



MODULAÇÃO DO VOLATILOMA DE *BACILLUS VELEZENSIS* AMAZÔNICOS POR FUNGOS FITOPATOGÊNICOS: ASSINATURAS QUÍMICAS ASSOCIADAS AO ANTAGONISMO MICROBIANO

Daiane K. Lanferdini¹; Vanessa T. da Rosa¹; Flávio F. Veras¹; Rafaela D. Silveira¹; Adriano Brandelli¹; Juliane E. Welke¹

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
daiane.kraemer.lanferdini@gmail.com; juliane.welke@ufrgs.br

Palavras-Chave: composto orgânico volátil, biocontrole, fungicida.

Introdução

A incidência de fungos na viticultura causa perdas econômicas e compromete a qualidade de uvas e de seus derivados (Welke, 2019). Nas regiões vitivinícolas, as condições ambientais podem favorecer o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos, condição que pode ser intensificada pelas mudanças climáticas. Entre os principais fungos relatados em uvas estão *Colletotrichum acutatum*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus westerdijkiae* e *Penicillium expansum*. Além das perdas decorrentes da deterioração, algumas espécies apresentam relevância toxicológica devido à produção de micotoxinas. Destacam-se *A. carbonarius* e determinadas cepas de *A. niger*, produtoras de ocratoxina A, e *A. flavus*, produtor de aflatoxinas (Mondani *et al.*, 2020).

Fungicidas sintéticos são amplamente utilizados no controle desses microrganismos. Entretanto, seu uso intensivo pode causar impactos ambientais, favorecer a seleção de populações resistentes e aumentar a exposição ocupacional e do consumidor a resíduos químicos (Lahlali *et al.*, 2024). Esse cenário tem estimulado o desenvolvimento de estratégias de controle biológico baseadas em microrganismos antagonistas. Entre eles, espécies do gênero *Bacillus* destacam-se pela produção de metabólitos antifúngicos e pela capacidade de persistir em diferentes ambientes. Estudos anteriores demonstraram que isolados amazônicos de *Bacillus velezensis* controlam fungos fitopatogênicos e reduzem a ocorrência de micotoxinas em uvas e em sistemas enológico em uvas (Veras *et al.*, 2016; Silveira *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2024; Nievierowski *et al.*, 2023; D'Elia Bellos *et al.*, 2025). Análises genômicas também forneceram evidências favoráveis à segurança e ao potencial de aplicação agrícola desses isolados (Bach *et al.*, 2025). Entre as cepas previamente avaliadas, P1, P7, P11 e P45 apresentaram elevada atividade contra fungos toxigênicos, incluindo *A. flavus* e *A. carbonarius*, bem como redução da produção de aflatoxina B₁ e ocratoxina A em meio de cultura (Veras *et al.*, 2016).

A ação antagonista destas bactérias se dá por diferentes mecanismos. Dentre eles estão enzimas líticas, os lipopeptídeos, os peptídeos, os policetídeos, os sideróforos e compostos orgânicos voláteis (COVs). Os COVs são produzidos por vias catabólicas e



possuem vantagens em sua ação devido a não requerem nenhum contato com o fungo alvo ou a planta para exercerem seu antagonismo. Os COVs são considerados sinais químicos, portanto fatores bióticos, como a interação com fungos, podem causar ou interromper sua liberação, sendo liberados especificamente quando necessários (Weisskopf *et al.*, 2021; Grahovac *et al.*, 2023)

O objetivo geral deste trabalho foi investigar como a interação com diferentes fungos fitopatogênicos modula a composição do volatiloma de cepas amazônicas de *B. velezensis* e identificar assinaturas químicas relacionadas ao seu desempenho antifúngico.

