucessivamente em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 7.2, por 10 minutos cada, a pós-fixação foi feita com a submersão das amostras por 2 horas em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,3, a segunda pós-fixação foi no escuro, cobrindo a amostra com papel alumínio, após isso, foi feito a lavagem pós-fixação, onde o excesso de ósmio foi lavado três vezes com o tampão fosfato de potássio 0,05 M, a desidratação ocorreu com soluções de etanol a 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, mantendo-se as amostras submersas por em cada uma das soluções por 20 minutos (este processo foi repetido três vezes na etapa do etanol 100%), para a secagem em ponto crítico, as amostras submersas em etanol absoluto foram submetidas à secagem em ponto crítico Leica EM CPD300 por 1h30, a metalização foi com as amostras fixadas em fitas de carbono à stubs e submetidas a 4 minutos de metalização com ouro, no metalizador JEOL Smart Coater (Souza, W., 2007). Foi utilizado o Jeol JSM IT500-HR, um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de alta resolução para observação das micrografias, esta análise foi feita em parceria com o Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas (CMABIO).

4.2. Avaliação *in vitro* do potencial antagonista de bactérias isoladas de sedimentos de rios amazônicos

Foram utilizados nos testes de antagonismo dois isolados de bactérias do gênero *Bacillus* (Tabela 1). As linhagens foram isoladas de sedimentos da foz dos rios Purus (com nascente no Peru, deságua no Rio Solimões, a cerca de 200 km de Manaus-Am) e Madeira (com nascente na Bolívia, deságua no Rio Amazonas, a cerca de 480 km de Manaus-Am). Estas, fazem parte da coleção biológica do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Ocidental-CPAA, com acesso ao patrimônio genético autorizado pelo SISGEN N° AB6B14F.

Tabela 1. Bactérias utilizadas nas análises *in vitro* contra fitopatógenos de interesse agrícola.

Nº	Código da Coleção	Identificação	Origem	Local
01	MAD 168	<i>Bacillus</i> sp.	Sedimentos	Rio Madeira
02	MPUR 39.2	<i>Bacillus</i> sp.	Sedimentos	Rio Purus

As bactérias foram reativadas em meio de cultura líquida LB (Luria Bertani), a 28 °C por 24 horas. Após a reativação, os testes de antagonismo dos isolados foram realizados contra 15 fungos fitopatogênicos (Tabela 2), seguindo os métodos de Anith *et al.* (2021). No centro de cada placa de Petri, contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), foi colocado um disco micelial do fitopatógeno com cerca de 5mm de diâmetro e com 5 dias de idade. Após isso, os isolados de *Bacillus* spp. foram inoculados paralelamente entre si a uma distância de 3 cm do centro da placa. Para o controle positivo foi utilizado placas inoculadas apenas com o fitopatógeno. O teste foi realizado em triplicata e armazenado em estufa incubadora BOD a 28 °C por 15 dias. Os resultados foram avaliados no 5º, 10º e 15º dia após o início do experimento. A percentagem de inibição foi avaliada no Excel de acordo com a fórmula abaixo:

$$\%inibição = \frac{\text{diâmetro médio do controle} - \text{diâmetro médio do tratamento}}{\text{diâmetro médio do controle}} \times 100$$

Tabela 2. Lista de fitopatógenos e respectivos hospedeiros utilizados *in vitro*.

Nº	Código da Coleção	Patógeno	Hospedeiro
01	Coll 2N	<i>Colletotrichum siamense</i>	Botão-de-ouro (folha) (<i>Synedrella nodiflora</i>)
02	INPA 2908	<i>Colletotrichum spaethianum</i>	Cebolinha (<i>Allium schoenoprasum</i>)
03	INPA 2910	<i>Colletotrichum scovillei</i>	Pimenta de cheiro (fruto) (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)
04	INPA 2939	<i>Colletotrichum guaranicola</i>	Guaranazeiro (folha) (<i>Paullinia cupana</i>)
05	INPA 2973	<i>Colletotrichum</i> sp.	Mamão (fruto) (<i>Carica papaya</i>)
06	INPA 2671	<i>Corynespora cassiicola</i>	Tomate (folha) (<i>Solanum lycopersicum</i>)
07	Embrapa Fdc 307	<i>Fusarium decemcellulare</i>	Guaranazeiro (folhas) (<i>Paullinia cupana</i>)
08	Embrapa MCT 10621	<i>Fusarium</i> sp.	Tomate (fruto) (<i>Solanum lycopersicum</i>)
09	Embrapa Mp 01	<i>Moniliophthora perniciosa</i>	Cupuaçu (fruto) (<i>Theobroma grandiflorum</i>)
10	INPA 2942	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Feijão (raízes) (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
11	INPA 2943	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Alface (<i>Lactuca sativa</i>)
12	INPA 1809	<i>Colletotrichum theobromicola</i>	Cebolinha (<i>Allium schoenoprasum</i>)
13	INPA 2910	<i>Colletotrichum scovillei</i>	Pimenta de cheiro (fruto) (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)
14	Embrapa 609	<i>Neopestalotiopsis formicidarum</i>	Guaranazeiro (folhas) (<i>Paullinia cupana</i>)
15	Embrapa 2917	<i>Neopestalotiopsis formicidarum</i>	Guaranazeiro (folhas) (<i>Paullinia cupana</i>)

4.3. Avaliação *in planta* do isolado MPUR 39.2 no biocontrole de *Rhizoctonia* INPA 2942

A avaliação do controle biológico de MPUR 39.2 contra *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942) foi realizada de acordo com Korayem *et al.* (2020) com adaptações. O isolado

MPUR 39.2 foi cultivado em meio LB por 24 horas e o fitopatógeno em meio de cultura BD por 7 dias, ambos incubados a 28 °C e 150 rpm.

Para os tratamentos 3 e 4 que utilizam o isolado MPUR 39.2, foi preparado uma suspensão celular de 50mL (leitura no espectrofotômetro à 0,5 nm, que equivale a 1×10^8 UFC/mL) para cada repetição. Para os tratamentos 2 e 3, foi preparada uma suspensão de micélio do patógeno *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942) triturada por meio de mixer, 50 mL do mesmo foi inoculado às raízes das plântulas.

Primeiramente, as sementes foram submetidas ao processo de assepsia por meio da imersão das sementes em hipoclorito de sódio a 2% por 5 minutos e em seguida lavados 5 vezes em água esterilizada, para evitar interferência de contaminantes. Em seguida, as sementes de feijão foram cultivadas em substrato Vivatto Plus Technes® (composto de casca de pinus, vermiculita e carvão vegetal), devidamente esterilizado.

O ensaio foi realizado em condições controladas em casa de vegetação (temperatura de 25 a 32 °C; sistema de irrigação automática) com mudas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) da linhagem BRS Novaera, avaliando o efeito no biocontrole contra o fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942).

Foram preparados quatro tratamentos com quinze repetições cada, todos com delineamentos inteiramente casualizados.

Tratamento 1 - plantas inoculadas somente com água;

Tratamento 2 - plantas inoculadas somente com o fitopatógeno;

Tratamento 3 - plantas inoculadas com o isolado MPUR 39.2 e o fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. INPA 2942;

Tratamento 4 - plantas inoculadas com o isolado MPUR 39.2;

Após 12 dias da semeadura em substrato estéril, as plântulas com cerca de 10cm de comprimento e no mínimo 5 folhas verdadeiras ficaram prontas para o início dos testes. Foram preparadas soluções dos microrganismos para a inoculação na plântula, primeiramente foi inoculado a solução de MPUR 39.2, e depois de 48h a suspensão do fitopatógeno foi inoculada.

Para os tratamentos 3 e 4 que utilizam o isolado MPUR 39.2, foi preparado uma suspensão celular de 50mL com Densidade Óptica (OD) de 0,5 nm para cada repetição. Para os tratamentos 2 e 3, foi preparada uma suspensão de micélio do patógeno *Rhizoctonia* sp. (INPA 2942) triturada por meio de mixer com volume de 50 mL para inoculação às raízes das plântulas.

A severidade da doença foi registrada após 21 dias, determinando o número de plantas com lesões e registrando o dano visual usando uma escala de notas definidas em quatro notas (0 a 3), sendo: 0) plântulas saudáveis; 1) intensidade de lesão leve, apenas uma lesão no hipocótilo predominantemente na região do coleto da plântula, coloração marrom-avermelhada, alongada e deprimida, pequena (menor ou igual a 0,5cm); 2) intensidade de lesão moderada, indicando lesões alongadas e deprimidas, podendo ser uma ou mais, isoladas ou coalescidas, coloração marrom-avermelhada, presentes no hipocótilo e/ou no sistema radicular, medindo entre 0,5cm e 2cm; 3) intensidade de lesão severa, indicando lesões alongadas e extensas (maior que 2cm), deprimida e com constrição, coloração marrom-avermelhada, abrangendo o hipocótilo e o sistema radicular (GOULART, A., 2019). A Figura 2. abaixo, indica as ilustrações da escala de notas de 0 a 3.

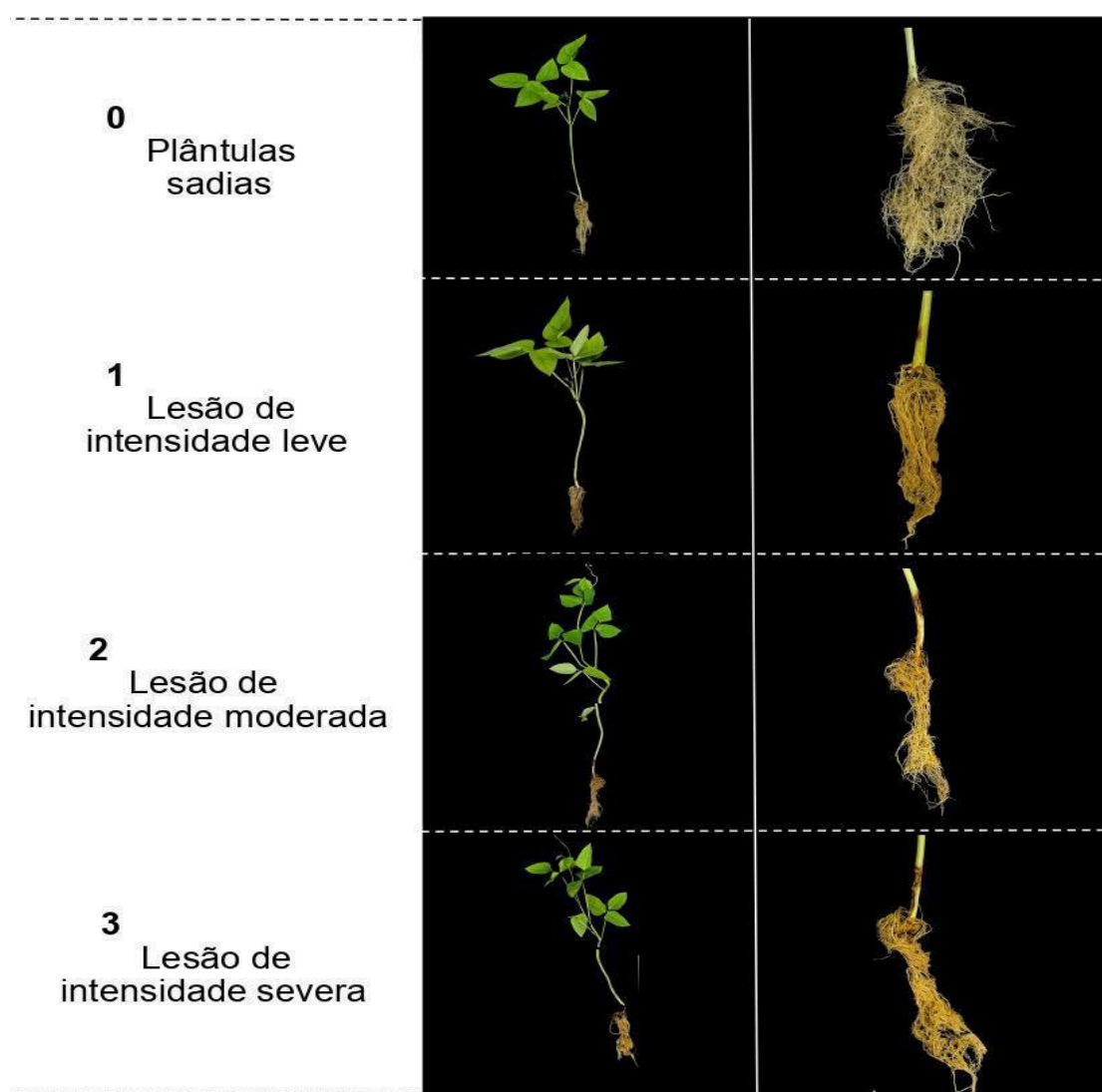


Figura 2. Ilustração da escala de nota de severidade da infecção de *Rhizoctonia solani* em plântulas de feijão.

