

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

KAMILA LARISSA DA ROCHA

**CONTROLE *IN VITRO* DE *PENICILLIUM EXPANSUM* POR PRODUTO BIOLÓGICO
À BASE DE *BACILLUS* SPP.**

LONDRINA

2023

KAMILA LARISSA DA ROCHA

**CONTROLE *IN VITRO* DE *PENICILLIUM EXPANSUM* POR PRODUTO BIOLÓGICO
À BASE DE *BACILLUS* SPP.**

**In vitro control of *Penicillium expansum* by biological product based on
Bacillus spp.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentada como requisito para obtenção do título de
Licenciada em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho

Londrina

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

KAMILA LARISSA DA ROCHA

**CONTROLE *IN VITRO* DE *PENICILLIUM EXPANSUM* POR PRODUTO
BIOLÓGICO À BASE DE *BACILLUS* SPP.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Licenciada em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 07/dezembro/2023

Profa.Dr. Amélia Elena Terrile
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR – DAQUI)

Prof. Dr. Paulo de Tarso Carvalho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR – DAALM)

Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho
Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR – DAALM)

Londrina

2023

À medida que avanço nas páginas deste trabalho, não posso deixar de sentir a saudade profunda da presença da minha amiga Andressa. Seus sorrisos e conselhos permanecem vivos na lembrança, transformando cada palavra aqui escrita em uma manifestação do vazio deixado por sua partida prematura. Portanto, dedico este trabalho à minha amiga, Andressa.

AGRADECIMENTOS

Dedicar estas palavras é um misto de saudade e gratidão, uma homenagem a uma amiga extraordinária que não está mais entre nós. A Andressa, minha companheira de trabalho e irmã de coração, partiu cedo, deixando uma lacuna imensa em minha vida. Sua ausência é profundamente sentida, especialmente neste momento em que seus conselhos e apoio seriam inestimáveis.

À Andressa, que não está fisicamente presente, mas cujo espírito inspirador permanece vivo em cada linha deste trabalho. Sua falta é imensurável, e sinto sua ausência especialmente nos desafios que enfrentei ao conduzir os testes para este TCC. Se não fosse pela sua força e disposição incansável, esse processo teria sido ainda mais árduo. Este trabalho é um tributo modesto à memória da nossa amizade e à sua importância singular em minha vida.

Ao meu professor orientador, Alexandre Coelho, expresso minha profunda gratidão. Sua crença em mim e seu suporte constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. O espaço que você proporcionou para minha criatividade e pesquisa foi essencial, e sua orientação moldou não apenas o TCC, mas também meu crescimento acadêmico.

À Biosphera, sou grata pela generosa doação dos microrganismos cruciais para este estudo. Sua contribuição vai além do material; é um investimento no avanço do conhecimento, e reconheço e valorizo isso imensamente.

Agradeço de coração a todos os colegas de trabalho, amigos e familiares que ofereceram seu apoio durante este período desafiador. Seu carinho, compreensão e encorajamento foram como bálsamo, proporcionando conforto nos momentos difíceis.

Este trabalho não é apenas um reflexo do meu esforço, mas também uma celebração das pessoas incríveis que moldaram minha jornada. A todos vocês, meu mais sincero obrigado.

Com gratidão,
Kamila.

Parei de pensar e fui pegar outro café. A vida
mesmo injusta continuava.
(BUKOWSKI, 1971).

RESUMO

ROCHA, Kamila Larissa. **Controle *in vitro* de *Penicillium expansum* por produto biológico à base de *Bacillus* spp.** 2023. 38 folhas. TCC - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2023.

O fungo *Penicillium expansum* destaca-se como o principal patógeno pós-colheita em maçãs. Uma estratégia promissora para minimizar as perdas nesse contexto é a utilização de bactérias como agentes de controle biológico. O presente estudo teve como propósito avaliar, *in vitro*, a eficácia de um produto biológico à base de diferentes cepas de *Bacillus* spp., no controle de *P. expansum*, por meio da técnica de difusão em ágar. O experimento foi composto por seis tratamentos distintos: água destilada estéril (controle), culturas individuais de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, e um produto comercial contendo uma combinação de todas as culturas. Foi determinado o ensaio antifúngico em meio sólido (diâmetro de inibição), a atividade antifúngica (porcentagem de inibição) e o mecanismo de ação (competição por espaço/nutrientes ou antibiose). Os resultados do ensaio antifúngico mostraram valores médios de diâmetros de inibição variando de 12,7 mm (*B. amyloliquefaciens*) a 18,1 mm (*B. subtilis*), indicando a efetividade dos tratamentos. Os dados obtidos mostraram que as cepas de *Bacillus* foram capazes de inibir o crescimento de *P. expansum*, com variação de 52,8 (*B. amyloliquefaciens*) a aproximadamente 67,0% (*B. subtilis*). Destaca-se que *B. subtilis* apresentou o melhor desempenho na inibição do fungo, provavelmente devido a ação por antibiose e competição por espaços e nutrientes, seguido do Mix de bactérias. O efeito antagonista de *B. megaterium* e *B. pumilus* foi devido a competição por espaço e nutrientes, enquanto que *B. amyloliquefaciens* atuou por antibiose. Os resultados indicam que as cepas de *Bacillus* spp. testadas são promissoras no controle de *P. expansum*, fornecendo uma alternativa viável para a redução das perdas pós-colheita em maçãs.

Palavras-chave: antagonismo; biocontrole; bactéria; *Pyrus malus* L.

ABSTRACT

ROCHA, Kamila Larissa. **In vitro control of *Penicillium expansum* by biological product based on *Bacillus* spp.** 2023. 38 pages. TCC - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2023.

Penicillium expansum is the main postharvest pathogen in apples. The use of bacteria as biological control agents is an alternative to avoid post-harvest losses. The aim of this work was to evaluate the in vitro control of *P. expansum* by a biological product based on *Bacillus* spp., using the agar diffusion method. The experiment consisted of 6 treatments: sterile distilled water (control), culture of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* and a commercial product with all cultures. The antifungal assay (inhibition zone), antigungal activity (inhibition percentage) and mode of action (space and nutrient competition and/or antibiosis) were determined. Antifungal assay showed inhibition zone from 12.7 mm (*B. amyloliquefaciens*) to 18,1 mm (*B. subtilis*), indicating the effectiveness of the treatments. The data obtained revealed that *Bacillus* strains were able to inhibit the growth of *P. expansum* at a range from 52.8 (*B. amyloliquefaciens*) to near 67.0% (*B. subtilis*). *B. subtilis* presented the best inhibitory performance, probably due to both effects (antibiosis and space and nutrient competition), followed by the Mix. The antagonist effect of *B. megaterium* and *B. pumilus* were due to space and nutrient competition, while *B. amyloliquefaciens* inhibited the fungus by antibiosis. The results indicate that *Bacillus* spp. tested demonstrated promise in the control of *P. expansum*, providing a viable alternative to reduce post-harvest losses in apples.

Keywords: antagonism; biocontrol; bacteria; *Pyrus malus* L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Imagem macroscópica e microscópica do fungo *Penicillium expansum*

Figura 2. Ensaio antifúngico em meio sólido com culturas de *bacillus* spp. (vista frontal e traseira da placa).

Figura 3. Efeito antifúngico das culturas de *Bacillus* sp. isoladas e do Mix de *Bacillus* spp. contra *P. expansum*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos comerciais registrados no Brasil para controle de fungos.

Tabela 2 – Montagem experimental do teste *in vitro*.

Tabela 3 – Concentração dos *Bacillus* spp. em UFC/mL.