Material e Métodos

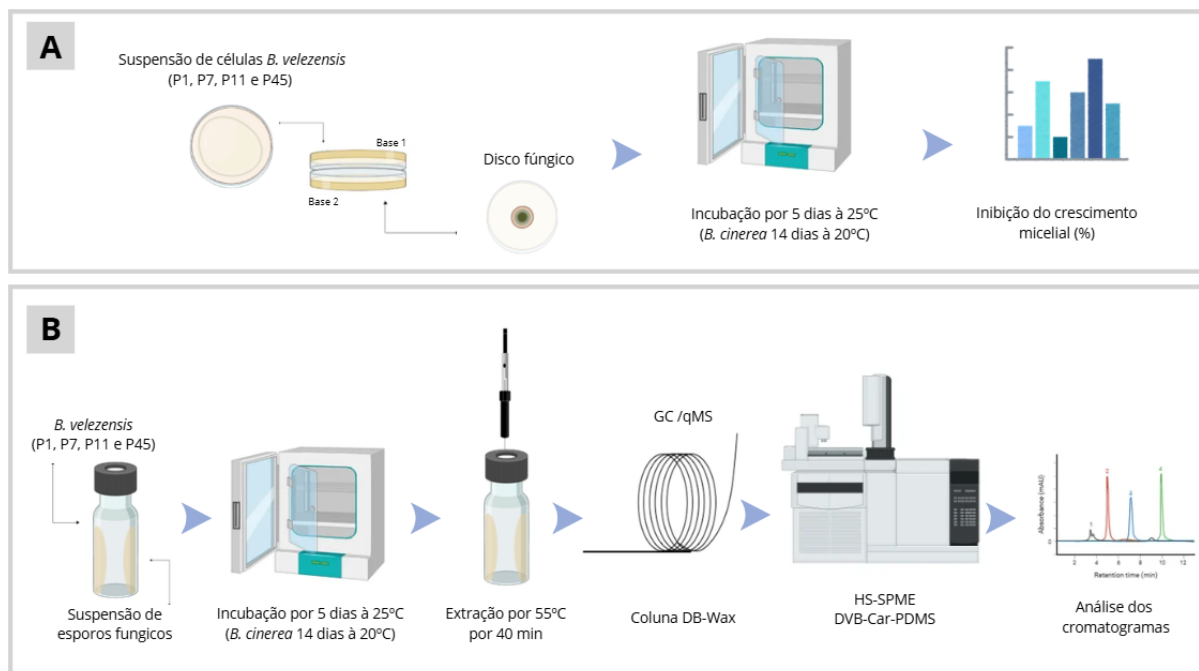
Os isolados fúngicos *B. cinerea* B2PL11H, *C. acutatum* 44-17, *A. carbonarius* ITAL293, *A. niger* UD22, *A. flavus* M19, *A. westerdijkiae* SM22, e *P. expansum* LTQA01 são pertencentes à coleção de fungos do Laboratório de Toxicologia e Qualidade de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os fungos foram cultivados em ágar batata dextrose (BDA) por 7 dias à 25 °C (14 dias à 20°C para *B. cinerea*). A suspensão de esporos foi preparada a partir dessa cultura usando uma solução de Tween 80 0,1%. A contagem de esporos foi realizada na câmara de Neubauer e a concentração da suspensão foi ajustada para 10³ esporos mL⁻¹.

As cepas de *B. velezensis* (P1, P7, P11 e P45) foram isoladas do ambiente aquático da região Amazônica, Brasil, (3 ° 06'S, 60 ° 01'W) conforme descrito por Veras *et al.*, (2016). As cepas de *B. velezensis* foram cultivadas em infusão Cérebro-Coração (BHI) a 37°C, o caldo foi colocado em tubos Falcon centrifugado por 15 minutos a 10.000 rpm à 4°C. A concentração final foi ajustada para 10⁹ UFC mL⁻¹ em NaCl 0,85% p/v.