O experimento foi realizado com Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 15 unidades amostrais em cada um dos 4 tratamentos, os dados obtidos foram examinados utilizando o teste de Wilcoxon no programa estatístico GraphPad 9.

4.4 Potencial para produção de enzimas hidrolíticas

Por meio de testes qualitativos foram analisadas a produção de lipase, amilase, celulase e quitinase. Para isso, com cada isolado, foram feitas estrias simples no centro da placa de petri contendo os respectivos meios de cultura:

Lipase: 1% peptona, 0.5% de NaCl, 0.01% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2% de Ágar e 1% de Tween 20 (Sierra, 1957);

Protease: 15 g/L leite em pó desnatado, 20 g/L ágar (Wang *et al.* 2010);

Amilase: 0.5% Peptona, 0.5% NaCl, 0.5% de extrato de carne, 2% de Ágar, 1% de dextrose e 0.2% de amido (Hankin & Anagnostakis, 1975);

Celulase: 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% NaCl, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.03% NH_4NO_3 , 1% de Carboximetilcelulose e 1.2% ágar (Ariffin *et al.*, 2006);

Quitinase: Quitina coloidal 10 g/L, KCl 0,2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g/L, ágar 20 g/L (Roberts e Selitrennikoff, 1988)

As placas foram incubadas durante 7 dias a 28 °C. A presença de halos de degradação indicará produção das cinco enzimas, porém, para as enzimas amilase e celulase haja a necessidade de coloração antes da observação dos halos: para revelação de amilase foi utilizado 10 ml de solução de Lugol 0.3% (v/v) durante 5 minutos; para celulase 10 mL de Vermelho Congo (0.1% w/v) seguindo de uma lavagem com 10 mL de NaCl 1M, por 15 minutos cada solução.

4.5 Produção de compostos promotores de crescimento de plantas

4.4.1 Avaliação qualitativa de Sideróforo e Solubilização de fosfato inorgânico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Na análise qualitativa das atividades para a promoção de crescimento em plantas, como solubilização de fosfato e produção de sideróforos foram utilizados os meios de cultura estabelecidos por Yang *et al.*, (2018) e Milagres *et al.*, (1999), respectivamente. Os bioensaios foram realizados em triplicata e a incubação a 28°C por 5 dias. As colônias que apresentaram halo claro em meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth*) foram marcadas como positivas para solubilização de fosfato, e aquelas com halo laranja em meio ágar CAS (Cromo Azurol S) foram consideradas positivas para produção de sideróforos.

4.6 Extração de DNA, sequenciamento, montagem, anotação e análises

As linhagens puras de *Bacillus* foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido e mantido overnight sob agitação a 27 °C e 150 rpm. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação e o DNA genômico bacteriano foi extraído utilizando-se o mekit DNeasy® *blood and tissue* (Qiagen, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida analisado em gel de agarose (1%) e quantificado no Qubit® 2.0 fluorometer (Life Technologies).

O genoma completo foi sequenciado usando a plataforma Illumina com protocolo 2 x 150bp (Paired End). A montagem “de novo” foi realizada usando o montador SPAdes (Prjibelski *et al.* 2020) por meio da parceria com a Embrapa Digital.

As sequências codificadoras de proteínas foram inicialmente determinadas usando a NCBI Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) versão 3.3 (Tatusova *et al.* 2016) e as características gerais do genoma (tamanho, N50, conteúdo GC, etc) foram retiradas da anotação fornecida pelo GenBank.

4.7 Mineração genômica, identificação e caracterização de BGCs

Para a prospecção dos BGCs ligados à anotação de cluster de genes de interesse, foi utilizada a metodologia baseada na mineração de genomas descrita por Adamek e colaboradores (2017). Os possíveis clusters gênicos de metabólitos secundários foram identificados através da ferramenta de predição antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell), versão 5.0 (Blin *et al.*, 2019) utilizando-se a versão para bactérias.

O input em arquivos formato FASTA dos genomas, onde o parâmetro utilizado para o rigor da detecção dos agrupamentos foi o relaxed com todos os algoritmos extras (KnownClusterBlast, ActiveSiteFinder, ClusterBlast, Cluster Pfam analysis, SubClusterBlast e Pfam-based GO term annotation) disponibilizados pelo antiSMASH.

Todas as sequências dos agrupamentos preditos pelo antiSMASH com maior similaridade apontadas pela plataforma foram submetidas na ferramenta online BLAST do NCBI. Este procedimento foi realizado para identificar se os agrupamentos são pertencentes aos *Bacillus* spp. ou se são provenientes de uma possível contaminação destes genomas.

Para filtragem e classificação dos clusters mais conhecidos a partir do predito pelo antiSMASH foram utilizados bancos de dados específicos. O MIBiG (Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster) versão 2.0 (Kautsar *et al.*, 2020) é um repositório de BGCs o qual possui curadoria manual. O banco de dados RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*) foi utilizado para análise dos genes ligados à síntese dos BGCs e inferência das possíveis funções.

A partir dos clusters preditos pelo antiSMASH, foi realizada uma análise comparativa dos genes de cada BGC apontados nos genomas dos *Bacillus* com os genes dos clusters depositados no banco de dados MIBiG através de gráficos de sintenia plotados no programa Clinker. Os arquivos utilizados foram as saídas em formato genbank do antiSMASH e os arquivos em formato genbank dos BGCs contidos no MIBiG. Para a construção dos gráficos de sintenia foram utilizados os parâmetros tBLASTx com um *e-value* para uma investigação da identidade dos genes, sejam eles do tipo cernem ou adicional, foram realizadas buscas por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados do NCBI e inferência da função através do alinhamento de proteínas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Macromorfologia e micromorfologia das linhagens *Bacillus* sp. MPUR 39.2 e MAD 168

As colônias de ambos isolados apresentam características morfológicas macro e microscópicas semelhantes: cor branca; elevação convexa; margem inteira e forma de bastonetes conforme esperado para gênero *Bacillus*.

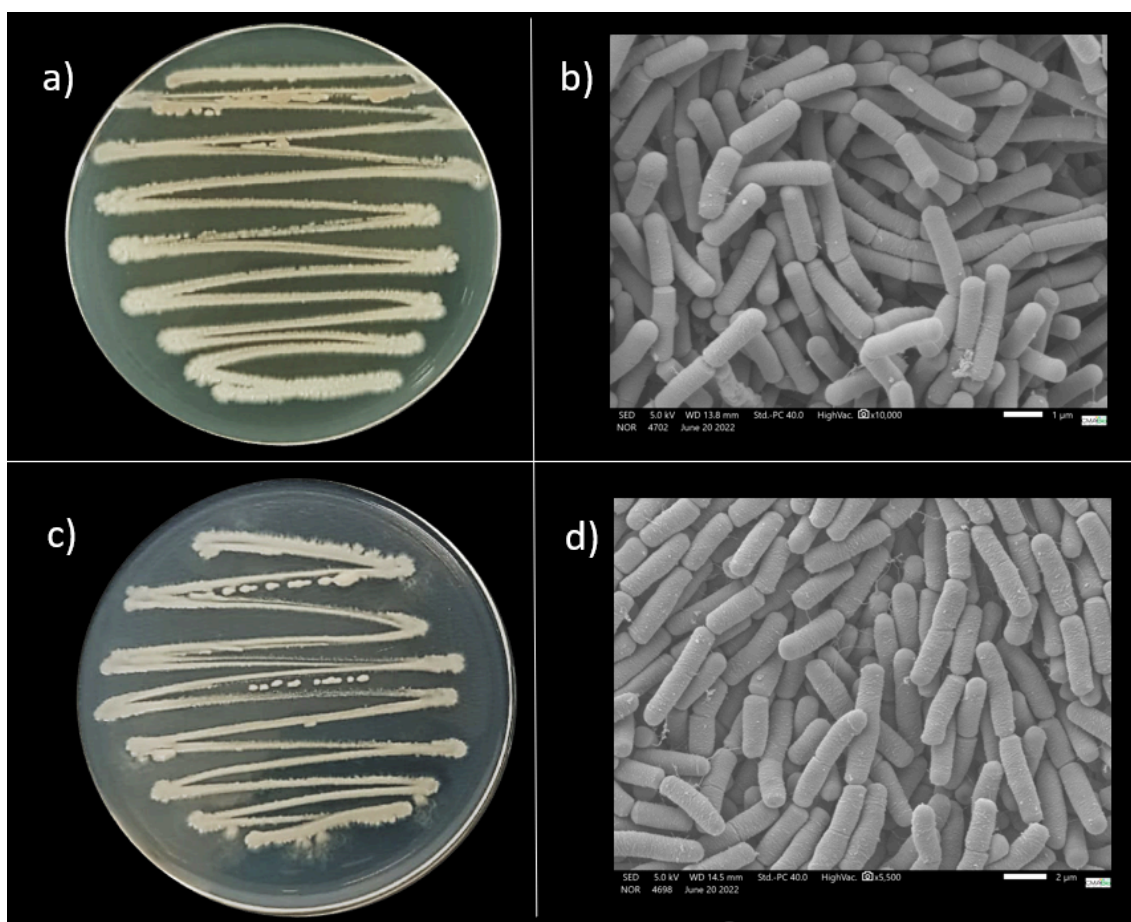


Figura 3. Macromorfologia e Micromorfologia de *Bacillus* sp.: **a e c)** Características morfológicas das linhagens MPUR 39.2 e MAD 168, respectivamente, cultivadas em meio BDA em placas de Petri de 9 mm de diâmetro; **b e d)** MEV da linhagens MPUR 39.2 e MAD 168 (2 µm), respectivamente.

5.2 Análise filogenômica

A identificação das espécies foi realizada por meio da comparação entre os genomas das espécies tipo e dos isolados MAD 168 e MPUR 39.2. A linhagem MAD 168 foi identificada como *Bacillus tropicus* por meio da análise com diferentes

algoritmos para Identidade Média Nucleotídica (ANI - *Average Nucleotide Identity*) como ANIb, ANIm, TETRA e dDDh (hibridização DNA–DNA digital) (Tabela 3). Para tanto, o isolado MAD 168 foi comparada com auxílio do (OrthoANI) com diferentes espécies do gênero *Bacillus* e o maior valor de ANI obtido foi com *B. tropicus* N24 T (95,91%) e *B. anthracis* ATCC 14578 T (95,91%) que foram superiores ao valor limite de corte (95-96%) para a demarcação de espécies (Figura 4).