Tabela 4 – Diâmetros de inibição e mecanismo antagônico de culturas de *Bacillus* spp. sobre *Penicillium expansum* a partir do ensaio antifúngico em meio sólido

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

PDA - Ágar batata dextrose

SEAB - Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento do Paraná

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NYSM - Nutriente Extrato de Levedura e Sal Médio

DSM – Meio de Esporulação em Disco

TSA - Ágar Caldo de Soja Trypticase

mL – Mililitro

L – Litro

°C – Graus Celsius

rpm – Rotações por minuto

Nm³/h - Medidor normal ao cubo por hora

Mm – Milímetro

µL - Microlitro

UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	RERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	<i>Penicillium expansum</i>.....	14
2.2	Controle Biológico	15
2.2.1	<i>Bacillus amyloquifaciens</i>	13
2.2.2	<i>Bacillus megaterium</i>	14
2.2.3	<i>Bacillus pumilus</i>	14
2.2.4	<i>Bacillus subtilis</i>	15
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivos específicos.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Microrganismos antagonistas e fungo filamentosso deteriorante	17
4.2	Padronização do inóculo de <i>Bacillus</i> spp. e de <i>P. expansum</i>.....	17
4.3	Ensaio antifúngico em meio sólido	18
4.4	Determinação da atividade antifúngica de <i>Bacillus</i> spp. contra <i>P. expansum</i>.....	19
4.5	Análise do mecanismo de antagonismo	19
4.6	Análise estatística	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32

1 INTRODUÇÃO

As infecções atingem 25% da produção total de frutas colhidas em países industrializados, podendo atingir níveis superiores a 50% em países em desenvolvimento (SPADARO; GULLINO, 2004). O mofo azul, causado por *Penicillium expansum*, é a principal doença pós-colheita em maçãs. A infecção ocorre por meio de lesões durante a colheita ou manuseio, resultando na proliferação do fungo e consequentemente a decomposição do fruto durante o armazenamento e comercialização (AMARANTE *et al.*, 2016; MENDES *et al.*, 2016).

Os fungicidas químicos ainda são o principal meio de controle de doenças no campo e em pós-colheita (VITORATOS *et al.*, 2013). Entretanto, o uso desses produtos vem diminuindo no mercado devido aos riscos toxicológicos à saúde humana, bem como ao surgimento de cepas fúngicas resistentes (DROBY, 2006).

O biocontrole surgiu como uma alternativa para fornecer proteção de longo prazo (FERNANDO *et al.*, 2005; MERCIER; JIMENEZ, 2004). *Bacillus spp.* vêm sendo utilizados como agentes de controle biológico contra patógenos de plantas (EMMERT, HANDELSMAN, 1999), disponibilizados como produtos biofungicidas registrados no mercado. Esses produtos à base de *Bacillus spp.* são comercializados para o controle de uma diversidade de fungos filamentosos deteriorantes de frutas, cujo mecanismo de ação pode envolver desde competição por espaço e nutrientes e também a antibiose, ou seja, produção de compostos com ação antifúngica (PINCHUK *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2001).

São descritas cada vez mais espécies de *Bacillus* altamente adaptadas ao estresse abiótico e biótico. A capacidade do gênero de produzir endósporos é vantajosa, uma vez que permanecem viáveis por longos períodos por conferir resistência a condições adversas, tais como desidratação, tratamento térmico e substâncias químicas, evitando desperdícios financeiros, assim como aumentando a oferta de produtos mais sustentáveis (MELO; NASCIMENTO; SERRA, 2021; AMARESAN *et al.*, 2020).

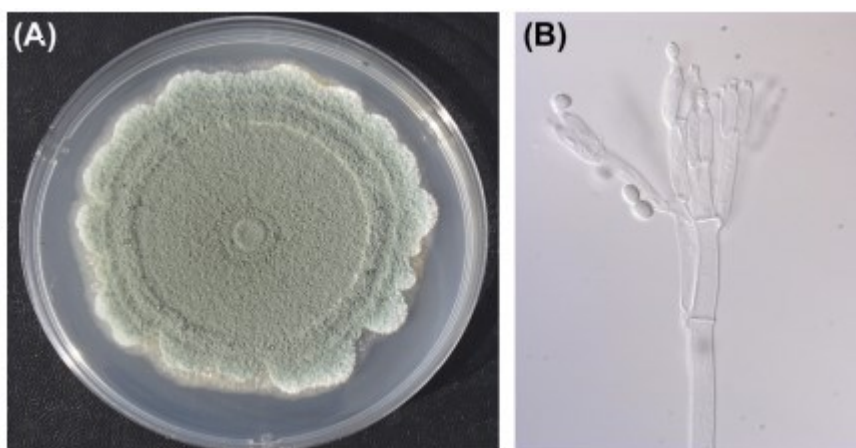
Os produtos biológicos comerciais descritos na literatura não relatam *P. expansum* como fungo alvo de controle. Sendo assim, o estudo sobre o efeito inibitório de *Bacillus spp.* contra este fungo possibilitará aumentar o espectro de ação e ampliar a sua aplicação para o controle de outros frutos pós-colheita.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Penicillium expansum*

Fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* podem ser encontrados nos mais diferentes habitats, inclusive em condições extremas (LEVIN *et al.*, 2019). Este fungo é responsável pelo apodrecimento de matéria orgânica causando doenças em frutos alimentícios (YADAV *et al.*, 2018). O nome *Penicillium*, que significa “pequeno pincel” em latim, foi introduzido pela primeira vez por Johann Heinrich Friedrich Link (1809), que descreveu três espécies: *P. candidum*, *P. glaucum* e o *P. expansum* (AMARESAN *et al.*, 2020). *Penicillium expansum* é um fungo ubíquo de origem do solo que pode ser encontrado em muitas frutas, sendo uma delas a maçã (ASSAF *et al.*, 2018). Para a identificação de *P. expansum* considera-se as características da colônia no meio de cultura sólido, que inicialmente apresenta coloração branca, passando a ficar verde-amarelo para verde-azulado em 3-4 dias (Figura 1A). O padrão micromorfológico, consiste em conídios com cabeças assimétricas e com ramificação em dois estágios, classificados como terverticilado, e os conidióforos são lisos (Figura 1B) (ERRAMPALLI, 2014).

Figura 1. Imagem macroscópica e microscópica do fungo *Penicillium expansum*. (A) Colônia de *Penicillium expansum* em meio de ágar batata dextrose (PDA) e (B) fotomicrográfica de conidióforo de *P. expansum*



Fonte: ERRAMPALLI, 2014.

O *Penicillium expansum*, agente etiológico do mofo azul, é conhecido mundialmente por ser o patógeno de maior incidência em maçãs (MALANDRAKIS *et al.*, 2013), que infecta a epiderme da fruta e reduz o pH por meio da produção de ácidos orgânicos para utilizar os nutrientes do tecido morto para seu crescimento

(JURICK *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2016; LEVIN *et al.*, 2019). A proliferação dos esporos de *P. expansum* depende da temperatura, que deve estar na faixa entre 15-30 °C (sendo que o ótimo seria entre 21 a 25 °C), e da umidade relativa do ar, que deve estar em 80 a 90% (MAPA, 2020). A doença causada por este fungo pode ser detectada no estágio inicial por apresentar uma podridão aquosa, com aspecto bege-claro, que passa a mudar de cor com o avanço desse microrganismo (SANHUEZA *et al.*, 2004). A contaminação pode acontecer nas operações de pré-colheita, pós-colheita, transporte e no armazenamento da fruta, gerando sérios prejuízos econômicos (YANG *et al.*, 2022).

