

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIA LAURA SILVA FRANCO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE *Bacillus* spp.
NO CONTROLE DA *Macrophomina phaseolina***

PATOS DE MINAS – MG
MARÇO DE 2026

MARIA LAURA SILVA FRANCO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE METABÓLITOS TERMOESTÁVEIS DE *Bacillus* spp.
NO CONTROLE DA *Macrophomina phaseolina***

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para
obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

PATOS DE MINAS – MG

MARÇO DE 2026

MARIA LAURA SILVA FRANCO

Avaliação *in vitro* de metabólitos termoestáveis produzidos por *Bacillus* spp. no controle de *Macrophomina phaseolina*

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte (UFU)
Presidente

Bióloga Ms. Juliana Ferreira Fuga (LAMAM)
Membro

Prof. Dr. Aulus Estevão Anjos de Deus Barbosa (UFU)
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me fornecer força durante toda a minha trajetória acadêmica, tornando possível a busca pelos meus objetivos.

À minha família: minha mãe Tatiana, meu pai Gilcimar e meu irmão Olavo por todo amor, compreensão e apoio, especialmente nos momentos de ausência e insegurança. Sou profundamente grata por cada ensinamento ao longo da vida, cada sacrifício e esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui, sempre me apoiando. Mesmo com quilômetros nos separando, sempre se tornaram presentes de alguma forma, sendo minha base.

Ao meu namorado, Gabriel, por todo carinho, apoio e incentivo durante todo esse período. Pela presença constante, sempre segurando minha mão, me transmitindo força e segurança para que essa etapa fosse finalizada, tornando o processo mais leve.

À minha amiga, Maria Eduarda, pela amizade desde o começo da faculdade, e que se manteve firme até a reta final dessa jornada. Por todo companheirismo e conquistas divididas.

Ao meu orientador, professor Gilvan, pela paciência e inúmeras contribuições, compartilhando conhecimentos essenciais para o desenvolvimento desse trabalho, sempre conduzindo com respeito e compromisso.

Ao professor Aulus Barbosa, por aceitar o convite para compor a banca de avaliação e pela contribuição significativa para o fortalecimento deste estudo.

Ao pessoal do laboratório LAMAM, Cícero e Juliana, pela oportunidade, disponibilização de materiais e da infraestrutura. Além da valiosa transmissão de seus conhecimentos e habilidades, que contribuirão significativamente para o trabalho.

Por fim, a todos que torceram.

RESUMO

Macrophomina phaseolina representa um dos principais desafios fitossanitários em culturas agrícolas de relevância econômica, em função da sua capacidade de persistir nos solos por meio de microescleródios. Esta característica dificulta seu manejo e compromete as estratégias de controle convencional. O controle químico, apresenta eficiência variável, sendo frequentemente associado a impactos ambientais e riscos à saúde humana, enquanto o controle biológico enfrenta limitações com o uso de microrganismos vivos. Nesse contexto, metabólitos termoestáveis de *Bacillus* spp. surgem como uma alternativa. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade antifúngica gerada por metabólitos termoestáveis no controle da *M. phaseolina*. Isolados bacterianos foram obtidos de amostras de solo por meio de diluição seriada e choque térmico, sendo selecionados cinco isolados (B06, B16, B86, B105 e B120) com melhor desempenho no pré-teste contra o patógeno. Após o cultivo em meio líquido, os extratos brutos de cada isolado foram autoclavados a 127 °C por 15 minutos, para obter os metabólitos termoestáveis. Esses compostos foram incorporados ao meio BDA, nas concentrações de 1% e 2%, e depositado no centro das placas um disco micelial de 5 mm do patógeno. O crescimento micelial (cm) foi avaliado aos 2, 4, 6 e 8 dias. Os resultados evidenciaram efeito inibitório variável entre isolados e doses, com maior eficiência na concentração mais elevada dos extratos brutos. O isolado B06 obteve 54,1 % de inibição na concentração de 1% e 63,2% a 2%, mostrando antagonismo consistente ao fitopatógeno. Os isolados B16 e B86 apresentaram 71,8% e 68,2% de inibição a 2%, respectivamente, demonstrando efetividade na inibição de *M. phaseolina* e potencial para o desenvolvimento de estratégias aplicadas ao controle biológico.

Palavras-chave: *Macrophomina phaseolina*; metabólitos secundários; controle biológico de doenças; culturas agrícolas.

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina represents one of the main phytosanitary challenges in economically important agricultural crops, due to its ability to persist in soils through microsclerotia. This characteristic makes it difficult to manage and compromises conventional control strategies. Chemical control has variable efficiency and is often associated with environmental impacts and risks to human health, while biological control faces limitations with the use of live microorganisms. In this context, *Bacillus* spp thermostable metabolites emerge as an alternative. The present study aimed to evaluate in vitro antifungal activity generated by thermostable metabolites in *M. phaseolina* control. Bacterial isolates were obtained from soil samples through serial dilution and heat shock, and five isolates (B06, B16, B86, B105, and B120) with the best performance in the pre-test against the pathogen were selected. After cultivation in liquid medium, the crude extracts of each isolate were autoclaved at 127 °C for 15 minutes to obtain the thermostable metabolites. These compounds were incorporated into the BDA medium at concentrations of 1% and 2%, and 5 mm pathogen mycelial disc was deposited in the plates center. Mycelial growth was evaluated at 2, 4, 6, and 8 days. The results showed a variable inhibitory effect between isolates and doses, with greater efficiency at the highest concentration of crude extracts. Isolate B06 achieved 54.1% inhibition at a concentration of 1% and 63.2% at 2%, showing consistent antagonism to the phytopathogen. Isolates B16 and B86 showed 71.8% and 68.2% inhibition at 2%, respectively, demonstrating effectiveness in inhibiting *M. phaseolina* and potential for the development of strategies applied to biological control.