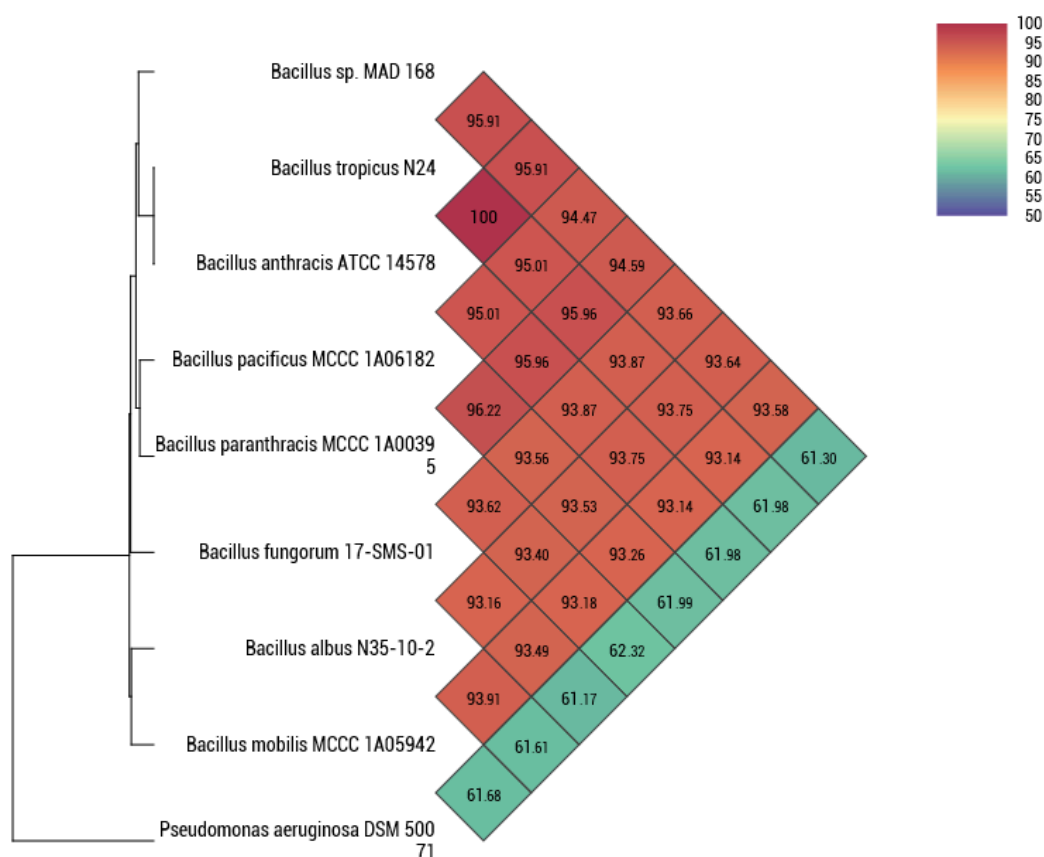


Figura 4. Heatmap de identidade média de nucleotídeos por ortologia (OrthoANI) entre o isolado *Bacillus* sp. MAD 168 e diferentes espécies tipo do gênero *Bacillus* calculados pelo software OAT com *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 usado como um grupo externo (*outlier*).

Os valores de ANIb ANIm, Tetra e dDDH entre MAD 168 e as espécies mais próximas de *Bacillus* estão entre 92.80% a 95.44%; 93.67% a 95.89%; 0.99864% a 0.999425; 52.1% a 62.3%; 0.0% a 0.27%, respectivamente (Tabela 3).

A partir da análise GBDP, o isolado MAD 168 forma um clado irmão com a espécie *B. tropicus* com um dDDH de 81,3%. O dDDH observado excedeu o valor de 70% utilizado para delimitação de espécies e subespécies bacterianas.

Tabela 3. Identificação filogenômica de MAD 168 e MPUR 39.2 por meio de comparação entre genomas de espécies de *Bacillus* mais relacionadas.

	Espécie Tipo	ANlb [%]	ANlm [%]	Tetra [%]	dDDHd4 [%]	Diferenças de GC [%]
MAD 168	<i>Bacillus tropicus</i> N24 ^T	95.44	95.89	0.99942	62.3	0.0
MAD 168	<i>B. anthracis</i> ATCC14578 ^T	95.25	95.89	0.99942	55.9	0.04
MAD 168	<i>B. pacificus</i> 1A06182 ^T	93.59	94.73	0.99909	57.7	0.0
MAD 168	<i>B. paranthracis</i> 1A00395 ^T	93.81	94.80	0.99913	57.6	0.02
MAD 168	<i>B. albus</i> N35-10-2 ^T	92.94	93.96	0.99909	53.6	0.27
MAD 168	<i>B. fungorum</i> 17-SMS-01 ^T	92.80	93.99	0.99861	53.5	0.23
MAD 168	<i>B. mobilis</i> MCC1A05942 ^T	92.90	93.67	0.9992	52.1	0.07
MPUR 39.2	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	97.84	98.86	0.48314	90.1	13.19
MPUR 39.2	<i>B. subtilis</i> NCIB 3610	97.84	98.87	0.48049	89.9	13.32
MPUR 39.2	<i>B. stercoris</i> D7XPN1	95.40	95.40	0.45485	61.9	12.91
MPUR 39.2	<i>B. spizizenii</i> TU-B-10	95.12	95.40	0.45485	50.6	12.88
	<i>B. inaquosorum</i> KCTC					
MPUR 39.2	13429	91.93	93.02	0.47672	49.8	13.02
MPUR 39.2	<i>B. rugosus</i> SPB7	91.67	92.72	0.48868	48.5	13.59
MPUR 39.2	<i>Bacillus cabrialesii</i> TE3	91.38	92.50	0.45975	47.8	12.59

ANlm e ANlb: mesma espécie cut-off (>95%); espécie diferente cut-off (<95%);

Tetra: mesma espécie cut-off (>0,999); espécie diferente cut-off (<0,989)

dDDH: mesma espécie dDDH na fórmula d4 (>70%), nova espécie (<70%);

Na Figura 5, observa-se a árvore inferida com FastME 2.1.6.1 a partir de distâncias GBDP calculadas a partir do genoma sequência. Os comprimentos dos ramos são dimensionados em termos da fórmula de distância GBDPd5. Os números acima das ramificações são valores de suporte pseudo-bootstrap GBDP > 60% de 100 replicações, com a árvore enraizada no ponto médio, resultando em um clado próximo entre a espécie *Bacillus* sp. MAD 168 e *B. Tropicus* N24.

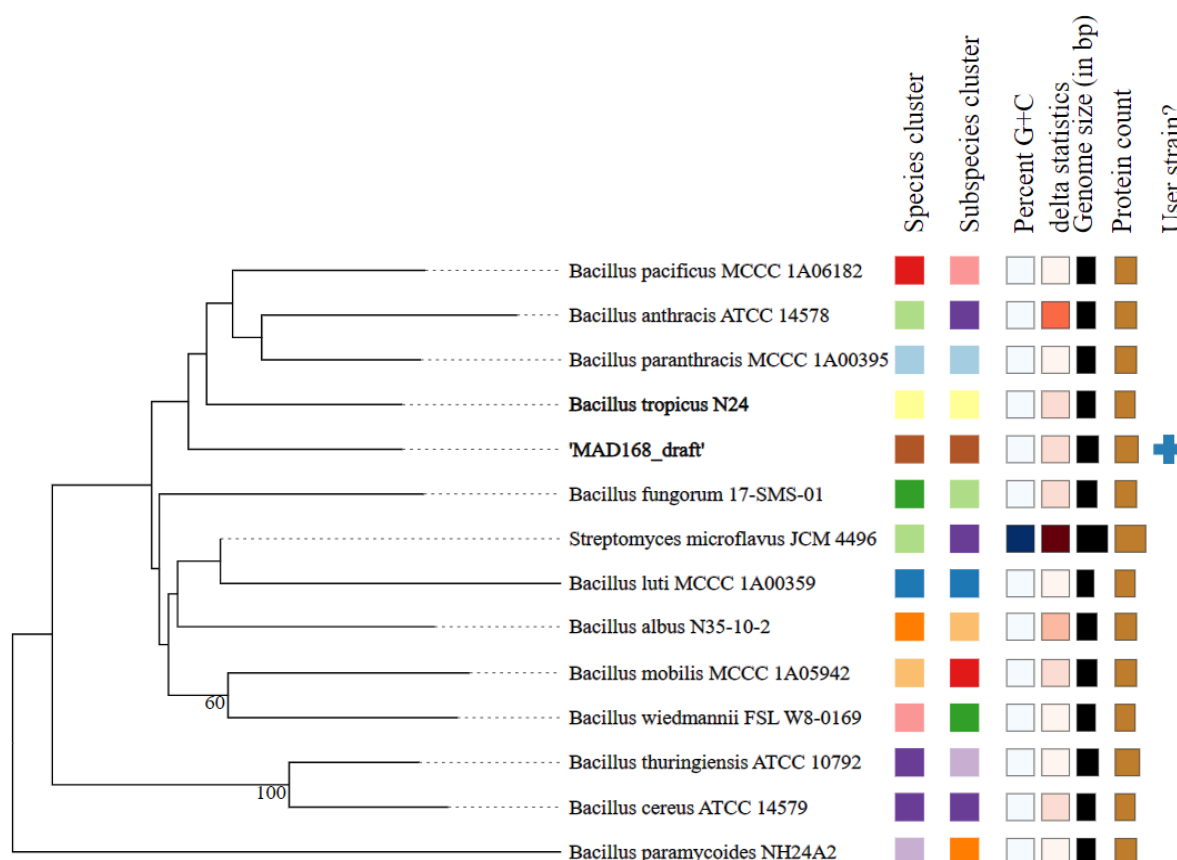


Figura 5. Relações filogenômica utilizando a plataforma TYGS para isolado MAD 168 e espécies de *Bacillus* filogeneticamente relacionadas.

O isolado MPUR 39.2 foi identificado como sendo como *Bacillus subtilis* por meio da análise com diferentes algoritmos para ANI (Identidade Média Nucleotídica) como ANIb, ANIm, TETRA e dDDh (hibridização DNA–DNA digital) (Tabela 3). Para tanto, MPUR 39.2 foi comparada com com auxílio do (OrthoANI) com diferentes espécies do gênero *Bacillus* e o maior valor de ANI obtido foi com *B. subtilis* NCIB 310 T (98,80%) seguido por *B. subtilis* ATCC 6051 T (98,78%) que foram superiores ao valor limite de corte (95-96%) para a demarcação de espécies (Figura 6).

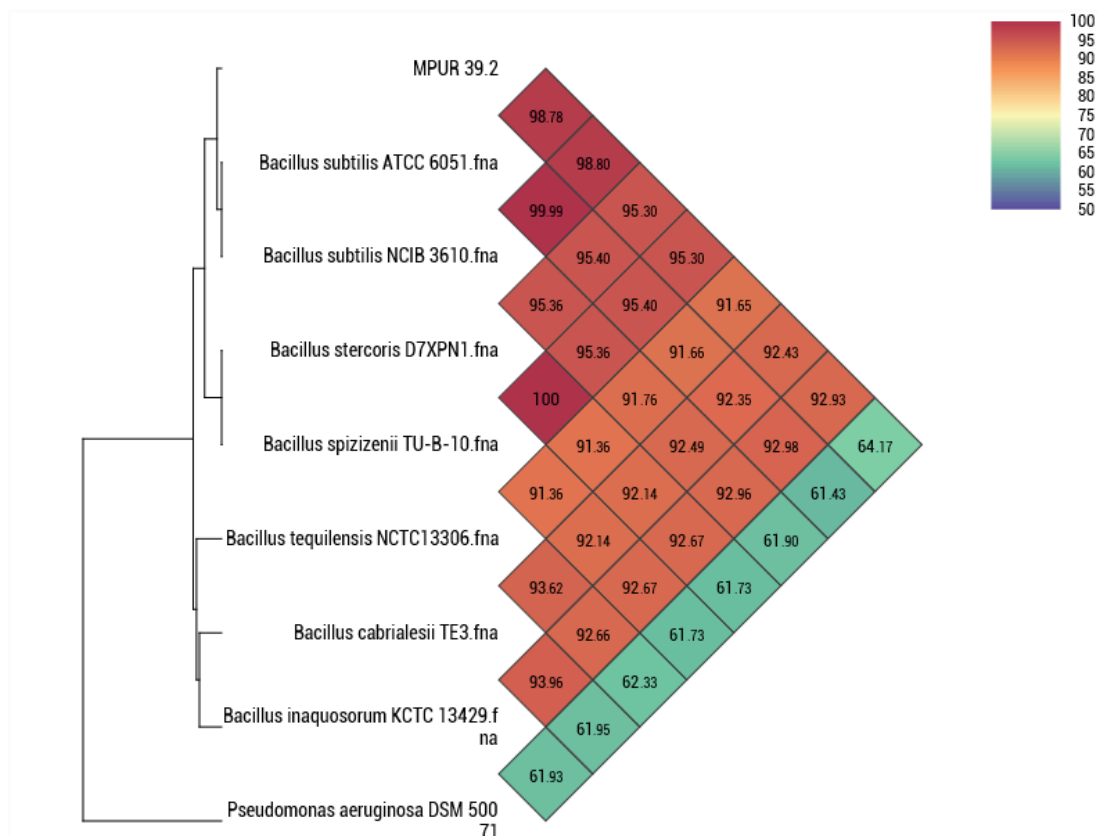


Figura 6. Heatmap de identidade média de nucleotídeos por ortologia (OrthoANI) entre o isolado *Bacillus* sp. MPUR 39.2 e diferentes espécies tipo do gênero *Bacillus* calculados pelo software OAT com *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 usado como um grupo externo (*outlier*).