A avaliação da capacidade dos COVs das cepas de *B. velezensis* em inibir o crescimento micelial ocorreu da seguinte forma, na base 1, uma placa de petri com ágar BHI, 200 µL de cada cepa de *B. velezensis* (10⁹ UFC mL⁻¹) foi inoculada, na base 2, uma placa de petri com ágar BDA, um disco fúngico (5 mm de diâmetro) foi colocado no centro da base. A base 1 foi utilizada de tampa para a base 2, seladas com parafilme e incubadas por 5 dias à 25°C.

A condução dos ensaios para avaliação do volatiloma das cepas *B. velezensis* ocorreram em frascos de vidro de 20 mL para *headspace* com tampa magnética e septo de politetrafluoretileno/silicone (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (**Figura 1A**). Inicialmente 1 mL de ágar BHI estéril foi adicionada na parede do frasco, na parede oposta 1 mL BDA estéril foi adicionada sem contato com o BHI. Após solidificação, uma agulha estéril foi usada para a inoculação das cepas de *B. velezensis* e dos fungos no BHI e BDA, respectivamente. Os frascos foram incubados à 25°C por 5 dias.

Figura 1. Esquema da avaliação do (A) potencial de inibição do crescimento micelial, (B) da obtenção do volatiloma das cepas *B. velezensis* (P1, P7, P11 e P45) isolados e na presença dos fungos *B. cinerea*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae* e *P. expansum*.



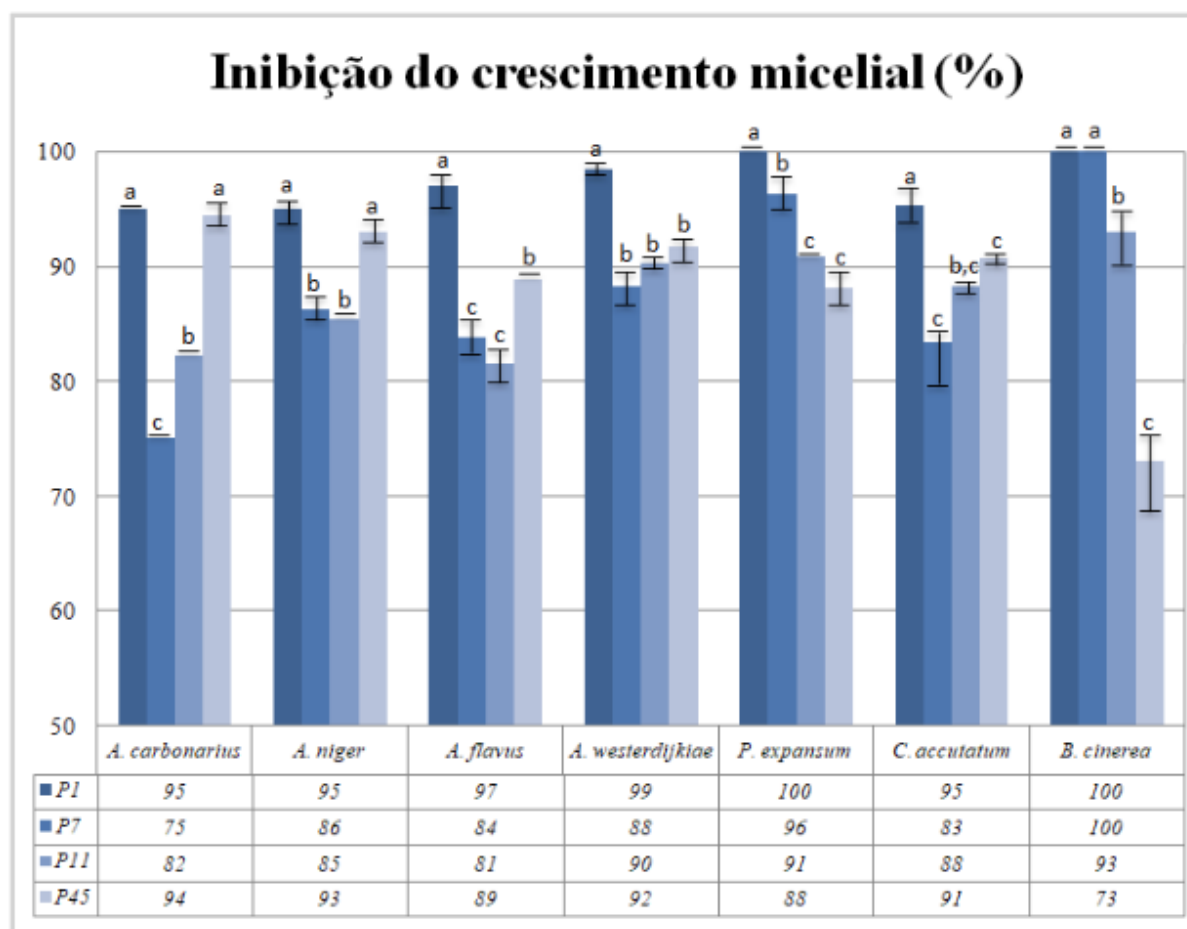
Para a determinação do volatiloma das cepas *B. velezensis* a extração dos COVs foi realizada por 45 min a 55°C por uma fibra de divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (50/30 µm DVB-Car-PDMS, 2 cm, Supelco) de acordo com um protocolo de microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME) previamente otimizado (Welke *et al.*, 2012). Os procedimentos de extração foram feitos usando um amostrador automático (CTC CombiPAL, Zwingen, Switzerland). Frascos contendo somente as cepas de *B. velezensis* foram avaliadas individualmente e na presença dos sete fungos de interesse, além de frascos contendo somente os meios de cultura, BHI e BDA.