Para o controle do *P. expansum* são recomendadas algumas alternativas como a desinfestação das caixas de colheita e das câmaras frias, com hipoclorito de sódio e pastilhas de tiabendazol respectivamente, além do uso de fungicidas na pós-colheita (MONDINO *et al.*, 2009; VITORATOS *et al.*, 2013). Uma outra medida que pode ser usada para controlar esse fungo e reduzir a dependência desses produtos químicos é a utilização de microrganismos como agentes de controle biológico (PITT; HOCKING, 2009).

2.2 Controle Biológico

Com o aumento da demanda de produtos alimentícios mais saudáveis e livres de resíduos agroquímicos, tem-se buscado alternativas para um plantio mais sustentável (RODRIGUES; NOGUEIRA; IMBROISI, 2001). Considerando a notória importância da agricultura para o cenário econômico, o controle biológico pode ser usado como uma alternativa promissora (MORANDI, BETTIOL 2009). Segundo pesquisa da Secretaria Estadual de Agricultura e Abastecimento do Paraná (SEAB) feita em 2021, os produtos que não utilizam insumos químicos obtêm preços médios de 30% acima do valor dos convencionais em feiras de produtores do estado (FILIPPIN, 2022).

Conforme o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o *P. expansum* é controlado na pós-colheita por meio de fungicidas benzimidazóis e iprodiona. Entretanto, o uso constante desses produtos químicos pode acabar selecionando estirpes resistentes e, portanto, não devem ser usados mais de uma vez por ciclo, o que faz o agricultor buscar outros tipos de produtos, entre estes os de agentes de biocontrole (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O principal objetivo do uso de produto biológico é proporcionar menos impacto no meio ambiente, mantendo todos os componentes do ecossistema agrícola em perfeito equilíbrio, controlando um microrganismo por meio de outro (D'AGOSTINO, F.; MORANDI, 2009). Com o uso desse antagonista nos tratamentos pós-colheita de frutas, a incidência das podridões causada por fungos é menor (ANTONIOLLI *et al.*, 2011). Os mecanismos de antagonismo entre estes microrganismos podem ser: competição por nutrientes, que varia de acordo com as espécies, antibiose na qual a produção de metabólitos por um microrganismo inibe o desenvolvimento do outro, e por indução de resistência, que estimula a planta a produzir defesa contra o organismo fitopatogênico (MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

O mercado de produtos biológicos comercializados no Brasil cresceu mais de 70% em 2019 provavelmente devido ao estímulo de diminuição do uso de agrotóxicos (MAPA, 2019). Produtos à base de *Trichoderma* spp. ganham destaque nesse meio, por serem recomendados para o controle de fungos fitopatogênicos do solo (MORANDI; BETTIOL, 2009). As bactérias surgem como outro grupo de biocontroladores, representadas principalmente pelos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* spp. (STAMFORD *et al.*, 2004). O gênero *Bacillus* é usado atualmente para a promoção de crescimento de vegetais, uma vez que produzem vários metabólitos que inibem o fungo, favorecendo assim o desenvolvimento da planta (EMMERT; HANDELSMAN, 1999; BUTT; BASTAS, 2022). Algumas espécies vêm sendo estudadas por sua capacidade de inibir fungos deteriorantes de frutas (MOURA *et al.*, 2019).

Atualmente existe uma diversidade de produtos biológicos comerciais registrados no Brasil e indicados para o controle de fungos filamentosos, porém não possuem nenhuma descrição para o controle de *P. expansum* (Tabela 1).

Tabela 1 - Produtos comerciais registrados no Brasil para controle de fungos.

Marca Comercial	Cultura antagonista	Fungos visados	Titular de Registro
Amylo-X SL®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea; Pythium ultimum; Rhizoctonia solani; Sclerotinia sclerotiorum; Colletotrichum gloeosporioides</i>	Mitsui & Co (Brasil) S.A.
Baktillis®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides; Rhizoctonia solani; Fusarium solani f. sp. glycines</i>	Mezfer BR Soluções Agrícolas Ltda
Biobac®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Alternaria porri; Botrytis cinerea; Rhizoctonia solani</i>	UPL do Brasil Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A.
Bio-imune®	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Alternaria solani; Sclerotinia sclerotiorum</i>	Vittia Fertilizantes e Biológicos S.A
Duravel®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea: B. squamosa; Fusarium solani; Pythium ultimum; Phyllosticta citricarpa; Rhizoctonia solani</i> <i>Alternaria dauci; A. porri; A. solani; Botrytis cinerea;</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides; Phyllosticta citricarpa;</i> <i>Cryptosporiopsis perennans; Mycosphaerella fijiensis;</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Basf S.A.
Eco-Shot®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Iharabras S.A. Indústria Química
Quartz SC®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Lallemand Solucoes Biologicas Ltda
Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i> (linhagem QST 713)	<i>Alternaria dauci; A. porri; Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum acutatum; Sclerotinia sclerotiorum;</i> <i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i> <i>Alternaria porri; A. solani; Botrytis cinerea;</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum; Uncinula necator</i> <i>Cryptosporiopsis perennans; Sphaerotheca fuliginea;</i> <i>Sphaerotheca macularis</i>	Bayer S.A.
Sonata®	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum; Uncinula necator</i> <i>Cryptosporiopsis perennans; Sphaerotheca fuliginea;</i> <i>Sphaerotheca macularis</i>	Bayer S.A.

Fonte: Modificado de Monnerat *et al.*, (2020).

2.2.1 *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens é uma bactéria aeróbia, em forma de bastonete, Gram-positiva (CHEN *et al.*, 2007), utilizada como biofertilizante e biopesticida de raízes de plantas (CHOWDHURY *et al.*, 2015). *B. amyloliquefaciens* favorece o crescimento de vegetais por produzir metabólitos secundários, como a inturina, que tem efeito negativo contra fitopatogênicos (TORRES *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2021).

Inicialmente esse microrganismo recebeu o nome de "*B. subtilis* subsp. *amyloliquefaciens*" por compartilhar muitas propriedades comuns com o *Bacillus subtilis*. Uma das características que foi usada para discriminar essas duas espécies é a produção de enzimas com propriedades distintas (PRIEST *et al.*, 1987). *B. amyloliquefaciens* é uma das espécies que mais produz enzimas extracelulares incluindo α -amilase, celulase, proteases e metaloproteínases que auxiliam na digestão de nutrientes (ABREU *et al.*, 2022). Sua nomenclatura foi dada por J. Fukamoto (1943) por ter capacidade de produzir α -amilase de forma liquefeita. Essa espécie tem facilidade na sua adaptação, por formar endósporos resistentes a condições adversas, sendo a temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C (ABREU *et al.*, 2022).

Devido ao seu efeito antifúngico sobre alguns fungos fitopatogênicos e atividade estimulante do crescimento, *B. amyloliquefaciens* vem sendo estudada contra as principais doenças pós-colheita frutíferas (GUO *et al.*, 2021). Segundo Gotor-Vila *et al.* (2017), tratamentos realizados com essa bactéria contra a podridão parda em frutos de caroço (pêssego e nectarina) diminuiu a incidência da doença em 50,3%. Na cultura da macieira, esse microrganismo foi significativamente eficaz (87,5%) contra a podridão anelar causada por *Botryosphaeria dothidea* (CHEN, *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Calvo *et al.* (2017), *B. amyloliquefaciens* reduziu totalmente a incidência de podridão parda em pêssegos quando comparado com o controle negativo, e diminuiu a incidência de *P. expansum* de 100% para 20% em maçãs. O mesmo fungo foi inibido em 42% nas frutas de pêssegos, quando submetidos a um tratamento combinado de *Bacillus* spp. com óleo de capim-limão (ARREBOLA *et al.*, 2010).