Keywords: *Macrophomina phaseolina*; secondary metabolites; bacteria; biological pest control; agricultural crops.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais, constituídos por isolados bacterianos e suas respectivas doses, e o tratamento controle.....	22
Tabela 2. Diâmetro de colônia (cm) do fungo <i>M. phaseolina</i> em meio de cultura BDA, acrescido de metabólitos termoestáveis de diferentes isolados de <i>Bacillus</i> sp. em duas doses, ao longo do tempo.	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- <i>Macrophomina phaseolina</i> cultivada em placa em meio BDA, por período de 7 dias.	12
Figura 2 - Ciclo de infecção da <i>M. phaseolina</i> . (A) Microescleródios permanecem nos resíduos de cultura e solo. (B) A infecção se inicia por contato em novas plantas. (C) Começa a germinação do fungo dentro do caule e raiz, e os micélios colonizam o sistema vascular, o desregulando. (D) Ocorre a produção de mais microescleródios e a morte da planta.....	13
Figura 3 - Representação esquemática dos principais mecanismos de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. contra fitopatógenos fúngicos.....	16
Figura 4 - Extrato bruto após autoclavagem, obtido a partir do cultivo do isolado B06.....	20
Figura 5 - Incorporação do metabólito em meio BDA, ainda líquido, de acordo com cada tratamento.	21
Figura 6 - Crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> na dose de 1%. (A-D) Testemunha; (E-H) Isolado B06; (I-L) isolado B16; (M-P) isolado B86; (Q-T) Isolado B105; (U-X) Isolado B120. Em todos os tratamentos, as avaliações correspondem a 2, 4, 6 e 8 dias de avaliação, respectivamente.	24
Figura 7 – Crescimento micelial de <i>M. phaseolina</i> na dose de 2%. (A-D) Testemunha; (E-H) Isolado B06; (I-L) isolado B16; (M-P) isolado B86; (Q-T) Isolado B105; (U-X) Isolado B120. Em todos os tratamentos, as avaliações correspondem a 2, 4, 6 e 8 dias de avaliação, respectivamente.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	<i>Macrophomina phaseolina</i>	12
1.2	O gênero <i>Bacillus</i>	15
1.3	Metabólitos secundários produzidos por <i>Bacillus</i>	16
1.4	Metabólitos termoestáveis	17
2	OBJETIVO	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivo específico	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Obtenção do isolado de <i>M. phaseolina</i> e dos <i>Bacillus</i> spp.....	19
3.2	Fermentação dos <i>Bacillus</i> e produção de metabólitos termoestáveis.....	20
3.3	Avaliação da ação dos metabolitos termoestáveis contra <i>M. phaseolina</i>	21
3.4	Análise estatística	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Avaliação da ação dos metabolitos termoestáveis contra <i>M. phaseolina</i>	23
5	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Os patógenos do solo representam um dos principais entraves à sustentabilidade e à produtividade dos sistemas agrícolas. Entre esses patógenos, destaca-se o fungo do gênero *Macrophomina*, com ênfase para a espécie *Macrophomina phaseolina*, amplamente distribuída e reconhecida por sua elevada agressividade e ampla gama de hospedeiros. Consoante a isso, o fitopatógeno é responsável por doenças severas, como a podridão-de-carvão e a podridão de raiz e colo, afetando culturas de grande relevância econômica, como soja, feijão, algodão, mamona e feijão-caupi, ocasionando perdas significativas de rendimento e qualidade produtiva (Rangel-Montoya et al., 2022).

A elevada capacidade de sobrevivência de *Macrophomina* no solo está diretamente associada à formação de microescleródios, estruturas de resistência que permitem ao patógeno persistir por longos períodos em condições adversas, dificultando o manejo e favorecendo a reincidência da doença em áreas cultivadas (Souza, 2024). Sendo assim, fatores como altas temperaturas, estresse hídrico e solos compactados contribuem para a intensificação da severidade da doença, tornando o controle ainda mais complexo, sobretudo em sistemas agrícolas intensivos (Almeida et al., 2014).

Uma segunda vertente, sobre o controle de doenças causadas por *Macrophomina* spp. tem sido baseada no uso combinado de diferentes métodos de controle, como rotação de cultura, controle químico, controle biológico e cultivares mais resistentes (Bedendo, 2018; Nascimento et al., 2018).

Entretanto, o uso recorrente de produtos químicos está associado a impactos ambientais negativos, riscos à saúde humana, seleção de populações resistentes de patógenos e elevação dos custos de produção, fatores que têm impulsionado a busca por alternativas mais sustentáveis e eficientes (Pereira do Nascimento, 2023). Além de que, práticas culturais e uso de cultivares mais resistentes podem ajudar, mas não impedem a infecção.

Neste sentido, o controle biológico surge como uma estratégia mais promissora no manejo integrado de doenças de plantas, sendo considerado uma alternativa viável ao controle químico convencional. Essa abordagem baseia-se no uso de microrganismos antagonistas capazes de inibir o crescimento e o desenvolvimento de fitopatógenos por diferentes mecanismos, como antibiose, competição por nutrientes e espaço, produção de enzimas hidrolíticas e indução de resistência nas plantas hospedeiras. Especialmente destaca-se, o

controle biológico no manejo de *M. phaseolina*, por meio da utilização de bactérias e fungos benéficos (Marroni; Germani, 2011; Souza, 2024).

Sobre os microrganismos mais estudados e utilizados no controle biológico, as bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se pelo elevado potencial antagonista e pela versatilidade de mecanismos de ação. Assim sendo, as espécies desse gênero apresentam ampla adaptação ao ambiente agrícola, capacidade de colonização da rizosfera e produção de endósporos, o que confere maior resistência às condições ambientais adversas. Os *Bacillus* spp. são reconhecidos pela produção de uma ampla diversidade de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, incluindo lipopeptídeos, antibióticos, compostos voláteis e enzimas degradadoras da parede celular fúngica (Rangel-Montoya et al., 2022).