Os valores de ANIb ANIm, Tetra e dDDH entre MPUR 39.2 e as espécies mais próximas de *Bacillus* estão entre 91.38% a 97.84%; 92.50% a 98.86%; 0.45975% a 0.48314; 47.8% a 90.1%; 12.59% a 13.59%, respectivamente (Tabela 3).

Na agricultura, ambas as espécies descritas acima (*B. tropicus* e *B. subtilis*) vêm sendo amplamente estudadas para aplicações no controle biológico e na promoção de crescimento em plantas. No estudo conduzido por Dong *et al.* (2021), foi investigado o potencial de controle biológico contra a "podridão mole" causada pela bactéria *Erwinia carotovora*. Esta bactéria é responsável por causar danos significativos em culturas de brócolis com as "podridão da cabeça" e do "talo oco", o que resulta em perdas econômicas substanciais. Durante a pesquisa, foram encontradas 53 variedades de bactérias no solo próximo às raízes das plantas, e dentre essas, nove mostraram-se capazes de controlar efetivamente as bactérias que causam a podridão mole, como evidenciado por testes laboratoriais. Essas cepas foram escolhidas com base em uma série de critérios, incluindo análises

físicas e químicas, testes em condições reais, estudo molecular, observação visual das características das bactérias e experimentos de campo.

Quatro dessas cepas, conhecidas como CAB-L005, CAB-L012, CAB-L014 e CAB-L022, apresentaram uma atividade significativa no controle das bactérias patogênicas. A análise do DNA dessas cepas revelou uma forte semelhança com várias espécies de *Bacillus*: 100% para CAB-L005 com *Bacillus tropicus*, 99% para CAB-L012 com *Bacillus subtilis*, 100% para CAB-L014 com *Bacillus tequilensis* e 100% para CAB-L022 com *Bacillus cereus*. Essas cepas também foram bem-sucedidas em testes realizados em ambientes naturais, sugerindo que poderiam ser úteis no controle da podridão mole em diferentes tipos de plantações.

Jan et al., (2023) analisaram como um isolado de *Bacillus* que pode beneficiar o crescimento das plantas em ambientes de laboratório controlados, examinando as propriedades que estimulam esse crescimento. Estas propriedades incluem a capacidade de produzir enzimas que quebram moléculas, ácido indol-acético que promove o crescimento, sideróforos que ajudam na aquisição de ferro, formação de biofilme para proteção e solubilização de fosfato para disponibilizar este nutriente essencial. Além disso, o teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) identificou que o isolado *Bacillus* sp. FJ3 possui genes que têm o potencial de produzir lipopeptídeos benéficos para o crescimento das plantas, como fengicina, surfactina, micosubtilina e pilpastatina.

Por meio de experimentos de antagonismo realizados em laboratório, foi observado que o isolado FJ3 exerceu uma forte inibição (52%) no crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* em comparação com as condições de controle não tratadas. Além disso, o isolado FJ3 demonstrou capacidade de competir com sucesso contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oryzae*. Os resultados também mostraram que o extrato bruto de *Bacillus*, do qual o isolado FJ3 é derivada, exibiu altos níveis de inibição no crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum* (92%), *A. niger* (90%), *A. flavus* (81,5%) e *Rhizopus oryzae* (56%).

Esses achados ressaltam o potencial dos *Bacillus* identificadas neste estudo como agentes eficazes de controle biológico, oferecendo assim uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de estratégias de combate à diversas doenças em culturas agrícolas.

5.3 Genômica comparativa de *Bacillus tropicus* MAD 168 e *Bacillus subtilis* MPUR 39.2

O isolado MAD 168 possui um tamanho de genoma de 6,09 MB, com um conteúdo de G+C de 35.5%, com o total de 6.135 genes, N50 de 735081 e 10 BGCs (Tabela 4). A análise comparativa usando ARTS revelou maior número de genes de resistência de função conhecida (60), bem como identificou 40 genes de resistência próximos de BGCs, indicando que esses BGCs podem ser responsáveis por codificar moléculas com atividade antibiótica (Tabela 5).

Tabela 4. Características do genoma do *Bacillus tropicus* MAD 168 e da espécie mais relacionada *Bacillus tropicus* N24 T.

Características	MAD 168	<i>Bacillus tropicus</i> N24 T
Tamanho do genoma (MB)	6,09	5,22
Conteúdo G+C	35.5	35.2
Genes (total)	6.135	5.331
N50	735081	207933
Clusters	10	8
Comparação de genes codificadores de proteínas		
Proteínas	6.320	5.213
Clusters	4.859	4.757
Singletons	866	416

Tabela 5. Análise comparativa do genoma de *Bacillus tropicus* MAD 168 e *Bacillus tropicus* N24 T.

Organismo	Genes totais	Genes essenciais	Duplicação de genes	Resistência conhecida	BGCs totais	Proximidade e BGC
<i>Bacillus tropicus</i> MAD 168	6135	823	0	60	10	40
<i>Bacillus tropicus</i> N24 T	5331	823	0	55	8	22

A análise de ontologia de genes revelou a função dos produtos gênicos para *Bacillus tropicus* MAD 168:

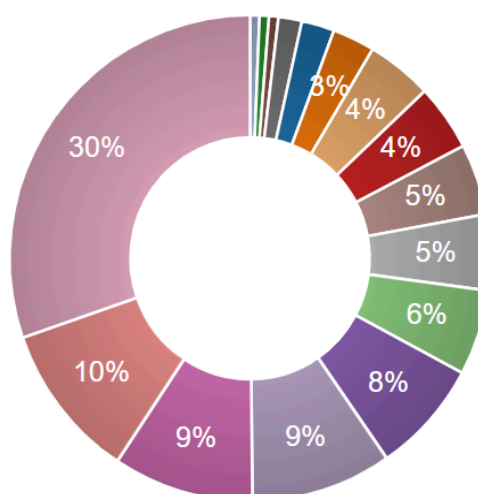


Figura 7. Ontologia de genes preditos em *Bacillus tropicus* MAD 168: envelope celular (3%); função desconhecida (4%); transcrição (4%); não classificado (5%); purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos (5%); biossíntese de aminoácidos (6%); destino de proteína (8%); biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e transportadores (9%); metabolismo do DNA (9%); metabolismo energético (10%); síntese de proteínas (30%) e o restante do gene central constituem coletivamente de metabolismo de fosfolipídios de ácidos graxos, e Proteínas hipotéticas, metabolismo intermediário central e processos celulares.

O isolado MPUR 39.2 possui um tamanho de genoma de 8,21 MB, com um conteúdo de G+C de 56.7%, com o total de 8.020 genes, N50 de 174003 e 14 BGCs (Tabela 6). A análise comparativa usando ARTS revelou maior número de genes de resistência de função conhecida (65), bem como identificou 21 genes de resistência próximos de BGCs, indicando que esses BGCs podem ser responsáveis por codificar moléculas com atividade antibiótica (Tabela 7).

Tabela 6. Características do genoma do *Bacillus subtilis* MPUR 39.2 e da espécie mais relacionada *Bacillus subtilis* ATCC 6051 T.

Características	MPUR 39.2	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051 T
Tamanho do genoma (MB)	8,21	4,24
Conteúdo G+C	56.7	43.3
Genes (total)	8.020	4.434
N50	174003	926826
Clusters	14	16
Comparação de genes codificadores de proteínas		

Proteínas	8.782	4.151
Clusters	3.976	3.665
Singletons	4.251	475

Tabela 7. Análise comparativa do genoma de *Bacillus subtilis* MPUR 39.2 e *Bacillus subtilis* ATCC 6051 T.

Organismo	Genes totais	Genes essenciais	Duplicação de genes	Resistência conhecida	BGCs totais	Proximidad e BGC
<i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2	8020	354	269	65	14	21
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	4434	318	14	38	16	18

A análise de ontologia de genes revelou a função dos produtos gênicos para *Bacillus subtilis* MPUR 39.2:

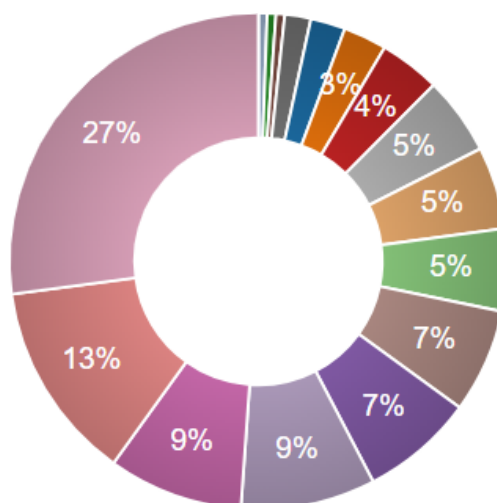


Figura 8. Ontologia de genes preditos em *Bacillus subtilis* MPUR 39.2: envelope celular (3%); transcrição (4%); purinas, pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos (5%); função desconhecida (5%); biossíntese de aminoácidos (5%); não classificado (7%); destino de proteína (7%); biossíntese de cofatores, grupos prostéticos e transportadores (9%); metabolismo do DNA (9%); metabolismo energético (13%); síntese de proteínas (27%) e o restante do gene central constituem coletivamente de metabolismo de fosfolípidios de ácidos graxos, e Proteínas hipotéticas, metabolismo intermediário central e processos celulares.

5.4 Mineração de clusters gênicos biossintéticos em *Bacillus tropicus* MAD 168 e *Bacillus subtilis* MPUR 39.2

A linhagem de *B. tropicus* MAD 168 apresentou dez BGCs que codificam cinco classes de metabólitos secundários (NRPs, terpenos, betalactonas, RiPP e Peptídeos lineares contendo azol). Dos dez BGCs identificados, quatro puderam ser conectados com algum nível de similaridade com vias biossintéticas já caracterizadas na literatura, sendo essas vias para produção de fengicina, bacillibactina, turincina e cofator de molibdênio (tabela 8).

Para confirmar a presença dos genes biossintéticos responsáveis pela produção dessas moléculas foi realizado uma análise de sintenia na qual confirmou a presença dos genes essenciais para produção de bacillibactina, também foram confirmados os genes essenciais para produção de thuricin H, no entanto não foi possível identificar o gene *tnhP* no qual codifica uma serina peptidase relacionado a maturação do peptídeo produzido, já a sintenia do BGC para fengicina revelou apenas a presença dos genes de decoração e os genes essenciais não foram localizados pela análise do antiSMASH, também foi localizado o gene essencial para o co-fator molibdênio *moaA* (Figura 9).