2.2.2 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium é uma das maiores bactérias em forma de bastonete descobertas no solo, que possui resistência a condições ambientais extremas, devido à sua alta capacidade de formação de endósporos (EPPINGER *et al.*, 2011; ANDALIB *et al.*, 2016). Essa bactéria Gram-positiva, recebe esse nome por sua forma vegetativa ser aproximadamente 100 vezes maior que de *Escherichia coli* (VARY *et al.*, 2007).

B. megaterium é aeróbico, produtor de vitamina B12 e de enzimas importantes, como a penicilina G acilase e α - e β -amilases (VARY, 1994). Além disso, é promotor de crescimento vegetal que influencia o desenvolvimento da planta (ORTÍZ-CASTRO *et al.*, 2008). Comercialmente, essa bactéria tem como mecanismo de ação a produção de fitormônios e disponibilização de nutrientes, que favorece a fertilidade do solo e o crescimento da planta (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Atualmente existem estudos sobre a eficácia do *B. megaterium* no controle de fungos filamentosos indesejáveis em alimentos e rações animais. Em experimento *in vitro*, essa cepa inibiu o crescimento de *Penicillium verrucosum* em 66,7% (SALEH *et al.*, 2021) e reduziu em 31,67% a doença pós-colheita de grãos de amendoim causadas por *Aspergillus flavus* (KONG *et al.*, 2010). Devido ao seu potencial como agente de biocontrole, os sintomas da doença causada por *Alternaria japonica* em folhas não ultrapassaram 15,56% e o índice de doença em inflorescências dos brócolis ficou em torno de 38% (VÁSCONEZ *et al.*, 2020).

2.2.3 *Bacillus pumilus*

Assim como as outras espécies citadas anteriormente, *Bacillus pumilus* é uma bactéria Gram-positiva, formadora de endósporos termorresistentes em forma de bastonete, que pode ser encontrada em diversos ambientes dentro da biosfera (MONNERAT *et al.*, 2020). O seu papel ecológico está no controle de patógenos bacterianos e fúngicos, além de aumentar a tolerância das plantas a estresses abióticos (ZHENG *et al.*, 2022). Pela sua capacidade de produção de substâncias bioativas como a vanilina e a queratinase, é muito utilizado em processos industriais (YUAN; GAO, 2015). Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, os endósporos de *B. pumilus* foram resistentes ao tratamento térmico de 80 °C durante 30 minutos (LIGNON *et al.*, 2017).

Como agente de biocontrole, *B. pumilus* inibiu em 99% o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e conseqüentemente a produção de ocratoxina pelo fungo (HIGAZY *et al.*, 2020), bem como mostrou atividade antifúngica contra *Trichothecium roseum* (WU *et al.*, 2022). Na promoção de crescimento, a sua aplicação no solo auxiliou na adsorção de nitrogênio em tomate e reduziu efeitos negativos do estresse salino em plantações de arroz (MASOOD; ZHAO; SHEN, 2020; KUMAR *et al.*, 2022).

2.2.4 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis é uma espécie bacteriana Gram-positiva encontrada principalmente no solo, formadora de endósporos altamente resistentes em resposta à escassez de nutrientes e outros estresses ambientais (EARL *et al.*, 2008). Esta espécie é a mais estudada, devido a sua capacidade natural para captação de DNA extracelular (KOVÁCS, 2019). Além de ser usado para pesquisa genética, é utilizado em processos de fermentação como o da silagem de milho, bem como na agricultura, na manutenção da sustentabilidade dos sistemas de cultivo (FRITZE, 2004; BASSO *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2019). Devido à estabilidade dos seus endósporos, pesquisas vêm sendo feitas utilizando este microrganismo como probiótico em formulações de vacinas (DE SOUZA, 2014). *B. subtilis* é produtor de antibióticos como a surfactina e a inturina, que possuem alto potencial para aplicação no controle biológico (WANG *et al.*, 2004).

Na agricultura, *B. subtilis* é comercializado para o crescimento de plantas e controle de doenças de importância agrônômica. Considerado o antagonista mais estudado, esta bactéria se destaca também no controle de fungos fitopatogênicos (D'AGOSTINO *et al.*, 2009; LANNA; FERRO; PINHO, 2010). Para Leelasuphakul; Hemmanee e Chuenchitt (2008), os metabólitos secundários dessa espécie têm grande potencial em suprimir o crescimento de *Penicillium digitatum* na pós-colheita de frutas cítricas. Sua atividade antifúngica foi testada contra a podridão pós-colheita de mangas, que resultou em uma boa eficácia, sugerindo até a substituição do uso de fungicidas químicos (GAVA; ALVES; DUARTE, 2019). O crescimento micelial de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Penicillium expansum*, *Fusarium stilboides*, *Colletotrichum gleosporides* e *Botrytis cinerea* foi controlado de forma eficaz, em virtude da ação de um lipopeptídeo produzido pela bactéria (RODRÍGUEZ-CHÁVEZ *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

Avaliar o controle *in vitro* de *P. expansum* por produto biológico à base de *Bacillus* spp.

3.1 Objetivos específicos

Padronizar o inóculo de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e do produto destas culturas;

Avaliar a atividade antifúngica de culturas isoladas de *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis* e do produto destas culturas contra o desenvolvimento de *P. expansum*;

Identificar os possíveis mecanismos de antagonismo envolvidos no biocontrole.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos antagonistas e fungo filamentoso deteriorante

As culturas de *B. amyloliquefaciens* (BioAction Amylo), *B. megaterium* (BioAction Mega), *B. pumilus* (BioAction Pumilus) e *B. subtilis* (BioAction Subtilis), isoladas e em mix comercial (BioAction Power), foram fornecidas pela empresa Noen Biotecnologia Ltda., situada em Londrina, Paraná, Brasil. Esse laboratório é credenciado pelo MAPA para a realização de análises de produtos biológicos de uso agrônômico em produtos próprios e de terceiros. Como fungo teste foi utilizado a cepa n. 2 de *P. expansum* pertencente à micoteca do Laboratório de Microbiologia da UTFPR, *Campus* Londrina.

4.2 Padronização do inóculo de *Bacillus* spp. e de *P. expansum*

A padronização das culturas de *Bacillus* sp. foi realizada com base no processo de elaboração dos produtos biológicos (culturas isoladas e mix) comercializados pelo laboratório. Inicialmente uma alçada das bactérias foi transferida para dois frascos *Schott* contendo 100 mL de Nutriente Extrato de Levedura e Sal Médio (NYSM). Os frascos contendo as culturas isoladas foram incubados a 30 °C e 180 rpm. Após 24 horas, o volume total do pré-cultivo de cada cultura foi transferido para um frasco reator contendo 10 L do mesmo meio de cultivo, sendo mantido em condição estática com sistema de aeração por ar comprimido (0,5 Nm³/h), em sala de incubação a 30°C. Após 24 horas, transferiu-se o volume para um segundo reator (200 L), contendo o meio de cultivo Meio de Esporulação em Disco (DSM), operando com sistema de aeração por ar comprimido (8 Nm³/h), em sala de incubação a 30°C.

Após a etapa final de cultivo das bactérias isoladas e do mix (BioAction Power), uma alíquota de 1,0 mL foi submetida a diluições decimais seriadas até 10⁻⁶. Semeou-se uma alíquota de 100 µL de cada diluição na superfície de placas de Petri contendo Ágar Caldo de Soja Trypticase (TSA). Após 48 horas de incubação a 28°C, realizou-se a contagem de células viáveis (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

Para padronizar o inóculo de *P. expansum*, uma porção do fungo previamente cultivado em ágar batata dextrose (BDA) a 25 °C por 5 dias foi transferida para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de solução Tween 80 a 0,1%, seguida por agitação para dispersão dos conídios. Posteriormente, uma alíquota de 10 µL foi cuidadosamente depositada na câmara de Neubauer para contagem, resultando na

padronização para $1,0 \times 10^5$ conídios. A fórmula geral (1) utilizada para calcular a concentração de conídios por unidade de volume foi:

$$C = \frac{N \times F \times D}{V} \quad (1)$$

Onde:

- C é a concentração de conídios por unidade de volume,
- N é o número total de conídios contados,
- F é o fator de diluição (que, neste caso, é igual a 1)
- D é o fator de diluição da câmara de Neubauer,
- V é o volume de suspensão examinado.