Recentemente, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) divulgou o registro de mais de 45 produtos formulados, com destaque para produtos biológicos, sendo a mistura de *Paenibacillus azotofixans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus circulans* recomendada para controle de pragas de solo como os nematóides *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* e fungos *M. phaseolina* e *Rhizoctonia solani*, que afetam diferentes culturas (Brasil, 2023). Apesar dos avanços no uso do controle biológico, sua aplicação em larga escala ainda enfrenta limitações, especialmente relacionadas à estabilidade e a eficácia dos microrganismos em condições de campo. Essas limitações estão associadas as condições de armazenamento e formulações, uma vez que, são constituídos por microrganismos vivos (Burges; Jones, 1998).

Na busca por reduzir as limitações do controle biológico, os metabólitos produzidos por microrganismos antagonistas, em especial metabólitos termoestáveis ou termotolerantes, surgem como uma alternativa inovadora e promissora. Diferentemente do uso direto de células vivas, os metabólitos secundários apresentam maior resistência a processos industriais, ao calor e ao armazenamento prolongado, o que pode facilitar sua incorporação em formulações comerciais e ampliar sua aplicabilidade no manejo fitossanitário. Consequentemente, esses compostos podem manter sua atividade antifúngica mesmo após tratamentos térmicos (Rangel-Montoya et al., 2022).

A avaliação *in vitro* de metabólitos termoestáveis produzidos por *Bacillus* spp. permite compreender, de forma mais precisa, o potencial desses compostos no controle de *Macrophomina* spp., bem como identificar isolados com maior capacidade de produção de substâncias bioativas. Segundo Souza (2024), a exploração desses metabólitos representa um avanço estratégico no desenvolvimento de produtos biológicos mais estáveis, eficientes e

compatíveis com os princípios da agricultura sustentável, contribuindo para a redução do uso de defensivos químicos e para a mitigação de impactos ambientais.

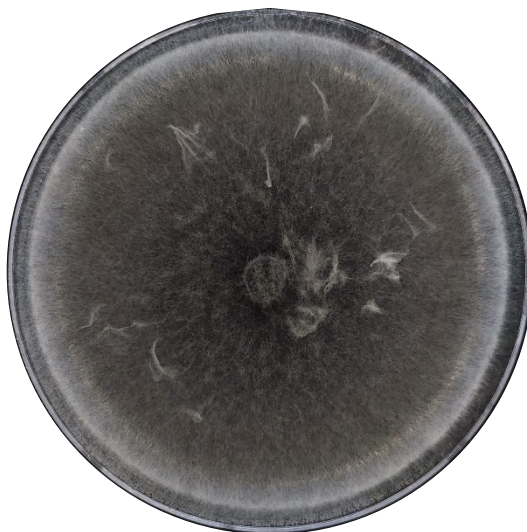
Adicionalmente, a necessidade de novas alternativas para o controle de fungos fitopatogênicos, aliada às limitações do controle químico e às restrições operacionais do controle biológico tradicional, reforça a importância de estudos voltados à investigação de metabólitos termoestáveis produzidos por *Bacillus* spp.. A compreensão desses compostos pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de bioinsumos mais eficientes, com maior estabilidade e aplicabilidade prática, atendendo às demandas atuais por sistemas agrícolas mais sustentáveis, seguros e economicamente viáveis, sendo uma iniciativa de forte aderência ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável nº 2 - Fome zero e agricultura sustentável (ONU Brasil, 2026).

Assim, o presente estudo justifica-se pela relevância científica e prática de avaliar in vitro o potencial antagonista de metabólitos termoestáveis produzidos por *Bacillus* spp. no controle de *Macrophomina* spp., buscando ampliar o conhecimento sobre estratégias inovadoras de manejo fitossanitário e fornecer subsídios para o avanço da pesquisa e do desenvolvimento de bioinsumos.

1.1 *Macrophomina phaseolina*

O fungo *M. phaseolina* (Tassi) Goid. é um fungo fitopatogênico de importância global (Figura 1), pertencente ao filo Ascomycota e à família Botryosphaeriaceae, amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais (Mycobank, 2026). No Brasil, ele é reconhecido como um dos principais agentes de podridões em diversas culturas de grande relevância econômica, incluindo soja, feijão, algodão e milho, sendo o agente causal da podridão-de-carvão, doença que afeta raízes e caules das plantas hospedeiras (Almeida et al., 2014).

Figura 1- *M. phaseolina* cultivada em placa em meio BDA, por período de 7 dias.

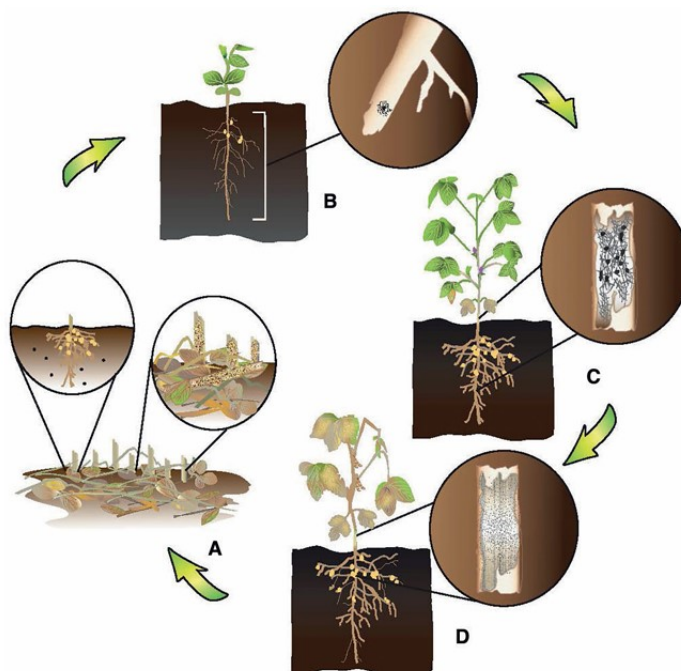


Fonte: Elaborada pela autora.