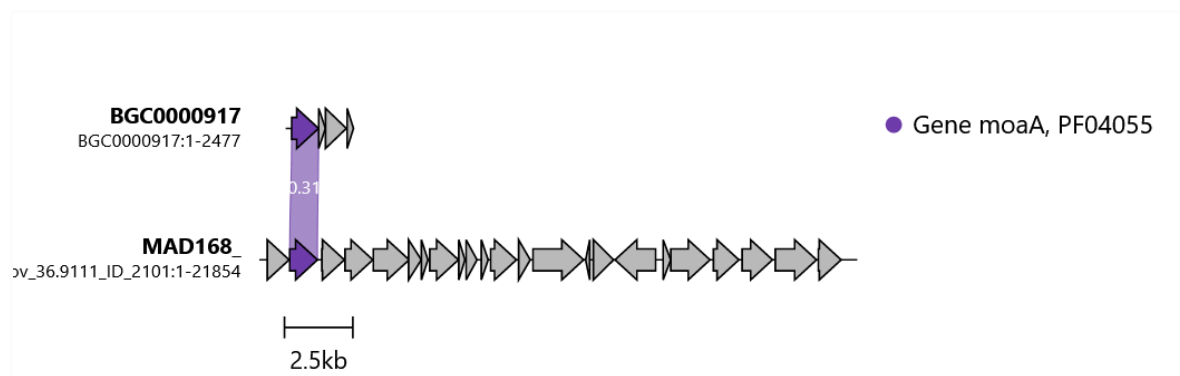
A presença de genes relacionados a produção das moléculas descritas acima demonstra o potencial biossintético da linhagem para produção de antimicrobianos tendo em vista que bacillibactina, fengicina e thuricin são potentes antibióticos contra linhagens patogênicas, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* e *Pseudomonas savastanoi*, respectivamente (Tian *et al.*, 2021; López *et al.*, 2022; Bonaterra *et al.*, 2022). Uma variedade de lipopeptídeos e de bacteriocinas produzidos por bactérias Gram-positivas têm atraído a atenção para o seu uso potencial em diversas áreas. *Bacillus* spp. parecem ser uma fonte relativamente abundante de compostos antimicrobianos, uma vez que muitas espécies deste gênero sintetizam peptídeos e lipopeptídeos com esta importante atividade biológica (Nanjani *et al.*, 2022). Além disso, as bacteriocinas e os lipopeptídeos (LP) produzidas por *Bacillus* spp. demonstram uma diversidade distinta em suas atividades inibitórias e têm sido estudadas em espécies diferentes, incluindo *Bacillus cereus* (Niode *et al.*, 2021), *Bacillus velezensis* (Fazle Rabbee & Baek, 2020), *Bacillus vietamensis* e *Bacillus marisflavi* (Yu, *et al.*, 2020).

Em *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-5, a produção de antimicrobianos conhecidos como Fengicina, Surfactina, Bacilomicina, Bacilobactina e Plipastatina apresentou efeitos inibitórios contra *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum (Luo, et al., 2023).

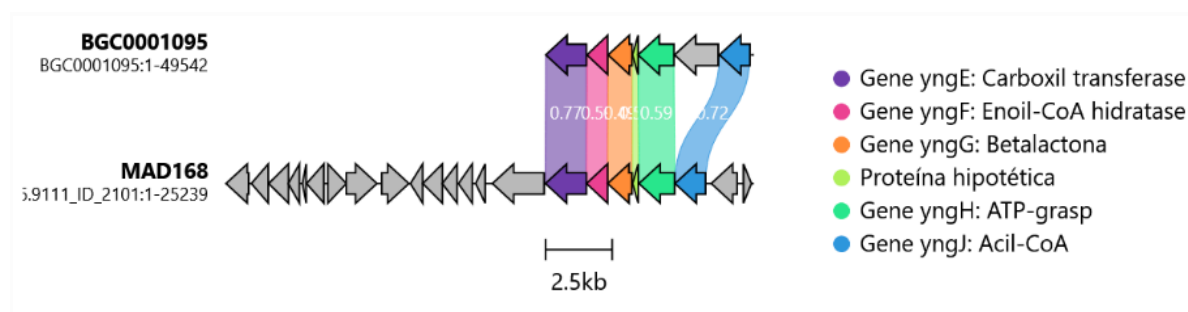
Tabela 8. Grupos de genes de metabólitos secundários identificados no genoma de *Bacillus tropicus* MAD 168

<i>Bacillus</i> sp. MAD 168			<i>Bacillus</i> <i>tropicus</i> N24 T				
Região	Classe(s) Biossintética(a)	Região do genoma (nucleotídeo) Começar / Parar	Aglomerado Composto mais semelhante conhecido	Semelh ança	Função	Adesão MIBIG nº	
Região 1.1	Terpeno	149.949 / 171.802	Cofator de molibdênio	17%	Fixação de nitrogênio	BGC0000917	+
Região 1.2	Tipo RiPP	965.401 / 974.024	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 1.3	Tipo RiPP	1.037.180 / 1.047.506	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 1.4	Betalactona	1.094.159 / 1.119.397	Fengicina	40%	Antifúngico	BGC0001095	+
Região 1.5	NRPS	1.155.760 / 1.220.374	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 1.6	NRP-metalóforo	1.293.604 / 1.345.332	Bacilibactina	85%	Sideróforo	BGC0001185	+
Região 3.1	LAP	345.55 / 369.060	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 4.1	LAP	104.353 / 127.859	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 6.1	NRPS	215.910 / 276.497	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 6.2	Contendo RRE	351.995 / 364.986	Turincina H	40%	Bacteriocina	BGC0000600	-

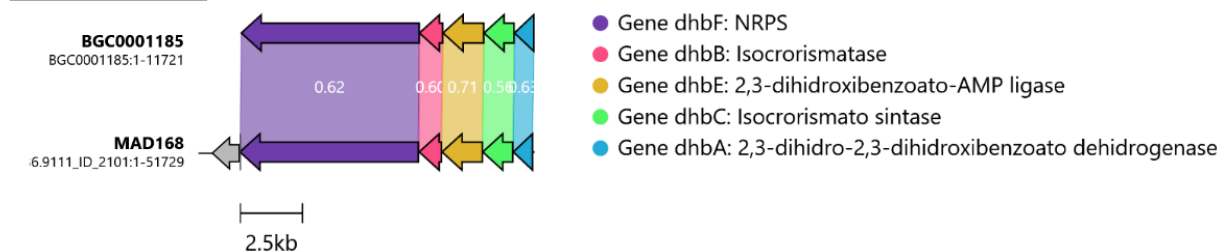
Cofator de Molibdênio



Fengicina



Bacilibactina



Turicina H

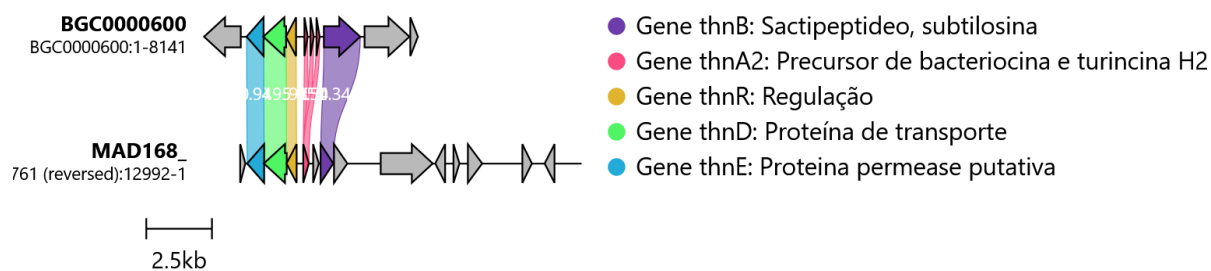


Figura 9. Sintenia para identificação de genes pertencentes aos BGCs caracterizados no genoma da espécie *B. tropicus* MAD 168.

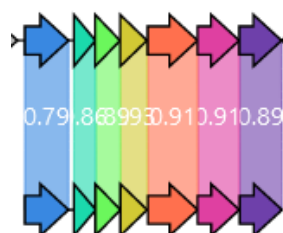
A linhagem de *B. subtilis* MPUR 39.2 apresentou 15 BGCs que codificam sete classes de metabólitos secundários (NRPSs, PKSs, terpenos, betalactonas, epipetídeos, sactipeptídeo, e CDPS). Dos quinze BGCs identificados, doze puderam ser conectados com algum nível de similaridade com vias biossintéticas já caracterizadas na literatura, sendo essas vias para produção de ácido carbapeno, fengicina, bacilo, taislantatina, bacilisina, subtilosina A, ácido pulcherrimínico, bacilibactina, surfactina, microansamicina, carotenóide e plipastatina (Tabela 9).

Tabela 9. Grupos de genes de metabólitos secundários identificados no genoma de *Bacillus subtilis* MPUR 39.2

<i>Bacillus subtilis</i> MPUR 39.2							<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051
Região	Classe(s) Biossintética(a)	Região do genoma (nucleotídeo) Começar / Parar	Aglomerado Composto mais semelhante conhecido	Seme lhança	Função	Adesão MIBIG nº	
Região 1.1	PKS Tipo 3	850.681 / 891.563	Ácido carbapeno	16%	N/D	N/D	+
Região 1.2	Terpeno	940.475 / 961.327	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 1.3	Betalactona	1.044.766 / 1.111.136	Fengicina	100%	Antifúngico	BGC0001095	+
Região 1.4	PKS	1.192.378 / 1.296.736	Bacilo	100%	Antibiótico	BGC0001089	+
Região 1.5	NRPS	1.659.812 / 1.722.724	N/D	N/D	N/D	N/D	-
Região 1.6	Terpeno	1.929.379 / 1.950.182	N/D	N/D	N/D	N/D	+
Região 2.1	Epípeptídeo	89.998 / 111.696	Taislantatina A	10%	Antiproliferativo	N/D	+
Região 2.2	Outro	336.541 / 377.959	Bacilisina	100%	Antibacteriano	BGC0001184	+
Região 2.3	Sactipeptídeo	384.743 / 406.354	Subtilosina A	100%	Antibiótico	BGC0000602	+
Região 2.4	CDPS	630.506 / 651.252	Ácido pulcherrimínico	100%	Antibacteriano	BGC0002103	+
Região 2.5	NRPS	935.820 / 987.597	Bacilibactina	100%	Sideróforo	BGC0000309	+
Região 3.1	NRPS	216.509 / 281.897	Surfactina	82%	Antibiótico	BGC0000433	+
Região 47.1	Betalactona	1 / 37.717	Microansamicina	7%	N/D	N/D	-
Região 65.1	Terpeno	2.397 / 21.775	Carotenóide	28%	N/D	N/D	-
Região 92.1	NRPS	1 / 10.413	Plipastatina	23%	N/D	N/D	+

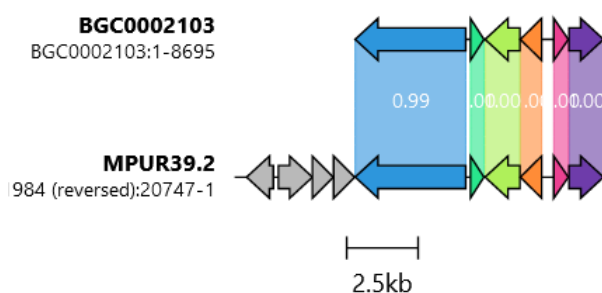
A presença de genes relacionados a produção das moléculas descritas acima demonstra o potencial biossintético da linhagem para produção de antimicrobianos e promotores de crescimento, tendo em vista que bacilisina, ácido pulcherriminico e surfactina são potentes antifúngico, produtor de sideróforos e antibacteriano (Chen *et al.*, 2009; Gore (2019); Debois *et al.*, 2015).