Os experimentos foram realizados em triplicata e a análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software XLSTAT2017 (Addinsoft, Nova York, EUA). Os dados referentes à inibição do crescimento micelial dos fungos foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey ($p = 0,05$). Para determinar as diferenças e semelhanças nos perfis dos VOCs das quatro cepas de *B. velezensis* foi aplicado o mapa de calor associado à análise de agrupamentos hierárquicos (HCA).

Resultados e Discussão

Os COVs emitidos pelas quatro cepas de *B. velezensis* inibiram o crescimento micelial dos sete fungos avaliados (**Figura 2**). A cepa P1 apresentou a resposta mais consistentemente elevada, com 95–100% de inibição, seguida por P7 (75–100%), P11 (81–93%) e P45 (73–94%). Resultados semelhantes foram relatados para COVs de isolados endofíticos de *B. velezensis* obtidos de amendoim, lavanda, trigo e feijão, os quais inibiram *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. niger*, *P. expansum* e *B. cinerea* em 67–76%, 43–49%, 10–18%, 69–73% e 78–85%, respectivamente (Boiu-Sicuia *et al.*, 2023). A amplitude de inibição observada para as cepas amazônicas, especialmente P1, evidencia sua capacidade de atuar à distância contra fungos com diferentes características fisiológicas e toxigênicas.

Figura 2. Inibição do crescimento micelial de *B. cinerea*, *C. acutatum*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. westerdijkiae*, e *P. expansum* pelas cepas *B. velezensis* (P1, P7, P11 e P45). Os dados correspondem a experimentos realizados em triplicatas. Para cada fungo, letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey.