A principal característica epidemiológica de *M. phaseolina* é sua capacidade de sobreviver como estruturas de resistência denominadas microescleródios, que persistem no solo e em restos culturais, conseguindo sobreviver por longos períodos, de 2 a 15 anos (Baggio et al., 2019). Nos tecidos infectados, estes microescleródios representam a principal fonte de inóculo primário em áreas agrícolas, originando a partir de micélios, constituindo estruturas multicelulares, rígidas e altamente resistentes (Almeida et al., 2014). Uma vez germinados, os micélios infectam o sistema vascular, colonizando os tecidos de maneira necrotrófica e levando à obstrução dos vasos condutores de água, resultando em sintomas como clorose foliar, murcha progressiva, necrose e eventual morte da planta (Figura 2) (Marquez et.al., 2021).

A ampla gama de plantas hospedeiras, sendo mais de 500 espécies conforme estudos filogenéticos e fitopatológicos, classifica *M. phaseolina* como um patógeno polífago e com capacidade saprofítica, podendo se alimentar de diversas espécies, além de tecidos vegetais mortos e matéria orgânica (Dubey et al., 2009). Esse comportamento representa um dos principais desafios no controle integrado de doenças de solo, pois a presença de microescleródios viáveis no solo pode levar à reinfecção de culturas sucessoras, mesmo na ausência de sintomas na safra anterior, especialmente com a movimentação do solo por máquinas agrícolas (Romero Luna et al., 2017; Sartori, 2023).

Figura 2 -Ciclo de infecção da *M. phaseolina*. (A) Microescleródios permanecem nos resíduos de cultura e solo. (B) A infecção se inicia por contato em novas plantas. (C) Começa a germinação do fungo dentro do caule e raiz, e os micélios colonizam o sistema vascular, o desregulando. (D) Ocorre a produção de mais microescleródios e a morte da planta.



Fonte: Adaptado de Romero Luna et al. (2017).

O controle de *M. phaseolina* tem se baseado em métodos químicos e práticas culturais, como rotação de culturas, controle químico, uso de cultivares mais tolerantes, manejo de irrigação e controle biológico (Romero Luna et al., 2017).

A rotação de cultura pode ser uma prática considerada, mas não confiável, devido a capacidade elevada de sobrevivência de *M. phaseolina* no solo. De modo semelhante, o manejo de irrigação pode ajudar no estresse hídrico, que é um fator agravante da doença, porém não impede a infecção (Marquez et al., 2021). Sob a mesma perspectiva, embora diversos estudos tenham testado diferentes princípios ativos sobre a ação do patógeno, até o momento, não há um produto químico que apresente eficácia em condições de campo, já que não há registro de que se movam em direção às raízes da planta (Marquez et al., 2021).

Diante dessas limitações, o controle biológico se destaca como uma forma de controle promissora. Segundo Marroni e Germani (2011), isolados de *Bacillus* spp. apresentaram elevada eficiência no controle *in vitro* de *M. phaseolina*, promovendo significativa inibição do crescimento micelial do patógeno. Os autores atribuíram esse efeito, principalmente, à produção de metabólitos antagonistas capazes de interferir no desenvolvimento do fungo, evidenciando o potencial dessas bactérias como agentes de controle biológico. Posto isso, os resultados semelhantes foram observados por Rodrigues et al. (2022), que avaliaram *Bacillus* spp. no controle de microescleródios de *M. phaseolina*, destacando a importância desses microrganismos na redução da viabilidade das estruturas de resistência do patógeno no solo.

1.2 O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* engloba um conjunto diverso de bactérias quimioheterotróficas, pertencentes à família Bacillaceae. Trata-se de bactérias no formato de bastonetes, predominantemente Gram-positivas, apresentando metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo (Félix, 2023).

As diversas espécies de *Bacillus* apresentam elevada tolerância a diferentes tipos de estresse, especialmente estresses ambientais, como altas temperaturas, pH extremo, radiações e agentes químicos nocivos, estando diretamente relacionada à formação de endósporos, estruturas dormentes protegidas por envoltórios altamente resistentes, com baixo teor de água e ausência de atividade metabólica. Tais características são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular por longos períodos, quando as condições ambientais se tornam novamente favoráveis, os esporos podem retomar o crescimento ativo. Na presença de nutrientes adequados, inicia-se o processo de germinação e, em poucos minutos, ocorre o retorno do crescimento (Cho; Chung, 2020).

Os endósporos podem ser observados por meio de microscopia eletrônica, evidenciando uma organização estrutural complexa, composta por múltiplas camadas concêntricas. A região central, denominada core, abriga o material genético associado a proteínas ácido-solúveis, além do DNA. Essa região é envolvida por uma membrana lipídica e por uma espessa camada de peptidoglicano. O córtex, que constitui a maior parte do esporo, não contém peptidoglicanos e tem como principal função manter a atividade metabólica do core em níveis reduzidos. Externamente ao córtex encontra-se o *coat*, uma estrutura multicamadas responsável tanto pela resistência quanto pela germinação do esporo, apresenta funções enzimáticas que possibilitam a interação do microrganismo com o ambiente (Setlow, 2014; Cho; Chung, 2020; Driks, 2002; Queiroz, 2025). Como *Bacillus anthracis* e *Bacillus thuringiensis*, possuem ainda uma camada adicional denominado exosporium, ausente em *Bacillus subtilis*, cuja função ainda não está completamente esclarecida (Setlow, 2014).