O inóculo padronizado foi então empregado no ensaio antifúngico.

4.3 Ensaio antifúngico em meio sólido

O ensaio antifúngico em meio sólido foi conduzido utilizando o método de difusão em ágar, com poços. O experimento consistiu de seis tratamentos realizados em triplicata, conforme detalhado na Tabela 2. O experimento foi realizado duas vezes.

Cada tratamento recebeu uma alíquota de 18 μ L do inóculo padronizado em $1,0 \times 10^5$, distribuída uniformemente na superfície da placa contendo BDA, conforme indicado na Tabela 2. Em seguida, foi realizado um orifício central na placa, com um diâmetro de 6,0 mm, no qual foram adicionados 100 μ L de cada tratamento. Como controle negativo, 100 μ L de água destilada estéril foi utilizado.

As placas foram incubadas a 25 °C, e após 5 dias, os diâmetros de inibição foram observados e medidos em milímetros, com o auxílio de um paquímetro.

Tabela 2 – Montagem experimental do teste *in vitro*.

Tratamento	<i>Bacillus</i> spp.
Controle	Água destilada estéril
A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
B	<i>Bacillus megaterium</i>
C	<i>Bacillus pumilus</i>
D	<i>Bacillus subtilis</i>
E	Mix de <i>Bacillus</i> spp. (BioAction Power)

Fonte: Autoria própria.

4.4 Determinação da atividade antifúngica de *Bacillus* spp. contra *P. expansum*

Os diâmetros de inibição foram utilizados para calcular a atividade antifúngica das bactérias antagonistas contra *P. expansum*. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada mediante o cálculo da porcentagem de inibição, utilizando a fórmula (2):

$$\%I = \frac{Dt - Dc}{Dt} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

- %I representa a porcentagem de inibição,
- Dt é o diâmetro de inibição do fungo no tratamento,
- Dc é o diâmetro de inibição no controle negativo (água).

4.5 Análise do mecanismo de antagonismo

O mecanismo antagônico foi investigado por meio da observação do crescimento do fungo e das culturas de *Bacillus* sp. nas placas de Petri no ensaio antifúngico.

Considerou-se como competição por espaço e nutrientes (CN), quando ocorreu crescimento de massa celular das culturas bacterianas ao redor dos poços na superfície do meio de cultura, de encontro com o crescimento micelial de *P. expansum*. O fenômeno de antibiose (A) foi caracterizado pela formação de halo de inibição (ausência de crescimento fúngico) a partir dos poços inoculados com *Bacillus* spp. Além disso, a presença simultânea dos dois mecanismos (competição por espaço e nutrientes e antibiose) também foi devidamente considerada (A, CN).

4.6 Análise estatística

Os resultados do ensaio antifúngico em meio sólido foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância ($p < 0,05$). Foi empregado o programa Statistica 12.0 (Statsoft, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de maçã, assim como outros frutos, sofre prejuízos econômicos durante as etapas pós-colheita devido à deterioração provocada por fungos fitopatogênicos, como o mofo azul causado pelo *P. expansum* (BARAD et al., 2016). Produtos sintéticos utilizados para controlar esses patógenos, têm demonstrado efeitos adversos, tais como a seleção de cepas resistentes, além de problemas toxicológicos associados à saúde humana e ao impacto ambiental (DUKARE et al., 2019). O biocontrole realizado por microrganismos através de atividades antagônica tornou-se uma alternativa promissora em comparação com os métodos tradicionais utilizados (de OLIVEIRA-NASCIMENTO et al., 2016).

No estudo do controle *in vitro* de *P. expansum* por produto biológico à base de *Bacillus* spp. neste trabalho, o inóculo das culturas antagonistas foi padronizado de acordo com o processo de elaboração desses produtos (culturas isoladas e mix) comercializados pelo laboratório. Na Tabela 3 estão apresentadas as concentrações de *Bacillus* spp. em UFC/ mL. Com exceção da cultura de *B. megaterium*, todas as culturas foram aplicadas no experimento em concentrações acima de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL, favorecendo a representatividade do inóculo em testes de controle biológico.

Tabela 3 – Concentração dos *Bacillus* spp em UFC/mL.

Cultura	Concentração (UFC/mL)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	$3,7 \times 10^8$
<i>B. megaterium</i>	$5,1 \times 10^7$
<i>B. pumilus</i>	$6,9 \times 10^8$
<i>B. subtilis</i>	$7,2 \times 10^8$
Mix de <i>Bacillus</i> spp.	$4,2 \times 10^8$

Fonte: Autoria própria.

Nesse trabalho foi avaliado o efeito antagônico de diferentes espécies de *Bacillus*, na forma isolada e um Mix dessas culturas, sobre *P. expansum*. No ensaio antifúngico em meio sólido apresentado na Figura 2, observa-se claramente a inibição de *P. expansum* a partir da formação de halos ao redor dos poços nas placas.

Na Tabela 4 estão apresentados os diâmetros de inibição obtidos no ensaio antifúngico em meio sólido e o mecanismo antagônico das culturas de *Bacillus* spp. sobre *P. expansum*.

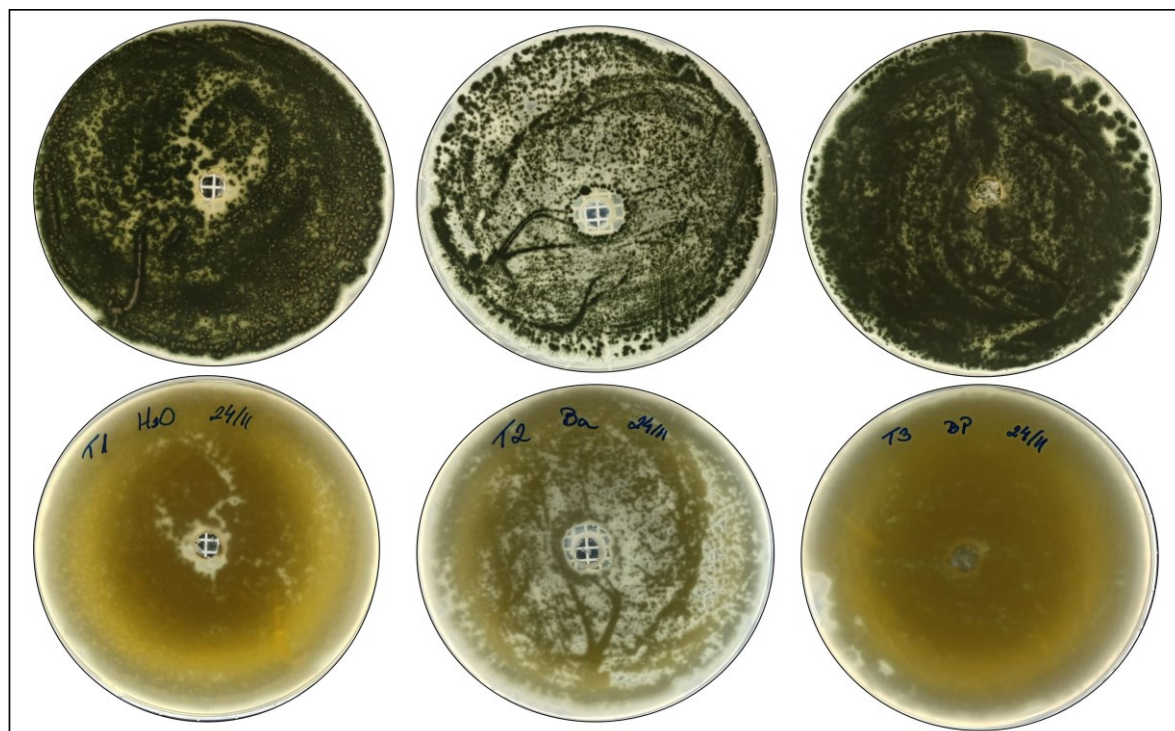
Tabela 4 – Diâmetros de inibição e mecanismo antagônico de culturas de *Bacillus* spp. sobre *Penicillium expansum* a partir do ensaio antifúngico em meio sólido.