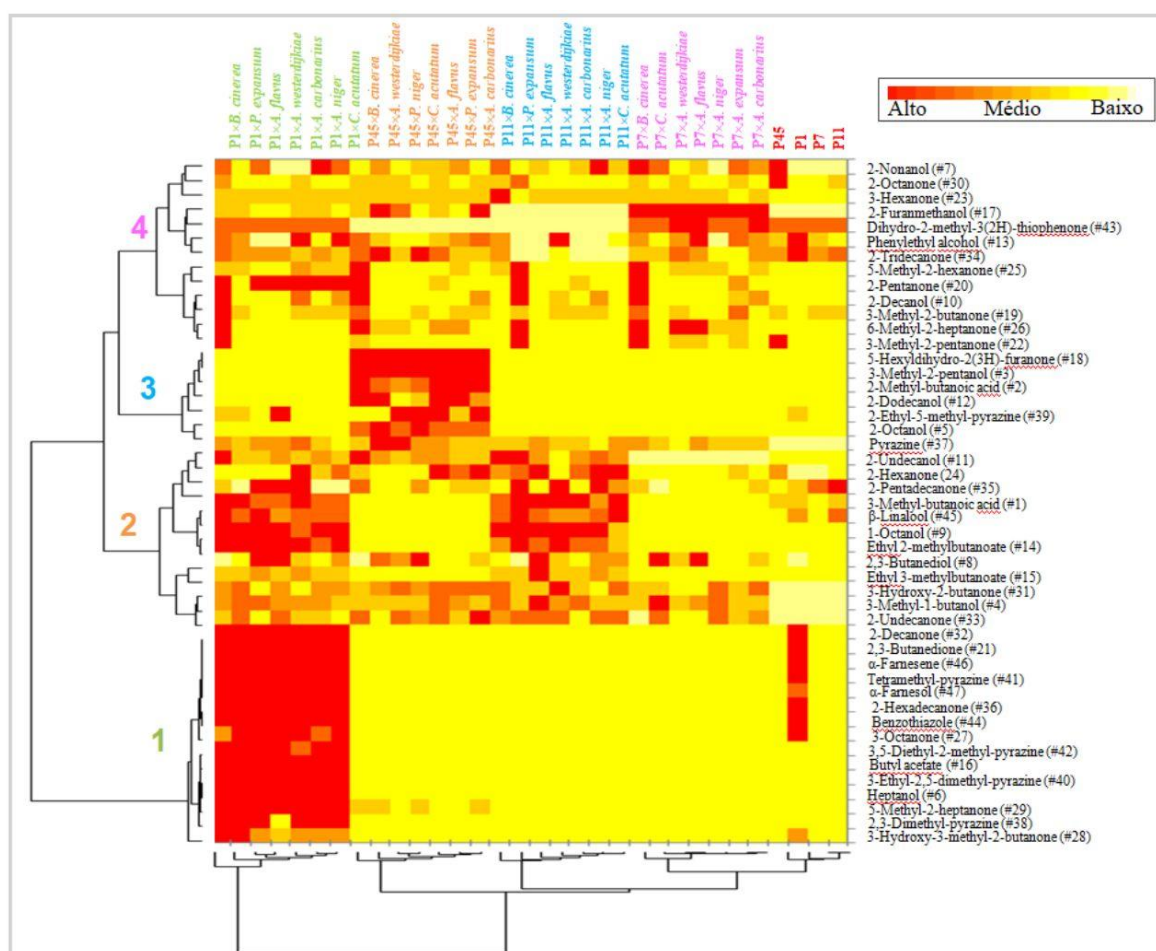
No volatiloma das quatro cepas de *B. velezensis* (P1, P7, P11 e P45) foram identificados 47 COVs pertencentes a nove classes químicas, incluindo: 2 ácidos, 11 álcoois, 3 ésteres, 2 compostos furânicos, 18 cetonas, 6 pirazinas, 2 compostos de enxofre e 3 terpenos. A **Figura 3** apresenta o mapa de calor e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA), que reuniu os COVs em quatro clusters de acordo com seus padrões de abundância entre cepas e condições de interação. No mapa de calor a variação de cores, vermelho, laranja e amarela correspondem aos níveis alto, médio e baixo dos COVs, respectivamente. O comprimento dos ramos do dendrograma indica o nível de semelhança/diferença entre o perfil volátil das cepas de *B. velezensis*.