As espécies desse gênero destacam-se pela produção de compostos de interesse biotecnológico, como enzimas amilolíticas e proteolíticas, bem como antibióticos, muitos dos quais apresentam reconhecida atividade antifúngica (Melo; Azevedo, 1998; Souza, 2024).

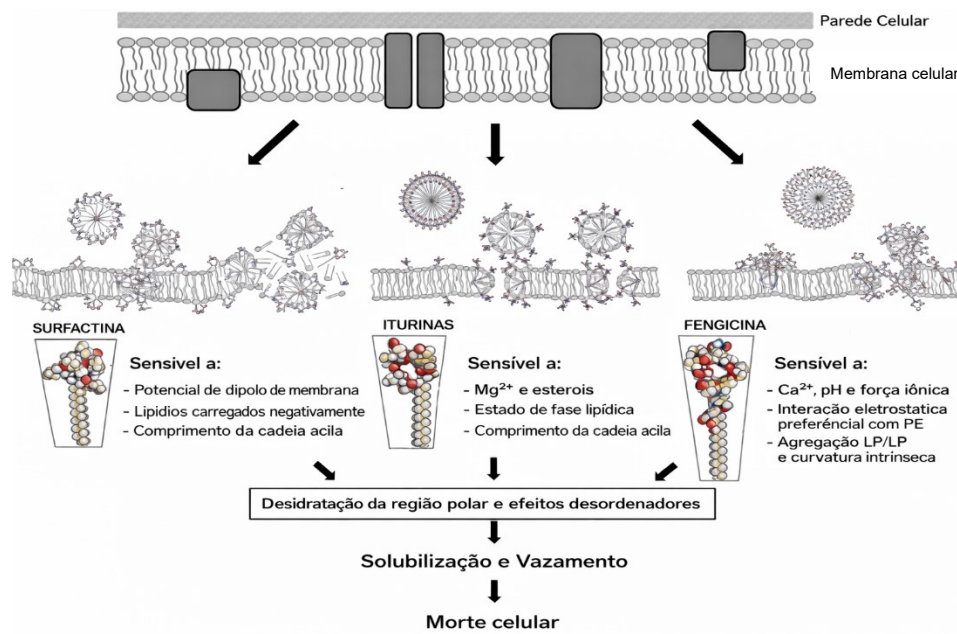
1.3 Metabólitos secundários produzidos por *Bacillus*

O uso do controle biológico tem se consolidado como uma alternativa promissora, especialmente por meio da utilização de bactérias do gênero *Bacillus*, amplamente reconhecidas por sua versatilidade metabólica, produção de compostos bioativos e elevada resistência a condições ambientais adversas. Nesse contexto, a produção de metabólitos secundários pode desempenhar um papel importante na atividade antagonista contra fungos fitopatogênicos, sendo os lipopeptídeos cíclicos (LPCs) um dos grupos mais relevantes (Balleza et al., 2019).

Sob essa perspectiva, destaca-se a perturbação da integridade da membrana plasmática, mediada por LPCs, das famílias surfactina, iturina e fengicina. Devido à sua natureza anfifílica, essas moléculas possuem afinidade com os fosfolípidos e ergosteróis da membrana fúngica (Figura 4). A inserção desses compostos na bicamada lipídica altera a sua permeabilidade, resultando na formação de poros e canais iônicos que provocam o extravasamento de íons e conteúdo citoplasmático, culminando na lise celular (Ongena; Jacques, 2008; Souza, 2024).

As surfactinas são reconhecidas pelo seu alto poder tensoativo que facilita a colonização de superfícies, podendo atuar tanto como fungicidas quanto bactericidas. As fengicinas apresentam ação mais específica contra fungos filamentosos, interferindo diretamente na elongação das hifas e na viabilidade dos esporos. Já as iturinas, também se destacam por apresentarem atividade antifúngica, porém são menos tóxicos com bactérias. Em conjuntos, esses compostos apresentam mecanismos complementares que ampliam o potencial bacteriano dos *Bacillus* (González-Jaramillo et al., 2017; Miljaković et al., 2020).

Figura 3 - Representação esquemática dos principais mecanismos de antagonismo de *Bacillus* spp. contra fitopatógenos fúngicos.



Fonte: Adaptado de Balleza et al. (2019).

Dessa forma, Gouveia (2024) demonstrou que *Bacillus* é capaz de produzir compostos antifúngicos do grupo dos lipopeptídeos eficazes contra *M. phaseolina* em ensaios *in vitro*, sugerindo a pertinência desses metabólitos para uso biotecnológico no controle de doenças fúngicas.

Complementarmente, o gênero *Bacillus* exerce pressão antagônica através da degradação da parede celular fúngica mediante a secreção de enzimas hidrolíticas. A síntese de quitinases e β -1,3-glucanases é determinante nesse processo, pois essas enzimas promovem a degradação da parede celular fúngica, componentes que garantem a rigidez estrutural do patógeno. Além do contato direto, o antagonismo estende-se à emissão de compostos orgânicos voláteis (VOCs), que se difundem com facilidade pelos poros do solo, permitindo a inibição do crescimento micelial à distância. Além disso, a produção de sideróforos, que quelam ferro disponível (Fe^{+3}) com afinidade superior à dos patógenos, reduz a disponibilidade para os fitopatogênicos, resultando em uma inibição metabólica por privação nutricional e reforçando a natureza multialvo do gênero *Bacillus* (Miljaković et al., 2020)

1.4 Metabólitos termoestáveis

Bactérias utilizadas como agentes de controle biológico (ACB) podem apresentar diferentes mecanismos semelhantes a antagonistas fúngicos, destacando a competição por nutriente e espaço, produção de enzimas hidrolíticas, metabólitos antifúngicos e interferência

direta no crescimento dos patógenos (Carmona-Hernandez et al., 2019; Zhimo et al., 2016). Entretanto, mesmo que ecologicamente apresente vantagens, existem fatores restritivos, como a sensibilidade a condições ambientais, como temperatura, e variabilidade em condições de campo, o que pode reduzir a estabilidade do controle ao longo do tempo (Carmona-Hernandez et al., 2019).