Tratamento	Diâmetro de inibição (mm)*	Mecanismo de ação**
Controle (água destilada estéril)	6,0 ± 0,00 ^D	-
Cultura de <i>B. amyloliquefaciens</i>	12,7 ± 0,67 ^C	A
Cultura de <i>B. megaterium</i>	15,4 ± 1,67 ^B	CN
Cultura de <i>B. pumilus</i>	15,5 ± 1,65 ^B	CN
Cultura de <i>B. subtilis</i>	18,1 ± 1,45 ^A	A, CN
Mix de <i>Bacillus</i> spp.	17,7 ± 1,86 ^{AB}	A, CN

* média ± desvio padrão de seis respostas (3 por repetição). Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente, ao nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey. **A: antibiose; CN: competição por nutrientes.

As médias dos diâmetros de inibição obtidos para os tratamentos com as culturas de bactérias variaram de 12,7 mm (*B. amyloliquefaciens*) a 18,1 mm (*B. subtilis*). Em relação ao Mix de *Bacillus* spp., a média do diâmetro de inibição não diferiu estatisticamente das médias dos diâmetros obtidos com as culturas isoladas de *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. pumilus*. Por outro lado, *B. amyloliquefaciens* diferiu de todos os demais tratamentos ($p < 0,05$).

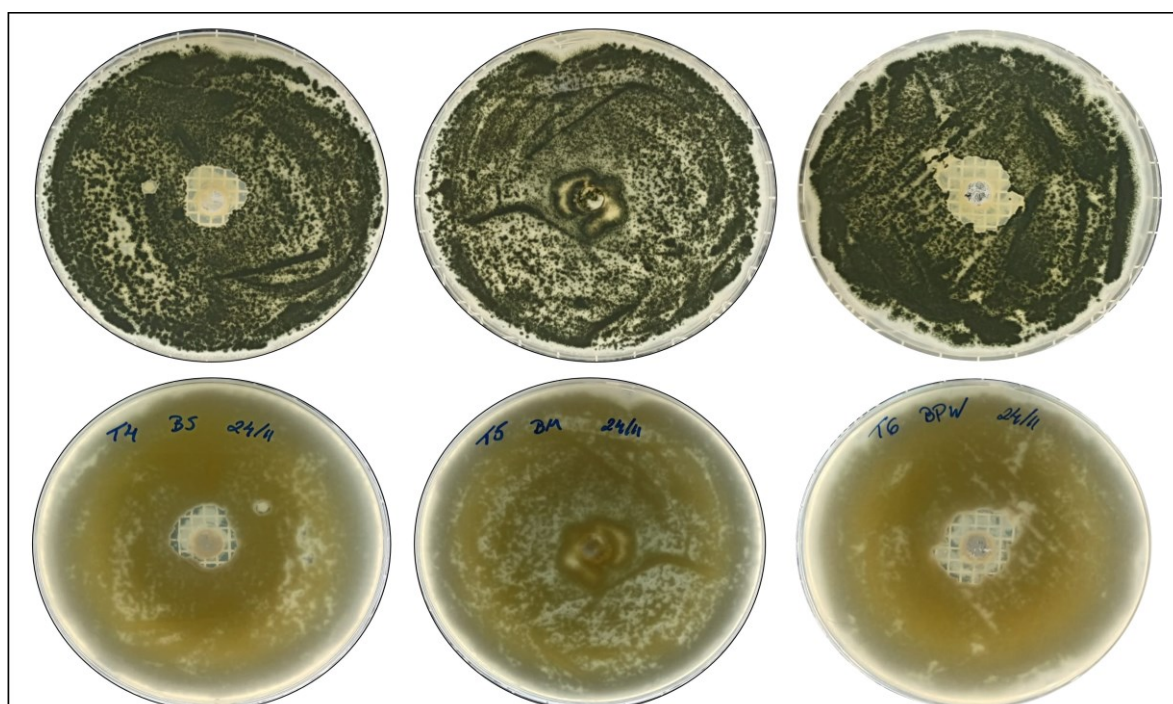
Figura 2. Ensaio antifúngico em meio sólido com culturas de *Bacillus* spp. (vista frontal e traseira da placa).



P. Expansum + H₂O

P. expansum + *B. amyloliquefaciens*

P. expansum + *B. pumilus*



P. Expansum + *B. subtilis*

P. expansum + *B. megaterium*

P. expansum + Mix

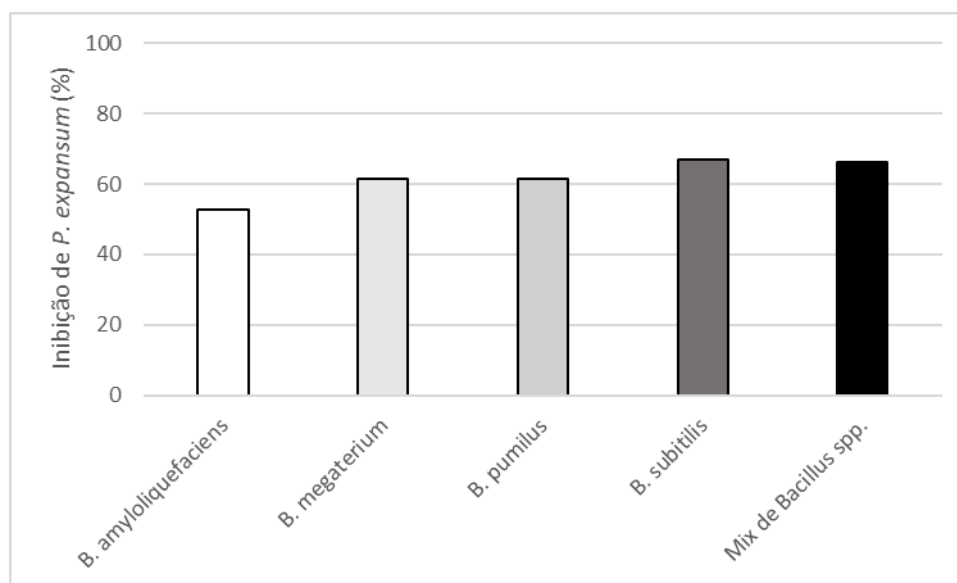
Fonte: Autoria própria.

Quanto ao mecanismo antagônico, *B. megaterium* e *B. pumilus* atuaram exclusivamente por competição de espaço e nutrientes, ao passo que *B.*

amyloliquefaciens atuou apenas por antibiose. *B. subtilis* e o Mix de *Bacillus* spp. mostraram ação antifúngica baseada na interação antibiose / competição por nutrientes (Tabela 4, Figura 2).

Sobre a atividade antifúngica, a porcentagem de inibição de *P. expansum* variou de 52,8 a 66,9%. Com exceção do tratamento empregando *B. amyloliquefaciens*, todos os demais mostraram inibição maior que 61% (Figura 3).

Figura 3. Efeito antifúngico das culturas de *Bacillus* sp. isoladas e do Mix de *Bacillus* spp. contra *P. expansum*.