O cluster 1 reuniu 15 COVs com maior abundância relativa nas condições envolvendo a cepa P1, **confirmando seu perfil mais distinto**. Entre os compostos com níveis semelhantes na presença e na ausência dos fungos estavam 2,3-butanedione (diacetyl), 3-octanone, 2-decanone, 2-hexadecanone, tetramethylpyrazine, benzothiazole e α -farnesene.



Heptanol, butyl acetate, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, 5-methyl-2-heptanone, 2,3-dimethylpyrazine, 3,5-diethyl-2-methylpyrazine e α -farnesol foram detectados apenas nas coculturas envolvendo P1. Além disso, 3-hydroxy-3-methyl-2-butanone apresentou maior abundância nas interações com *B. cinerea* e *P. expansum*. A diversidade de pirazinas foi particularmente elevada em P1, com a detecção de 2,3-dimethylpyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine, tetramethylpyrazine e 3,5-diethyl-2-methylpyrazine. A relevância dessa classe para o antagonismo é sustentada por Huang *et al.*, (2025), que demonstraram que as pirazinas voláteis produzidas por *B. velezensis* reduziram em 41% o crescimento de *Fusarium graminearum*.

Figura 3. Mapa de calor e análise de cluster hierárquica (HCA) do volatiloma das cepas de *B. velezensis* isolados e na presença dos fungos *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. westerdijkiae*, *P. expansum*, *B. cinerea*, e *C. acutatum*.



No cluster 2 os COVs produzidos pelas cepas P1 e P11: 3-methyl-butanoic acid, β -linalool, 1-octanol e ethyl 2-methylbutanoate foram identificados na presença de todos os



fungos. Entretanto, os compostos 2,3-butanediol ethyl 3-methylbutanoate, 3-methyl-2-pentanol, 3-methyl-1-butanol, 2-undecanone e pyrazine foram biossintetizados pelas quatro cepas.

No cluster 3 os compostos 2-methyl-butanoic acid, 3-methyl-2-pentanol, 2-octanol, 2-dodecanol, 5-hexyldihydro-2(3H)-furanone e 2-ethyl-5-methyl-pyrazine foram responsáveis pela distinção do volatiloma da cepa P45.

No cluster 4 os COVs identificados variaram conforme a interação de cada cepa com cada fungo, entres os compostos identificados estão as cetonas 2-octanone, 3-hexanone, 2-tridecanone, 5-methyl-2-hexanone, 2-pentanone, 6-methyl-2-heptanone, 3-methyl-2-pentanone.

Conclusões

Os COVs associados às quatro cepas de *B. velezensis* P1, P7, P11 e P45 inibiram o crescimento micelial dos sete fitopatógenos avaliados, com destaque para P1, que apresentou o maior potencial antifúngico. O volatiloma das cepas bacterianas e das coculturas compreendeu 47 COVs distribuídos em oito classes químicas, com predominância de cetonas, álcoois e pirazinas. A presença dos fungos alterou a abundância relativa dos compostos e esteve associada à detecção de COVs específicos em determinadas combinações cepa–fungo.

O perfil mais distinto de P1, especialmente quanto à diversidade de cetonas e pirazinas, coincidiu com sua maior atividade antifúngica. Entretanto, os resultados não permitem atribuir o antagonismo a um composto isolado e são compatíveis com uma possível ação combinada dos COVs. Esses achados auxiliam na seleção de cepas amazônicas com potencial para o desenvolvimento de estratégias de biocontrole baseadas em metabólitos voláteis.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela FAPERGS, pela CAPES e pelo CNPq.