Segundo Matrose et al. (2021), uma dificuldade recorrente no desenvolvimento de fungicidas a partir de compostos de origem biológica está relacionada a sua estabilidade e capacidade de armazenamento. Os autores Zeidan et al. (2024) avaliaram metabólitos antifúngicos de diferentes cepas de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus subtilis* contra *Aspergillus niger* e observaram que, mesmo em temperaturas como a 100 °C por 20 minutos, os compostos apresentaram alta estabilidade e forte atividade antifúngica, evidenciando que o efeito inibitório não foi comprometido pelo aquecimento, destacando seu alto potencial no biocontrole.

Complementarmente, no mesmo estudo, foram analisados o efeito prolongado do armazenamento dos compostos, onde mesmo armazenados por 236 dias, os metabólitos de *B. amyloliquefaciens* não tiveram a atividade afetada, reforçando sobre sua alta estabilidade.

Os autores Pacífico, Bettiol e Eckstein (2018) demonstraram que *Bacillus* spp, isolados 2548 e 2545, produziram metabólitos com elevada eficiência na inibição de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, com valores significativos de inibição ao longo dos cinco dias de avaliação, sendo o quarto dia de incubação o período de maior atividade antifúngica. Este resultado contribuiu significativamente para o avanço do conhecimento científico e para o desenvolvimento de estratégias biotecnológicas aplicadas ao controle de fitopatógenos de solo.

Já os autores Pereira do Nascimento et al. (2025) avaliaram isolados de *Bacillus* quanto à produção de metabólitos termoestáveis e voláteis contra *M. phaseolina*, evidenciando que esses compostos podem inibir o crescimento do fungo em testes *in vitro*, sugerindo potencial uso em formulações comerciais mais robustas.

Assim, a avaliação da produção e da termoestabilidade de metabólitos de *Bacillus* spp. consolida-se como uma abordagem promissora no manejo sustentável de doenças agrícolas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o potencial antifúngico de metabólitos termoestáveis produzidos por *Bacillus* spp. no controle do fungo *M. phaseolina*.

2.2 Objetivo específico

- Isolar cepas de *Bacillus* spp. provenientes de amostras de solo nativo;
- Selecionar os isolados com potencial antagonista contra *M. phaseolina*;
- Produzir metabólitos em cultivo líquido e submetê-los a tratamento térmico para obtenção de compostos termoestáveis;
- Avaliar o efeito inibitório de duas concentrações dos metabólitos sobre o crescimento micelial do fitopatógeno e comparar o efeito inibitório entre isolados e concentrações ao longo do período de incubação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Mineiro de Análises Agrícolas e Microbiológicas (LAMAM), localizado em Patos de Minas – MG.

3.1 Obtenção do isolado de *M. phaseolina* e dos *Bacillus* spp.

O isolado de *M. phaseolina* foi cedido pelo laboratório LAMAM. O isolado foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), e foram incubadas em BOD a 25 °C, por um período de 7 dias.

O isolamento de *Bacillus* spp. foi realizado a partir de duas amostras de solo, coletadas em regiões de mata nativa de propriedade rural, localizada em Patos de Minas – MG. (18°51'52.9"S 46°37'58.3"W).

Para a obtenção dos isolados de *Bacillus* foram realizadas diluições seriadas a partir das amostras de solo coletadas e espalhamento em placas de Petri contendo meio de cultura Ágar Triptona de Soja (TSA). Para as diluições, em câmara de fluxo laminar, 1g de solo previamente seco em temperatura ambiente, foi adicionado em tubo de ensaio esterilizado contendo 9 mL de solução salina estéril (0,85%), o que correspondeu a diluição 10^{-1} . Logo em seguida esse

tubo foi homogeneizado em vórtex por 1 minuto e 1 mL adicionado a outro tubo de ensaio contendo 9mL de solução salina correspondendo a diluição 10^{-2} . Esse procedimento foi repetido até a diluição 10^{-5} .

Essas diluições passaram pelo processo de choque térmico, sendo 12 minutos no banho-maria a 80 graus e 5 minutos em água gelada. Feito isso, 100 μ L das diluições foram espalhados com auxílio de alça de Drigalsk na superfície do meio TSA, com o objetivo de cultivar apenas colônias provenientes de esporos resistentes ao choque térmico.

As placas foram incubadas por 48 h à 30 °C e após esse tempo, os diferentes isolados bacterianos foram selecionados através da observação de características morfológicas distintas e repicagem em meio de cultura TSA. Dessa forma, foram selecionadas 12 cepas diferentes para os ensaios subsequentes.

Em seguida, conduziu-se um pré-teste de antagonismo por cultivo pareado contra o fitopatógeno, a partir do qual foram escolhidas 5 cepas (B06, B16, B86, B105 e B12) que apresentaram melhor desempenho na inibição micelial.

O isolado fúngico foi conservado pelo método Catellani (1939), enquanto os isolados bacterianos foram conservados em tirinhas de papel esterilizadas embebidas no caldo de fermentação contendo esporos, posteriormente secas em câmara de fluxo laminar por aproximadamente seis horas. Ambos os microrganismos foram mantidos sob refrigeração em geladeira à 4 °C.

3.2 Cultivo em fermentação líquida dos *Bacillus* e produção de metabólitos termoestáveis

As colônias bacterianas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 150 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de cloreto de sódio, 15 g de glicose e ajustar o volume para 1000 mL de água), previamente esterilizados. As culturas foram incubadas em agitador orbital por 48 horas, a 30 °C, com agitação de 160 rpm, com o objetivo de promover o crescimento bacteriano.