MPUR39.2
cov 46.999 ID 11984:1-41419



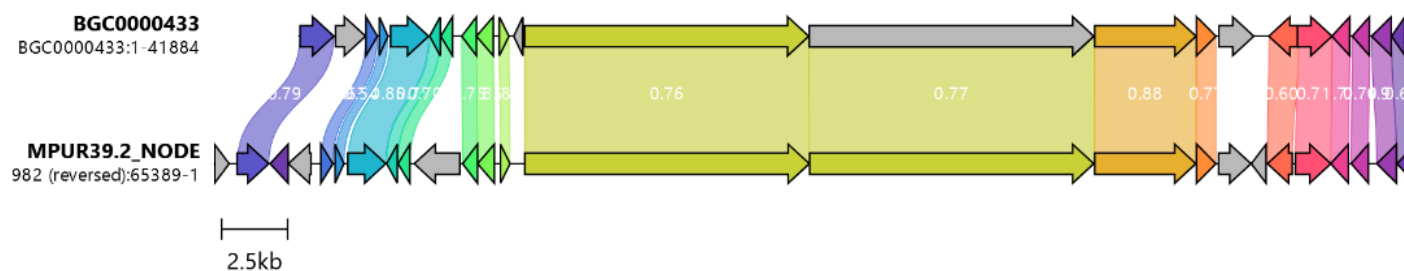
- Gene ywfG: aminotransferase
- Gene bacE: transporte
- Gene bacD: biossíntese de bacilisina
- Gene bacC: biossíntese de bacilisina C
- Gene bacB: biossíntese de bacilisina B
- Gene bacA: biossíntese de bacilisina A
- Gene ywfA: transporte

BGC0002103
BGC0002103:1-8695



- Gene pchE: transportador
- Gene pchR: regulador transcriptional do ácido pulcherriminico
- Gene pchC: precursor do ácido pulcherimminico
- Gene cypX: dipeptideo oxidase, pulcheriminico sintase
- Gene yvnB: regulador transcripcional putativa
- Gene yvnB: exportação de hidrolase putativa

BGC0000433
BGC0000433:1-41884



- Gene yckJ: Aminoácido ABC transportador
- Gene yckI: transportador
- Gene yczE: proteína de membrana
- Gene sfp: fosfopanteteinil transferase
- Gene ycxDA: aminotransferase
- Gene yxcX: transportador
- Gene srfAC: surfactina sintetase D
- Gene srfAD: biossintes de surfactina
- Gene srfAA: surfactina sintetase A









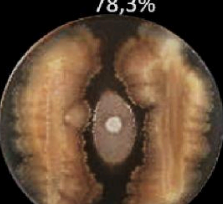

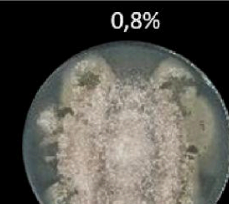
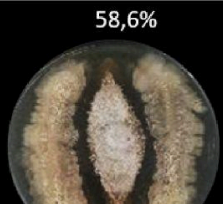
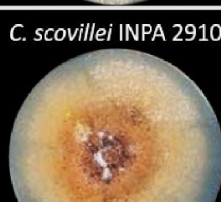

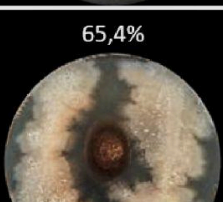
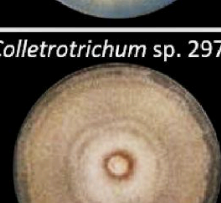
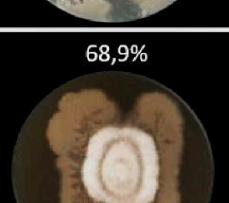
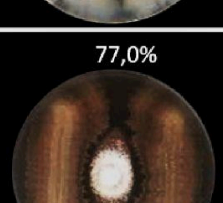
- Gene hxrL: Regulador transcripcional
- Gene hxlA: proteína hipotética
- Gene hxlB: proteína hipotética
- Gene nuC: proteína hipotética
- Gene niN: proteína hipotética
- Gene yckE: proteína hipotética
- Gene yckD: proteína hipotética
- Gene yckJ: proteína hipotética
- Gene yciC: proteína cobalamina

Figura 10. Sintenia para identificação de genes pertencentes ao BGCs caracterizados no genoma da espécie *B. subtilis* MPUR 39.2.





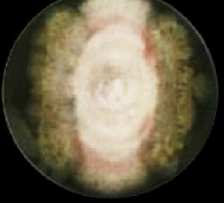





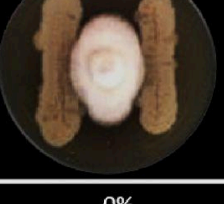


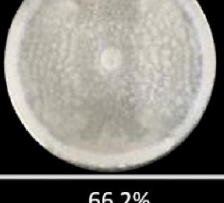
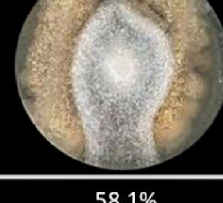



5.5 Potencial antagônico *in vitro* dos isolados de *Bacillus tropicus* MAD 168 e *Bacillus subtilis* MPUR 39.2 sp. contra diferentes fitopatógenos

As linhagens MAD 168 e MPUR 39.2 apresentaram tanto baixa, quanto alta capacidade de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos testados. O isolado MAD 168 não apresentou inibição frente a dois fitopatógenos *N. formicidarum* 609 e *S. rolfii* 2941. Inibição acima de 70% foi observado para *Colletotrichum spaethianum* INPA 2908 (74,7%); *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (78,3%) e *Moniliophthora perniciosa* Mp01 (79,5%) (Figura 9).

A linhagem MPUR 39.2 apresentou atividade antagonista contra todos os 15 patógenos testados sendo a menor inibição contra *N. formicidarum* 609 (28,9%) e a maior contra *Colletotrichum guaranicola* INPA 2939 (97,1%). Dos quinze fitopatógenos testados, sete apresentaram inibição foi acima de 70%: *Fusarium decemcellulare* Fdc 307 (70,0%); *N. formicidarum* 2917 (73,75%); *Colletotrichum cassiicola* INPA 2671 (75%); *S. rolfii* 2941 (75,0%); *Colletotrichum* sp. 2973 (77,0%); *Colletotrichum spaethianum* INPA 2908 (78,3%) e *Moniliophthora perniciosa* Mp01 (81,5%) (Figura 11).

CONTROLE	MAD 168	MPUR 39.2
<i>C. guaranica</i> INPA 2939 	78,3% 	97,1% 
<i>C. siamense</i> Coll 2n 	55,8% 	43,3% 
<i>C. spaethianum</i> INPA 2908 	74,7% 	78,3% 
<i>C. theobromicola</i> INPA 1809 	0,8% 	58,6% 
<i>C. scovillei</i> INPA 2910 	5,6% 	65,4% 
<i>Colletotrichum</i> sp. 2973 	68,9% 	77,0% 

Continuação

CONTROLE	MAD 168	MPUR 39.2
<i>C. cassicola</i> INPA 2671 	60,8% 	75,0% 
<i>F. decemcellulare</i> Fdc 307 	46,6 	70,0 
<i>Fusarium</i> sp. MCT 10621 	39,0% 	42,9% 
<i>M. Perniciosa</i> Mp01 	79,5% 	81,5% 
<i>N. formicarum</i> 609 	0% 	28,9% 
<i>Rhizoctonia</i> sp. INPA 2942 	66,2% 	58,1% 

Continuação

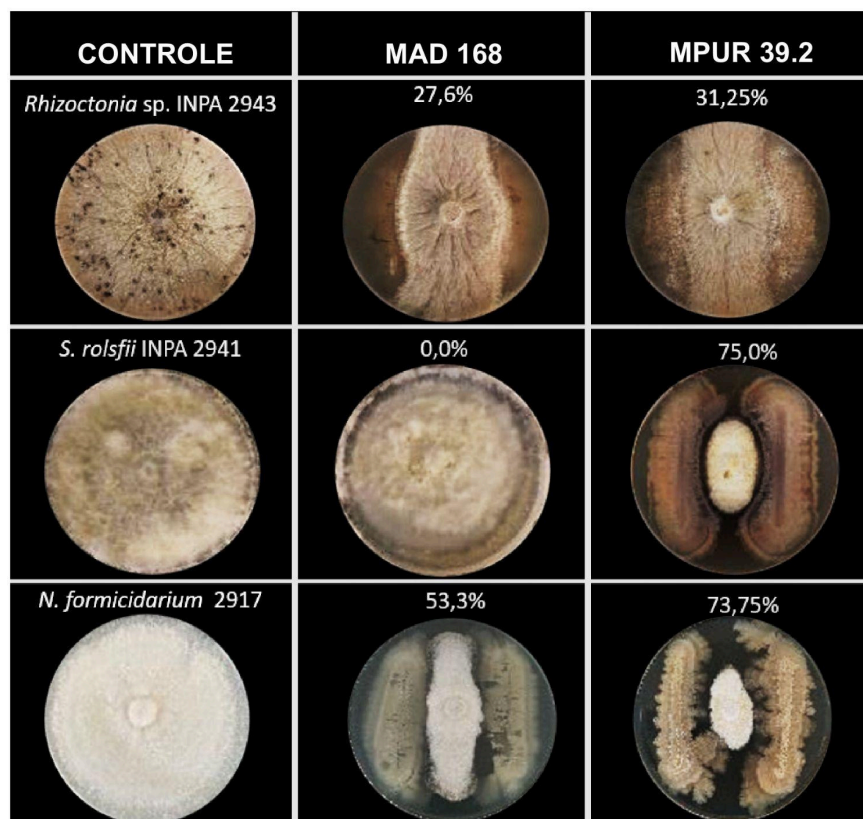


Figura 11. Atividade antagônica *in vitro* das linhagens de *Bacillus* MAD 168 e MPUR 39.2 obtida por meio do teste de cultura pareada frente a 15 fitopatógenos.

O efeito antagonista obtido *in vitro* por diferentes espécies de *Bacillus* têm sido extensivamente reportado na literatura contra diferentes fitopatógenos como *Magnaporthe oryzae* onde *B. velezensis* LJBV19 inibição de crescimento micelial de 75.55% (Wang *et al.*, 2023). Muitas espécies de *Bacillus* reduzem o crescimento de patógenos por meio da produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs) como observado na linhagem de *B. velezensis* CT32, que produz VOCs capazes de controlar *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* com inibição de 66.94% e 45.72% do crescimento micelial, respectivamente (Li *et al.*, 2020). A linhagem *Bacillus amyloliquefaciens* CGMCC 5569 mostrou forte atividade de controle do crescimento *in vitro* de *Lasiodiplodia rubropurpurea*, *Lasiodiplodia crassisporea* e *Lasiodiplodia theobromae*, inibindo o crescimento dos patógenos em cerca de 70,22%, 69,53% e 78,76%, respectivamente (Xia *et al.*, 2022).

Controle de patógenos pós-colheita com base em espécies de *Bacillus* também têm sido reportadas. *Bacillus halotolerans* KLBC XJ-5, controlou o crescimento micelial *in vitro*, bem como a germinação de conídios de *B. cinerea* em morangos (Wang *et al.*, 2021).

As triagens *in vitro* usando métodos de pareamento de cultura tem auxiliado na seleção de linhagens para o controle de patógenos *in planta*. *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 apresentou inibição do crescimento micelial de *Fusarium solani* e *Ceratocystis fimbriata*, e quando avaliada *in planta* foi capaz de elicitar respostas de defesa em batata doce contra esses patógenos, apresentando controle da doença em 83,33 e 49,95 respectivamente (Wang *et al.* 2020).

5.6 Análise *in planta* do efeito do *Bacillus subtilis* MPUR 39.2 contra *Rhizoctonia* INPA 2942 em feijão-caupi

Nos testes *in planta*, realizados em casa de vegetação utilizando como antagonista o isolado MPUR 39.2 no controle do tombamento causado por *Rhizoctonia* sp. em feijão-caupi (cultivar BRS Novaera), a severidade em avaliada em notas entre as plantas inoculadas somente com o patógeno em relação ao tratamento com patógeno + MPUR 39.2 não obtiveram diferença estatística significativa, percebe-se a partir dos dados do Gráfico 1. que os 2 tratamentos não se diferem entre si.

Tabela 10. Avaliação do efeito *Bacillus* MPUR 39.2 na severidade do tombamento causado por *Rhizoctonia* sp. em feijão-caupi (cultivar BRS Novaera).