Referências

- BACH, E.; RITTER, A. C.; SILVEIRA, R. D.; SOUZA, M. A.; PASSAGLIA, L. M. P.; WELKE, J. E.; BRANDELLI, A. Pangenome analysis of *Bacillus velezensis* exploring the probiotic potential and plant growth promotion traits of strains isolated from fish intestines. **Mol. Genet. Genomics** 2025, 300, 20.
- BOIU-SICUIA, O.-A.; TOMA, R. C.; DIGUȚĂ, C. F.; MATEI, F.; CORNEA, C. P. In Vitro Evaluation of Some Endophytic *Bacillus* to Potentially Inhibit Grape and Grapevine Fungal Pathogens. **Plants** 2023, 12(13), 2553.
- D'ELIA BELLOS, M. G.; VERAS, F. F.; DA ROSA, V. T.; SILVEIRA, R. D.; BACH, E.; BRANDELLI, A.; WELKE, J. E. Deciphering the biocontrol ability of *Bacillus velezensis*



strains against phytopathogenic fungi in grapes by in situ and in silico approaches. **Int. J. Food Microbiol.** 2025, 441, 111317.

GRAHOVAC, J.; PAJČIN, I.; VLAJKOV, V. Bacillus VOCs in the Context of Biological Control. **Antibiotics** 2023, 12(3), 581.

HUANG, H.; SHENG, L.; YE, Y.; YANG, Y.; WU, B.; SUN, J.; ZHANG, Y.; XIAO, L.; JI, J.; SUN, X. Bacterial pyrazine volatiles: a novel approach to inhibit Fusarium graminearum growth and mycotoxin production. **Food Biosci.** 2025, 65, 106059.

LAHLALI, R.; TAOUSSI, M.; LAASLI, S.-E.; GACHARA, G.; EZZOUGGARI, R.; BELABESS, Z.; ABERKANI, K.; ASSOUGOUEM, A.; MEDDICH, A.; EL JARROUDI, M.; BARKA, E. A. Effects of climate change on plant pathogens and host–pathogen interactions. **Crop Environ.** 2024, 3, 159–170.

MONDANI, L.; PALUMBO, R.; TSITSIGIANNIS, D.; PERDIKIS, D.; MAZZONI, E.; BATTILANI, P. Pest Management and Ochratoxin A Contamination in Grapes: a review. **Toxins** 2020, 12(5), 303.

NIEVIEROWSKI, T. H.; VERAS, F. F.; SILVEIRA, R. D.; GIOCASTRO, B.; ALOISI, I.; TRANCHIDA, P. Q.; DUGO, P.; BRANDELLI, A.; ZINI, C. A.; WELKE, J. E. A Bacillus-based biofungicide agent prevents ochratoxins occurrence in grapes and impacts the volatile profile throughout the Chardonnay winemaking stages. **Int. J. Food Microbiol.** 2023, 389, 110107.

SILVEIRA, R. D.; VERAS, F. F.; BACH, E.; MANFROI, V.; BRANDELLI, A.; WELKE, J. E. Aspergillus carbonarius-derived ochratoxins are inhibited by Amazonian Bacillus spp. used as a biocontrol agent in grapes. **Food Addit. Contam., Part A** 2022, 39(1), 158–169.

VERAS, F. F.; CORREA, A. P. F.; WELKE, J. E.; BRANDELLI, A. Inhibition of mycotoxin-producing fungi by Bacillus strains isolated from fish intestines. **Int. J. Food Microbiol.** 2016, 238, 23–32.

WEISSKOPF, L.; SCHULZ, S.; GARBEVA, P. Microbial volatile organic compounds in intra-kingdom and inter-kingdom interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021, 19(6), 391–404.

WELKE, J. E. Fungal and mycotoxin problems in grape juice and wine industries. **Curr. Opin. Food Sci.** 2019, 29, 7–13.

WELKE, J. E.; ZANUS, M.; LAZAROTTO, M.; SCHMITT, K. G.; ZINI, C. A. Volatile characterization by multivariate optimization of headspace-solid phase microextraction and sensorial evaluation of chardonnay base wines. **J. Braz. Chem. Soc.** 2012, 23(4), 678–687.