Após o período de incubação, amostras de caldo fermentado foram retiradas e submetidos à autoclavagem a 127 °C por 15 minutos (Figura 5), para avaliação do efeito de metabólitos termoestáveis contra o crescimento micelial de *M. phaseolina*.

Figura 4 - Extrato bruto após autoclavagem, obtido a partir do cultivo do isolado B06.

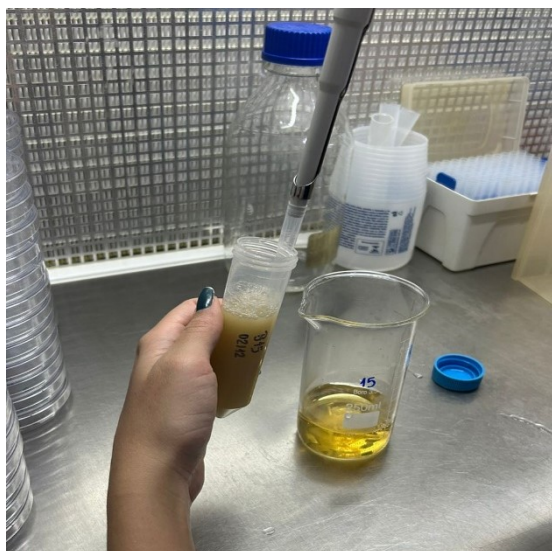


Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Avaliação da ação dos metabolitos termoestáveis contra *M. phaseolina*

Duas concentrações (1,0% e 2,0% v/v) dos extratos brutos autoclavados de cada isolado foram incorporadas sob homogeneização, em 20 mL de meio BDA, ainda líquido, previamente autoclavado (Figura 6). Cada tratamento foi realizado em triplicata, totalizando 11 tratamentos (Tabela 1), considerando a testemunha.

Figura 5 - Incorporação do metabólito em meio BDA, ainda líquido, de acordo com cada tratamento.



Fonte: Elaborada pela autora

Após a solidificação do meio, foram transferidos discos de 5 mm de diâmetro de meio BDA contendo *M. phaseolina* para o centro de cada placa de Petri contendo os diferentes

isolados. A testemunha era composta apenas pelo fitopatógeno no meio de cultura BDA, sem a presença de metabólitos, que foi substituída por água destilada estéril nas dosagens utilizadas.

As placas foram incubadas em BOD a 25 °C e a cada 24 h foram realizadas as avaliações que consistiram na medição do diâmetro da colônia do patógeno, com auxílio de uma régua durante o período de 7 dias.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos experimentais, constituídos por isolados bacterianos e suas respectivas doses, e o tratamento controle.

Tratamento	Isolado	Dose
T1	B06	1%
T2	B06	2%
T3	B16	1%
T4	B16	2%
T5	B86	1%
T6	B86	2%
T7	B105	1%
T8	B105	2%
T9	B120	1%
T10	B120	2%
T11	Controle	—

3.4 Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 4 x 2 + 4 adicionais (cinco isolados x quatro tempos de avaliação x duas doses + quatro tratamentos controle adicionais). Os dados foram submetidos à análise dos pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variância pelo teste de Jarque-Bera e Bartlett, respectivamente. Os dados não atenderam às premissas, portanto foram transformados pelo método de Box-Cox. Para os fatores qualitativos, as médias foram comparadas através do teste Tukey a 1% de probabilidade de erro, e para o fator quantitativo, foi ajustado modelos de regressão. As comparações com os tratamentos controle (adicionais) foram realizadas por meio do teste de Dunnett a 1% de probabilidade de erro. Todas as análises foram realizadas no software estatístico RStudio (Ferreira et al., 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da ação dos metabólitos termoeestáveis contra *M. phaseolina*

Os resultados do ensaio *in vitro* para os extratos brutos obtidos após o cultivo de *Bacillus* spp., contra a *M. phaseolina* demonstraram que os metabólitos termoeestáveis, influenciaram no crescimento micelial do patógeno (Tabela 2). O diâmetro das colônias foi avaliado no segundo, quarto, sexto e oitavo dia de cultivo, permitindo observar diferenças nas concentrações dos extratos brutos utilizados e no perfil de inibição produzido pelos isolados.

Tabela 2. Diâmetro de colônia (cm) do fungo *M. phaseolina* em meio de cultura BDA, acrescido de metabólitos termoeestáveis de diferentes isolados de *Bacillus* spp. em duas doses, ao longo do tempo.

Isolado	Dose	Tempo (dias)				Média
		2	4	6	8	
B06	1%	1,4 Aa ¹	2,4 Ba	4,8 Ba	6,9 Ba	3,9
B16		3,7 Bb	6,5 Bb	8,4 Bb²	8,5 Bb	6,8
B86		3,9 Bb	6,6 Bb	8,5 Bb	8,5 Bb	6,9
B105		4,5 Bc	8,5 Bc	8,5 Bb	8,5 Ab	7,5
B120		4,4 Bc	8,5 Bc	8,5 Bb	8,5 Bb	7,5
B06	2%	1,2 Aa	1,9 Aa	3,9 Ac	5,5 Ac	3,1
B16		1,2 Aa	2,4 Ab	2,8 Aa	3,3 Aa	2,4
B86		1,9 Ab	2,5 Ab	2,9 Aa	3,3 Aa	2,7
B105		3,6 Ad	5,0 Ad	7,8 Ad	8,5 Ad	6,2
B120		2,5 Ac	3,4 Ac	3,7 Ab	4,4 Ab	3,5
Controle		5,7	8,5	8,5	8,5	
C.V. (%)		5,5				