Tratamento	Nota	Média Parte Aérea (cm)	Média Raiz (cm)
T1- H ₂ O	0	93,1	19,4
T2- <i>Rhizoctonia</i> sp.	1,9±0,7	97,6	20,1
T3- MPUR 39.2 + <i>Rhizoctonia</i> sp.	1,9±0,6	94,4	21,2
T4- MPUR 39.2	0	109,4	25,7



Figura 12. Avaliação fenotípica da parte aérea e sistema radicular em feijão-caupi cultivar BRS Novaera, sob diferentes tratamentos na avaliação do efeito de *Bacillus* MPUR 39.2 no tombamento causado por *Rhizoctonia*: T1) plantas inoculadas apenas com água; T2) plantas inoculadas apenas com fitopatógeno; T3) plantas inoculadas com o isolado MPUR 39.2 e o fitopatógeno; T4) plantas inoculadas apenas com o isolado MPUR 39.2

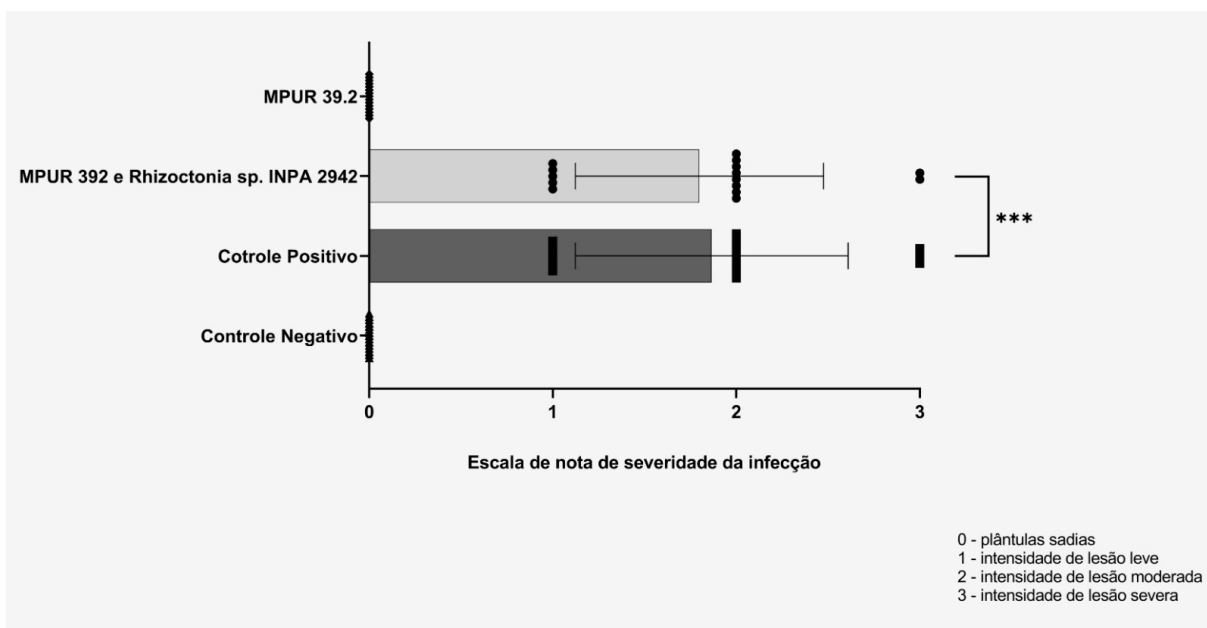


Gráfico 1. Avaliação estatística com o teste de Wilcoxon para verificação da severidade da doença nos tratamentos *in planta*.

Mesmo apresentando resultados negativos no controle *in planta* da *Rhizoctonia* em feijoeiros no presente estudo, os *Bacillus* vem sendo empregados no controle biológico de diversas doenças fúngicas e bacterianas em várias culturas. No estudo realizado por Bojórquez *et al.*, (2021), foram coletados 37 isolados bacterianos nativos da rizosfera do feijão comum e avaliada sua atividade antagônica contra o fungo *Macrophomina phaseolina*. Em testes realizados em condições de cultivo, utilizando sementes inoculadas com os isolados de *Bacillus* BA97, BN17, BN20 e BR20, constatou-se que BA97 e BN17 apresentaram efeitos positivos no comprimento das raízes das plantas.

Por outro lado, BN20 demonstrou impacto positivo na massa fresca das raízes e no comprimento tanto das raízes quanto dos brotos. Entretanto, o aumento observado no comprimento das raízes e parte aérea das plantas tratadas foi semelhante ao das plantas de controle não tratadas. Já as plantas tratadas com BR20 não mostraram diferenças significativas em relação às plantas controle inoculadas com *M. phaseolina*, sugerindo que este isolado não proporcionou controle eficaz da doença.

Analisando o índice de doença (DI) e o efeito de biocontrole (BE%), observou-se que os isolados BA97, BN17 e BR20 resultaram em um DI% $\geq 50\%$ (54,4–68,6%) e um BE% $\leq 50\%$ (11,1–14,8%). No entanto, o isolado BN20 destacou-se, proporcionando um controle mais eficaz sobre o patógeno, com um DI% de 34,3% e um BE% de 55,5%. Esses resultados sugerem que o isolado BN20 possui um potencial significativo como agente de controle biológico contra *M. phaseolina*.

5.7 Análise qualitativa da produção de amilase, celulase, protease, quitinase, sideróforos e solubilização de fosfato

Nos testes de produção *in vitro* de amilase, celulase, protease, lipase e quitinase, além do teste em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos, somente *B. tropicus* MAD 168 foi capaz de produzir uma enzima hidrolítica, a celulase. A partir dos dados apresentados, podemos observar na Tabela 11, o perfil

de produção de enzimas de interesse biotecnológico pelas linhagens MAD 168 e MPUR 39.2.

Tabela 11. Avaliação qualitativa de atividade enzimática, produção de sideróforos e solubilização de fosfato

Enzimas hidrolíticas	MAD 168	MPUR 39.2
Amilase	-	-
Celulase	+	-
Quitinase	-	-
Lipase	-	-
Protease	-	-
Sideróforo	-	-
Solubilização de Fosfato	-	-

(+) atividade detectada (-) ausência de atividade

Uma grande variedade de enzimas biologicamente ativas é produzida por diversas espécies de *Bacillus spp.* dando a elas diversas vantagens competitivas e permitindo interação com diversos outros organismos (Yang *et al.*, 2019). Como evidenciado nos resultados apresentados, algumas espécies de *Bacillus* são descritas na literatura como produtoras de celulasas: *B. subtilis* ZIM3 (Dai *et al.*, 2020); *B. subtilis* VS15 (Ega *et al.*, 2020); e *B. pseudomycoides* (Pramanik *et al.*, 2021);

O substancial aumento do interesse na produção de celulasas, devido principalmente às instabilidades na obtenção de combustíveis fósseis, promoveu a identificação e melhoramento genético de dezenas de microrganismos produtores destas enzimas. Carboidrases (como amilase e celulase) responderam por mais de 47,0% do faturamento global do mercado enzimático em 2019. Os avanços das pesquisas sobre celulasas ocorreram em diversas áreas do conhecimento (Ega *et al.*, 2020).

Contribuições científicas vêm sendo dadas continuamente, principalmente ao isolamento de microrganismos produtores de celulasas, ao aumento da expressão de celulasas por mutações gênicas, à purificação e caracterização de componentes celulósicos, clonagem e expressão de genes, determinação de estruturas

tridimensionais das celulasas e à demonstração do potencial industrial dessas enzimas (Pramanik *et al.*, 2021).

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista as metas propostas e os resultados obtidos na presente pesquisa, as seguintes considerações podem ser apresentadas:

- A macro e micromorfologia e os índices gerais do genoma completo, indicam que a linhagem MAD 168 corresponde a espécie *Bacillus tropicus* e a linhagem MPUR 39.2 pertence a espécies *Bacillus subtilis*.
- A mineração genômica de *Bacillus tropicus* MAD 168 demonstrou a presença de dez clusters biossintéticos, tendo entre eles, NRPSs como a fengicina e bacilibactina e PKS como a Turincina H. A linhagem *Bacillus subtilis* MPUR 39.2 demonstrou a presença de quinze clusters biossintéticos, tendo entre eles, NRPSs, PKSs, terpenos, betalactonas, epipetídeos, sactipeptídeo, e CDPS;
- As duas linhagens de *Bacillus* sp. apresentaram inibição contra a maioria dos fitopatógenos. A avaliação *in vitro* indicou que o isolado MAD 168 (*Bacillus tropicus*) obteve valores de inibição acima de 50%, variando de 53,3 a 79,5%; e o isolado MPUR 39.2 (*Bacillus subtilis*.) variou de 58,1 a 97,1%;
- Dentre as duas linhagens de *Bacillus* sp. somente MAD 168 apresentou potencial de produção enzimática *in vitro* (produção de celulase).
- *in planta* o isolado MPUR 39.2 utilizado controle da *Rhizoctonia* sp. em feijão-caupi (cultivar BRS Novaera) não obtiveram diferença estatística significativa utilizando a escala de notas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEK, Martina et al. Mining bacterial genomes for secondary metabolite gene clusters. **Antibiotics: methods and protocols**, p. 23-47, 2017.

ADENIJI, Adetomiwa Ayodele; LOOTS, Du Toit; BABALOLA, Olubukola Oluranti. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 3669-3682, 2019.

AJESH, K. et al. Kannurin, a novel lipopeptide from *Bacillus cereus* strain AK1: isolation, structural evaluation and antifungal activities. **Journal of applied microbiology**, v. 115, n. 6, p. 1287-1296, 2013.

ALBARANO, Luisa et al. Genome mining as new challenge in natural products discovery. **Marine drugs**, v. 18, n. 4, p. 199, 2020.

ANITH, K. N.; NYSANTH, N. S.; NATARAJAN, C. Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 229-236, 2021.

ARIFFIN, H. et al. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. **Int. J. Eng. Technol**, v. 3, n. 1, p. 47-53, 2006.

ASATUROVA, Anzhela M. et al. *Bacillus velezensis* Strains for protecting cucumber plants from root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in a greenhouse. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 275, 2022.

BELBAHRI, Lassaad et al. Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1438, 2017.

BOJÓRQUEZ-ARMENTA, Yolani de J. et al. Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87, p. 377-386, 2021.

BUHRE, Cord et al. Integrated control of root and crown rot in sugar beet: combined effects of cultivar, crop rotation, and soil tillage. **Plant Disease**, v. 93, n. 2, p. 155-161, 2009.

BLIN, Kai et al. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W81-W87, 2019.

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

CARMONA-HERNANDEZ, Saul et al. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019.

CHEN, Liang et al. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. **Microbiological research**, v. 218, p. 41-48, 2019.

CHEN, Xiao-Hua et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. **Journal of biotechnology**, v. 140, n. 1-2, p. 38-44, 2009.

DAI, Jingcheng et al. Production of highly active extracellular amylase and cellulase from *Bacillus subtilis* ZIM3 and a recombinant strain with a potential application in tobacco fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1539, 2020.

DEBOIS, Delphine et al. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. **Environmental microbiology reports**, v. 7, n. 3, p. 570-582, 2015.

DHANANJAYAN, Venugopal; RAVICHANDRAN, Beerappa. Occupational health risk of farmers exposed to pesticides in agricultural activities. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 4, p. 31-37, 2018.

DONG, Xiaofei et al. Screening of biocontrol bacteria against soft rot disease of *Colocasia esculenta* (L.) schott and its field application. **PLoS One**, v. 16, n. 7, p. e0254070, 2021.

DUTTA, Himashree; KUMAR, R. Gowtham; BORAH, Munmi. Efficacy of biotic and chemical inducers of SAR in management of plant viruses. **International Journal of Economic Plants**, v. 6, n. 3, p. 130-135, 2019.

EGA, Soujanya Lakshmi et al. Comparative analysis of structural variations due to genome shuffling of *Bacillus subtilis* VS15 for improved cellulase production. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 4, p. 1299, 2020.

ENGELBRECHT, Gerhard et al. *Bacillus*-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 629-653, 2018.

FARHAOUI, Abdelaaziz et al. Biological control of diseases caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 124, p. 101966, 2023.

FAZLE RABBEE, Muhammad; BAEK, Kwang-Hyun. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 4973, 2020.