Fonte: Autoria própria.

Os resultados encontrados neste trabalho ressaltam a eficácia das culturas de *Bacillus* spp., na capacidade de inibir o crescimento de *P. expansum* no meio sólido. Embora *B. megaterium* e *B. pumilus* não tenham atuado por antibiose, sua ação deve-se à capacidade de competir eficazmente por recursos, impactando o crescimento de *P. expansum* de maneiras distintas. Os tratamentos empregando *B. subtilis* isolado e o Mix de *Bacillus* spp., mostraram ser uma opção altamente eficaz, com porcentagem de inibição acima de 66% (Figura 3). Entretanto, o emprego de culturas isoladas pode ser mais vantajoso do que o mix de culturas, tendo em vista a agilidade no preparo e padronização do inóculo, menor possibilidade de contaminação e consequentemente diminuição de custos.

Alguns estudos na literatura descreveram o efeito antagônico de espécies de *Bacillus* frente a fitopatógenos, incluindo *P. expansum*. Essa atividade é encontrada naturalmente na superfície de plantas e frutos que possuem microrganismos

responsáveis pela sua defesa a agentes patogênicos (DROBY; WISNIEWSKI, 2018). López-González e colaboradores (2021) isolaram diferentes bactérias nas fases de maturação de maçãs, encontrando principalmente *Bacillus* spp. Os mesmos microrganismos isolados exibiram diferentes perfis de antagonismo contra *P. expansum*, sendo *B. subtilis* subsp. *spiziennii* responsável pela atividade mais eficaz (66,9 %). No mesmo estudo foi revelado que o efeito antagônico estava relacionado com a produção de lipopeptídeos antifúngicos.

Ding e colaboradores (2023) isolaram de amostras de solo cepas de *Bacillus* spp. com promissor efeito antagônico contra *P. expansum*. O isolado com melhores efeitos foi *B. mojavensis*, inibindo o crescimento do fungo em 77,4%, além de ser capaz de inibir a produção de patulina, micotoxina sintetizada pelo fungo. O efeito antagônico proporcionado por *B. subtilis* já foi evidenciado em outros fitopatógenos como *Fusarium subglutinans*, *Curvularia luneta*, *Bipolaris* spp. e *Penicillium digitatum* (KUPPER *et al.*, 2013; GASPAR *et al.*, 2017).

Consórcios de bactérias já foram reportadas por terem efeito antagônico promissor, principalmente em virtude de atuarem por meio de diferentes mecanismos de ação na inibição do fitopatógeno (STOCKWELL *et al.*, 2011). Para que o biocontrole seja possível esses microrganismos devem ser compatíveis entre si e exibirem uma interação sinérgica para promover a inibição do patógeno (XU; JEGER, 2013).

Por fim, o Mix de *Bacillus* spp. utilizado neste trabalho mostrou porcentagem de inibição de *P. expansum* similar ao de *B. subtilis* na forma isolada, provavelmente devido a interação de mais de um mecanismo de ação. O biocontrole exercido pelo Mix pode estar relacionado tanto com o sinergismo de todas as cepas utilizadas, quanto de uma superioridade de efeito de *B. subtilis*.

6 CONCLUSÃO

Dentre os tratamentos testados no controle de *P. expansum*, *B. subtilis* emergiu como uma opção altamente eficaz, mostrando atividade antifúngica por antibiose e competição por espaço e nutrientes. Essa dualidade de mecanismos confere uma vantagem ímpar, tornando *B. subtilis* o tratamento mais promissor para o controle de *P. expansum*.

Nesse contexto, frente à busca por métodos mais sustentáveis e seguros na produção de maçã, destaca-se o biocontrole utilizando *Bacillus* spp., com especial ênfase no *B. subtilis*, como uma alternativa promissora e eficaz para mitigar os prejuízos econômicos decorrentes da deterioração pós-colheita causada pelo fungo em questão. Este estudo oferece perspectivas para a implementação prática dessas estratégias no âmbito agrícola.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. P. S. *et al.* Alternativa sustentável de uso de *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 16, n. 1, p. 1-15, jun. 2022.
- AMARANTE, A. G. M. *et al.* Amadurecimento e qualidade de frutos e controle pós-colheita de *Penicillium expansum* em maçãs 'fuji' com óleos essenciais. *In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 26., 2016, Lages. **Anais [...]** Lages: UDESC, 2016.
- AMARESAN, N *et al.* **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and fungi**. 1. ed., Cambridge, Elsevier: Academic Press, 2020.
- ANDALIB, R. *et al.* Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. **Construction and Building Materials**, v. 118, p. 180-193, ago. 2016.
- ANTONIOLLI, L. R. *et al.* Controle alternativo de podridões pós-colheita de framboesas. **Pesq. agropec. bras.**, v. 46, n. 9, p. 979-984, set. 2011.
- ARREBOLA, E. *et al.* Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. **Crop Protection**, v. 29, n. 4, p.369-377, abr. 2010.
- ASSAF, C. E. H. *et al.* Impact of veA on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, n. 8, p. 1971-1983, mar. 2018.
- BASSO, F. C. *et al.* Fermentation characteristics and aerobic stability of corn silages inoculated with "*Bacillus subtilis*". **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 13, n. 4, p. 1009-1019, dez. 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio brasileiro: desempenho do comércio exterior**. Brasília, DF: MAPA, 2019. Acesso em: 27 maio 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agronegócio brasileiro: desempenho do comércio exterior**. Brasília, DF: MAPA, 2020. Acesso em: 27 maio 2022.
- BUTT, H.; BASTAS, K. **Sustainable Horticulture: Microbial Inoculants and Stress Interaction: Biochemical and molecular effectiveness of *Bacillus* spp. in disease suppression of horticultural crops**. 1. ed., cap. 15, p. 461-494. Cambridge, Elsevier: Academic Press, 2022.
- CALVO, H *et al.* Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, v. 63, p. 101-110, 2017.

CHEN, XH *et al.* Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nat Biotechnol.**, v.25, n.9, p.1007-14, set. 2007.

CHEN, Xinyi *et al.* Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. **Postharvest Biology and Technology**, v. 115, p. 113-121, maio 2016.

CHOWDHURY, S. P. *et al.* Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. **Frontiers in Microbiology**. v. 6, n. 780, jul. 2015.

COSTA, L. C. *et al.* Desenvolvimento de cultivares de soja após inoculação de estirpes de *Bacillus subtilis*. **Nativa**, v. 7, n. 2, p. 126-132, abr. 2019.

D'AGOSTINO, F.; MORANDI, M. A. B. Análise da Viabilidade Comercial de Produtos à Base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o Controle de Fitopatógenos no Brasil. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

DE SOUZA, R. D. *et al.* *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, jan 2014.

DROBY, S. Improving quality and safety of fresh fruits and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. **ISHS Acta Horticulturae**, v. 709, p. 45-51, maio 2006.

EARL, A. M. *et al.* Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiol**, v. 16, n. 6, p. 269-275, jun. 2008.

EMMERT E. A.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 171, n. 1, p.1-9, fev. 1999.

EPPINGER, M. *et al.* Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 16, p. 4199-4213, ago. 2011.

ERRAMPALLI, D. **Postharvest Decay: Control Strategies: *Penicillium expansum*** (Blue Mold). 1. ed., cap. 6, p. 189-231, Cambridge, Elsevier Inc: Academic Press, 2014.

FERNANDO, W. G. D. *et al.* Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 809-1010, maio 2005.

FILIPPIN, N. Orgânicos estão 30% mais caros que alimentos convencionais nas feiras do Paraná; confira preços. **G1**, 2022. Disponível em: < <https://g1.globo.com/pr/parana/noticia/2022/02/10/organicos-estao-30percent-mais-caros-que-alimentos-convencionais-nas-feiras-do-parana-confira-precos.ghtml> >. Acesso em: 29 maio 2022.

- FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**. V. 94, n. 11, p.1245-1248, nov. 2004.
- GAVA, C. A. T.; ALVES, I. L. S.; DUARTE, N. C. Timing the application of *Bacillus subtilis* QST 713 in the integrated management of the postharvest decay of mango fruits. **Crop Protection**, v. 121, p. 51-56, jul. 2019.
- GOTOR-VILA, A. *et al.* Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. **Crop Protection**, v. 102, p. 72-80, dez. 2017.
- GUO, X. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* M73 reduces postharvest decay and promotes anthocyanin accumulation in Tarocco blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, v. 182, p. 111-698, dez. 2021.
- HIGAZY, M. Novel fractional order SIDARTHE mathematical model of COVID-19 pandemic. **Chaos, Solitons & Fractals** v. 138, p. 110007, set. 2020.
- JIANG, Y.M. *et al.* Postharvest Control of Litchi Fruit Rot by *Bacillus subtilis*. **Lwt**, v. 34, n. 7, p. 430-436, nov. 2001.
- JURICK, W. M. I. *et al.* Identification of wild apple germplasm (*Malus* spp.) accessions with resistance to the postharvest decay pathogens *Penicillium expansum* and *Colletotrichum acutatum*. **Plant Breeding**, v. 130, n. 4, p. 481-486, ago. 2011.
- KONG, Q. *et al.* Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 2, abr. 2010.
- Kovács, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.
- KUMAR, C. G. *et al.* Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 13-17, jan. 2002.
- LANNA, R. F.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias E Biológicas**, v. 4, n. 2, 2010.
- LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 113-121, abr. 2008.
- LEVIN, E. *et al.* Identification of pathogenicity-related genes and the role of a subtilisin-related peptidase S8 (PePRT) in autophagy and virulence of *Penicillium expansum* on apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 149, p. 209-220, 1 mar. 2019.

- LIGNON, J. S. *et al.* Resistência térmica de *Bacillus pumilus* isolado de leite mastítico. *In: Congresso de Iniciação Científica*, 26., 2017, Pelotas. Anais [...] Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2017, p 1-3.
- MALANDRAKIS, A. A. *et al.* Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium expansum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 237-244, abr. 2013.
- MASOOD, S.; ZHAO, X. Q.; SHEN, R. F. *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. **Scientia Horticulturae**, v. 272, p. 109-581, out. 2020.
- MELO, T. A.; NASCIMENTO, I. T. V. S.; SERRA, I. M. R. S. O gênero *Bacillus* aplicado ao controle biológico de doenças de plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e18110917817, jul. 2021.
- MENDES, L. D. *et al.* Avaliação *in vitro* da ação da quitosana e de seu derivado quaternizado na inibição do crescimento do fungo *Penicillium expansum*. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 10, n. 1, p. 116-128, mar. 2016.
- MERCIER, J.; JIMÉNEZ, J. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 31, n. 1, p. 1-8, jan. 2004.
- MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T; MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos tropicais**. 1 ed, Universidade Federal Rural de Pernambuco: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.
- MONDINO, E. A. *et al.* Avaliação das comunidades de nematóides do solo em agroecossistemas orgânicos. **ActaScientiarum Agronomy**, v.31, p.509-515, 2009.
- MONNERAT, R. *et al.* **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura**. 369. ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Embrapa, 2020.
- MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**: Controle Biológico de Doenças de Plantas no. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente. pp. 07-14, 2009.
- MOURA, J. B.; CABRAL, J. S. R. **Mycorrhiza in Central Savannas: Cerrado and Caatinga**. 1 ed., Suíça, Springer International Publishing, 2019.
- ORTÍZ-CASTRO, R. *et al.* Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, N. 4, p. 263-265, abr. 2008.
- PINCHUK, I. V. *et al.* Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 5, p. 269-276, jun. 2022.
- PITT, J. I., HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage: *Penicillium* and Related Genera**, cap.7, p. 169-263. New York: Springer, 2009.

PRIEST, F. G. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 3, p. 69-71, jan. 1987.

RIBEIRO, V. P. *et al.* Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Environmental Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 40-46, nov. 2018.

RODRIGUES, W.; NOGUEIRA, J; IMBROISI, D. Avaliação Econômica da Agricultura Sustentável: o caso dos Cerrados Brasileiros. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 103-130, set. 2001.

Rodríguez-Chávez, J. L. *et al.* Identification of lipopeptides from *Bacillus* strain Q11 with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease. **Postharvest Biology and Technology**, v. 155, p. 72-79, set. 2019.

SALEH, A. E. *et al.* Biocontrol Activity of *Bacillus megaterium* BM344-1 against Toxigenic Fungi. **ACS Publications**, v. 6, n. 16, p. 10984-10990, abr. 2021.

SANHUEZA, R. M. V. *et al.* **Podridões de maçãs frigorificadas: Maçã: pós-colheita**. RS, Brasil: Embrapa Uva e Vinho, 2004.

SPADARO, D. *et al.* State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2, p. 185-184, mar. 2004.

STAMFORD, N. P *et al.* Biofertilizantes de rocha fosfatada com *Acidithiobacillus* como adubação alternativa de caupi em solo com baixo P disponível. **Analytica**, v. 3, n. 9, p. 48-53, 2004.

TORRES, M.J. *et al.* Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. **Microbiological Research**, v. 182, p. 31-39, jan. 2016.

VARY, P. S. *et al.* *Bacillus megaterium* from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied Microbiology and Biotechnolog**, v. 76, n. 5, p. 957-967, jul. 2007.

VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. **Printed in Great Britain**, v. 140, p. 1001-1013, jan. 1994.

VÁSCONEZ, R. D. A. *et al.* Evaluation of *Bacillus megaterium* strain AB4 as a potential biocontrol agent of *Alternaria japonica*, a mycopathogen of *Brassica oleracea* var. *italica*. **Biotechnology Reports**, v. 26, p. 2020, abr. 2020.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. Microbiologia Geral. Inhumas: Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia. 2012.

VITORATOS, A. *et al.* Antifungal Activity of Plant Essential Oils Against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. **Not Bot Horti Agrobo**, v. 41, n. 1, p. 86-92, maio 2013.

WANG J. *et al.* Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. **Lett Appl Microbiol.**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2004.

WU Y. M. *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* strains control strawberry anthracnose through antagonistic activity and plant immune response intensification. **Biological Control**, v. 157, jun. 2021.

WU, S. *et al.* Analysis of the effects of antifungal peptide P-1 from *Bacillus pumilus* HN-10 on energy metabolism of *Trichothecium roseum*. **Food Bioscience**, v. 47, p. 101-668, jun. 2022.

YADAV, A. N. *et al.* **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Penicillium System Properties and Applications.** Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. 1. ed., cap. 1, p. 3-18. Elsevier: 2018.

YANG, S. *et al.* Ergosterol depletion under bifonazole treatment induces cell membrane damage and triggers a ROS-mediated mitochondrial apoptosis in *Penicillium expansum*. **Fungal Biology**, v. 126, n. 1, p.1-10, jan. 2022.

YUAN, Y.; GAO, M. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 10259, maio 2015.

ZHENG, L. *et al.* Encapsulation of *Bacillus pumilus* G5 from polyvinyl alcohol sodium alginate (PVA-SA) and its implications in improving plant growth and soil fertility under drought and salt soil conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 231-243, jun. 2022.

ANEXO A - Lei n. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998



**Presidência da República
Casa Civil
Subchefia para Assuntos Jurídicos**

LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998¹.

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei:

Título I - Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.

¹ Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19610.htm.