FRANCO-SIERRA, Nicolás D. et al. *Bacillus subtilis* EA-CB0575 genome reveals clues for plant growth promotion and potential for sustainable agriculture. **Functional & integrative genomics**, v. 20, p. 575-589, 2020.

GAO, Hang et al. Signals in systemic acquired resistance of plants against microbial pathogens. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 4, p. 3747-3759, 2021.

GAUTAM, S. et al. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 196-203, 2019.

GHAZALA, Imen et al. Volatile organic compounds from *Bacillus mojavenensis* I4 promote plant growth and inhibit phytopathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 121, p. 101887, 2022.

GORE-LLOYD, Deborah et al. Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. **Molecular microbiology**, v. 112, n. 1, p. 317-332, 2019.

GORSHKOV, Vladimir; TSERS, Ivan. Plant susceptible responses: The underestimated side of plant-pathogen interactions. **Biological Reviews**, v. 97, n. 1, p. 45-66, 2022.

GOULART, Augusto César Pereira. Setting a rating scale for assess *Rhizoctonia solani* lesions on cotton, soybean and common bean seedlings. 2019.

HANKIN, Lester; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

HASHEM, Abeer; TABASSUM, Baby; ABD_ALLAH, Elsayed Fathi. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

HARVESON, Robert M. Identifying and distinguishing seedling and root rot diseases of sugar beets. **Plant health progress**, v. 7, n. 1, p. 39, 2006.

HORAK, Ilzé et al. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 2, p. 326-343, 2019.

IURKIV, Luciana et al. Biotic and abiotic resistance inducers for controlling white rust in rocket (*Eruca sativa*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, 2020.

JAN, Faisal et al. In vitro assessment of *Bacillus subtilis* FJ3 affirms its biocontrol and plant growth promoting potential. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023.

JAN, Mehmood et al. *Bacillus cereus* enhanced phytoremediation ability of rice seedlings under cadmium toxicity. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

JIANG, Chun-Hao et al. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea*. **Biological Control**, v. 126, p. 147-157, 2018.

KASHYAP, Brijendra Kumar et al. Bacillus as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a promising green agriculture technology. **Plant Health Under Biotic Stress: Volume 2: Microbial Interactions**, p. 219-236, 2019.

KASPAR, Felix; NEUBAUER, Peter; GIMPEL, Matthias. Bioactive secondary metabolites from Bacillus subtilis: a comprehensive review. **Journal of natural products**, v. 82, n. 7, p. 2038-2053, 2019.

KAUTSAR, Satria A. et al. MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. **Nucleic acids research**, v. 48, n. D1, p. D454-D458, 2020.

KLUTH, C.; BUHRE, C.; VARRELMANN, M. Susceptibility of intercrops to infection with Rhizoctonia solani AG 2-2 IIIB and influence on subsequently cultivated sugar beet. **Plant pathology**, v. 59, n. 4, p. 683-692, 2010.

KHEDHER, Saoussen Ben; MEJDOUB-TRABELSI, Boutheina; TOUNSI, Slim. Biological potential of Bacillus subtilis V26 for the control of Fusarium wilt and tuber dry rot on potato caused by Fusarium species and the promotion of plant growth. **Biological Control**, v. 152, p. 104444, 2021.

KORAYEM, A. S. et al. Biological control of green bean damping-off disease caused by Rhizoctonia solani by Streptomyces parvulus strain 10d. **Egyptian Journal of Microbiology**, v. 55, n. The 14th Conference of Applied Microbiology, p. 87-94, 2020.

KUMARIYA, Rashmi et al. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 171-177, 2019.

LASTOCHKINA, Oksana et al. Bacillus spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. **Plants**, v. 8, n. 4, p. 97, 2019.

LEBEDEVA, Jolanta et al. Genome mining and characterization of biosynthetic gene clusters in two cave strains of Paenibacillus sp. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 3433, 2021.

LI, Xinxin et al. Antifungal effect of volatile organic compounds from Bacillus velezensis CT32 against Verticillium dahliae and Fusarium oxysporum. **Processes**, v. 8, n. 12, p. 1674, 2020.

LIU, Guo-Hong et al. Genome-based reclassification of Bacillus plakortidis Borchert et al. 2007 and Bacillus lehensis Ghosh et al. 2007 as a later heterotypic synonym of Bacillus oshimensis Yumoto et al. 2005; Bacillus rhizosphaerae Madhaiyan et al. 2011 as a later heterotypic synonym of Bacillus clausii Nielsen et al. 1995. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, p. 1725-1730, 2019.

LOPES-FERREIRA, Monica et al. Impact of pesticides on human health in the last six years in Brazil. **International journal of environmental research and public health**, v. 19, n. 6, p. 3198, 2021.

LÓPEZA, Nancy Ley et al. Biosíntesis inducida de fengicina y surfactina en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* con actividad oomicetida sobre zoosporas de *Phytophthora capsica*. **Revista argentina de microbiología**, v. 54, n. 3, p. 91-100, 2022.

LPSN-DSMZ - *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*. <https://lpsn.dsmz.de/phylum/bacillota>. Acesso em: 28 de novembro de 2023.

LUO, Chen et al. Whole-genome sequencing reveals putative underlying mechanisms of biocontrol capability of IBFCBF-5. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 45, n. 4, p. 60, 2023.

MANDIC-MULEC, Ines; STEFANIC, Polonca; VAN ELSAS, Jan Dirk. Ecology of bacillaceae. **The bacterial spore: From molecules to systems**, p. 59-85, 2015.

MILAGRES, Adriane MF; MACHUCA, Angela; NAPOLEAO, Diovana. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 37, n. 1, p. 1-6, 1999.

MILJAKOVIĆ, Dragana; MARINKOVIĆ, Jelena; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, Svetlana. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1037, 2020.

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

NANJANI, Sandhya et al. Genome analysis uncovers the prolific antagonistic and plant growth-promoting potential of endophyte *Bacillus velezensis* K1. **Gene**, v. 836, p. 146671, 2022.

NGO, Thi Thuy et al. Volatile organic compound profiles associated with microbial development in feedlot pellets inoculated with *Bacillus amyloliquefaciens* H57 probiotic. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3227, 2021.

NIODE, Nurdjannah Jane et al. In silico and in vitro evaluation of the antimicrobial potential of *Bacillus cereus* isolated from *Apis dorsata* gut against *Neisseria gonorrhoeae*. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1401, 2021.

OLISHEVSKA, Snizhana; NICKZAD, Arvin; DÉZIEL, Eric. *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 1189-1215, 2019.

OTHOUM, Ghofran et al. In silico exploration of Red Sea *Bacillus* genomes for natural product biosynthetic gene clusters. **BMC genomics**, v. 19, p. 1-11, 2018.

PAHALAGEDARA, Amila SNW et al. Culture and genome-based analysis of four soil *Clostridium* isolates reveal their potential for antimicrobial production. **BMC genomics**, v. 22, p. 1-14, 2021.

PEREG, Lily L.; TOLESSA, Tamene T. Integrated Management of Major Fungal, Bacterial, Viral, and nematode diseases of cotton. **Cotton Production**, p. 127-144, 2019.

PETRILLO, Claudia et al. Genomic and physiological characterization of Bacilli isolated from salt-pans with plant growth promoting features. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 715678, 2021.

PONGSETKUL, Jaksuma et al. Bacillus subtilis K-C3 isolated from Thai salted shrimp paste (Kapi): Its extracellular enzymes and use as a starter culture in Kapi production. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. e12649, 2018.

PRAMANIK, Sajib Kumar et al. Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by Bacillus pseudomycolides and molecular modeling study of cellulase. **Current research in microbial sciences**, v. 2, p. 100013, 2021.

PRJIBELSKI, Andrey et al. Using SPAdes de novo assembler. **Current protocols in bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. e102, 2020.

RAJAMANICKAM, S.; NAKKEERAN, S. Flagellin of Bacillus amyloliquefaciens works as a resistance inducer against groundnut bud necrosis virus in chilli (Capsicum annum L.). **Archives of Virology**, v. 165, p. 1585-1597, 2020.

REN, Li et al. Extraction and characterization of cyclic lipopeptides with antifungal and antioxidant activities from Bacillus amyloliquefaciens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 6, p. 3573-3584, 2022.

RIOS-NAVARRO, Andrea et al. Learning about microbial language: Possible interactions mediated by microbial volatile organic compounds (VOCs) and relevance to understanding Malassezia spp. metabolism. **Metabolomics**, v. 17, p. 1-11, 2021.

ROBERTS, Walden K.; SELITRENNIKOFF, Claude P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. **Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 169-176, 1988.

SAENGCHAN, Chanon et al. Induced resistance against Fusarium solani root rot disease in cassava plant (Manihot esculenta Crantz) promoted by salicylic acid and Bacillus subtilis. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, v. 72, n. 1, p. 516-526, 2022.

SHAFI, Jamil; TIAN, Hui; JI, Mingshan. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.

SIERRA, Gonzalo. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, p. 15-22, 1957.

SON, Jin-Soo et al. *Bacillus salidurans* sp. nov., isolated from salt-accumulated pepper rhizospheric soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 116-122, 2019.

SOUZA, W. de. Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. **Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro**, 2007.

STOICA, ROXANA-MĂDĂLINA et al. Antimicrobial compounds of the genus *Bacillus*: A review. **Rom Biotechnol Lett**, v. 24, n. 6, p. 1111-9, 2019.

TATUSOVA, Tatiana et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 14, p. 6614-6624, 2016.

TIAN, Dandan et al. Antifungal mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GKT04 against *Fusarium* wilt revealed using genomic and transcriptomic analyses. **Microbiologyopen**, v. 10, n. 3, p. e1192, 2021.

WANG, Bo et al. Genome sequence and comparative analysis of fungal antagonistic strain *Bacillus velezensis* LJBV19. **Folia Microbiologica**, v. 68, n. 1, p. 73-86, 2023.

TORAL, Laura et al. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1315, 2018.

WANG, Cui-Juan et al. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 elicits resistance against two fungal pathogens in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). **Journal of Plant Physiology**, v. 253, p. 153260, 2020.

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

WANG, M. J. et al. Endogenous fungi investigation and antagonistic fungi screening in cotton varieties with resistance to wilt disease. **Jiangsu Agricultural Sciences**, v. 2, p. 102-104, 2010.

WU, Yuncheng et al. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 8, p. e00813, 2019.

XIA, Yandong et al. The multifunctions and future prospects of endophytes and their metabolites in plant disease management. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 1072, 2022.

YANG, Bingqiao et al. Hydrophobic agglomeration of apatite fines induced by sodium oleate in aqueous solutions. **Results in Physics**, v. 9, p. 970-977, 2018.

YANG, Qi et al. Engineering of a *Bacillus subtilis* strain deficient in cellulase: application in degumming of ramie. **Fibers and Polymers**, v. 20, n. 1, p. 57-62, 2019.

YU, Xiaoxia et al. An operon consisting of a P-type ATPase gene and a transcriptional regulator gene responsible for cadmium resistances in *Bacillus vietamensis* 151–6 and *Bacillus marisflavi* 151–25. **BMC microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

Zeigler RD, Perkins. O gênero *Bacillus*. Em: Goldman E, Verde LE (editores). **Manual Prático de Microbiologia**. 2^a ed. Boco Raton: Imprensa CRC 2015, 429–65.

ZHANG, Dan et al. Little antimicrobial peptides with big therapeutic roles. **Protein and Peptide Letters**, v. 26, n. 8, p. 564-578, 2019.

ZHANG, Jing et al. Characterization and antibacterial modes of action of bacteriocins from *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 against *Listeria monocytogenes*. **LWT**, v. 160, p. 113272, 2022.

ZHOU, Lu et al. Antimicrobial activity screening of rhizosphere soil bacteria from tomato and genome-based analysis of their antimicrobial biosynthetic potential. **BMC genomics**, v. 22, p. 1-14, 2021.

ZHOU, Shengnan et al. Structural and functional insights into iturin W, a novel lipopeptide produced by the deep-sea bacterium *Bacillus* sp. strain wsm-1. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 21, p. e01597-20, 2020.