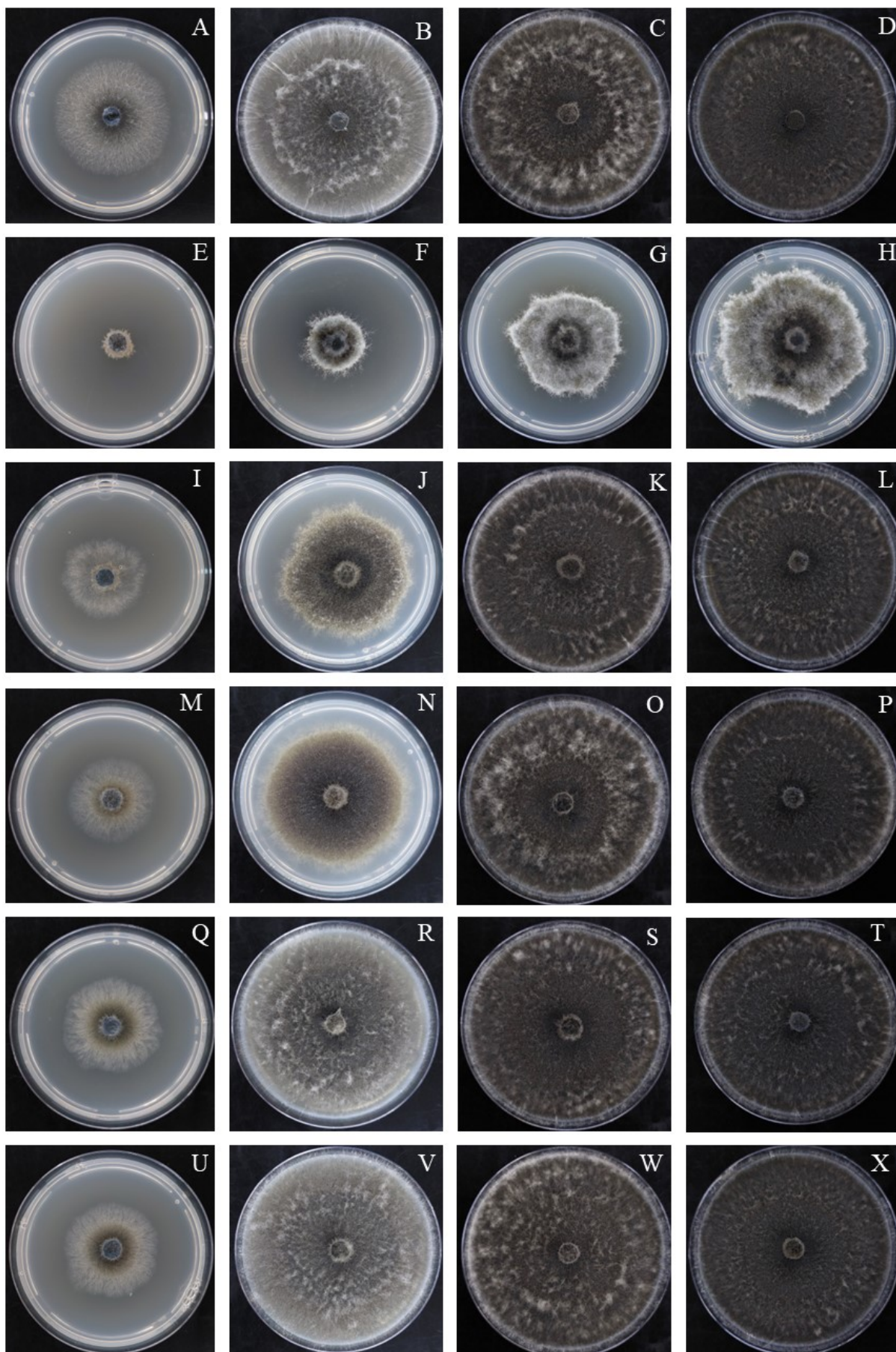
¹ Médias seguidas por letras minúsculas representam a comparação entre isolados, dentro de cada dose. Médias seguidas por letras maiúsculas representam a comparação entre doses, dentro de cada isolado. Médias seguidas por letras iguais, não diferem entre si, através do teste de Tukey a 1% de probabilidade. ² Médias destacadas em negrito, não diferem do controle, através do teste de Dunnett a 1% de probabilidade.

No segundo dia de avaliação, já foi possível observar a diferença no crescimento micelial, entre os tratamentos nas concentrações de 1% e 2%. Em comparação à testemunha, evidenciou-se o comportamento agressivo e desenvolvimento acelerado da *M. phaseolina*, conforme descrito por Marquez et al (2021), reforçando seu rápido crescimento *in vitro*. Essa avaliação inicial revelou uma redução expressiva no crescimento da *M. phaseolina* nos tratamentos com isolados de *Bacillus* spp. em relação ao tratamento controle logo nas primeiras 48 horas, momento crucial na infecção do fitopatógeno.

De modo geral, na concentração de 1% e nas primeiras avaliações (2 e 4 dias) da concentração de 2%, o isolado B06 mostrou-se mais eficiente para o controle micelial do patógeno em relação aos demais tratamentos, evidenciando o efeito antagonista com a menor concentração avaliada e nos primeiros dias de contato com o patógeno.

Na tabela 2, pode-se observar efeito significativo entre os isolados dentro de cada concentração e entre concentrações para o mesmo isolado. Na concentração de 1% (Figura 7), o isolado B06 foi o único a apresentar resultado diferente do tratamento controle em todos os dias de avaliação, sendo que os demais tratamentos nos tempos de avaliação 6 e 8 dias não foram estatisticamente diferentes do controle. Dessa forma, para a menor concentração do extrato bruto, o tratamento B06 promoveu 54,1 % de inibição no crescimento micelial de *M. phaseolina*.

Figura 6 - Prancha representando da dosagem de 1%. (A-D) Testemunha; (E-H) Isolado B06; (I-L) isolado B16; (M-P) isolado B86; (Q-T) Isolado B105; (U-X) Isolado B120. Em todos os tratamentos, as avaliações correspondem a 2, 4, 6 e 8 dias de avaliação, respectivamente.



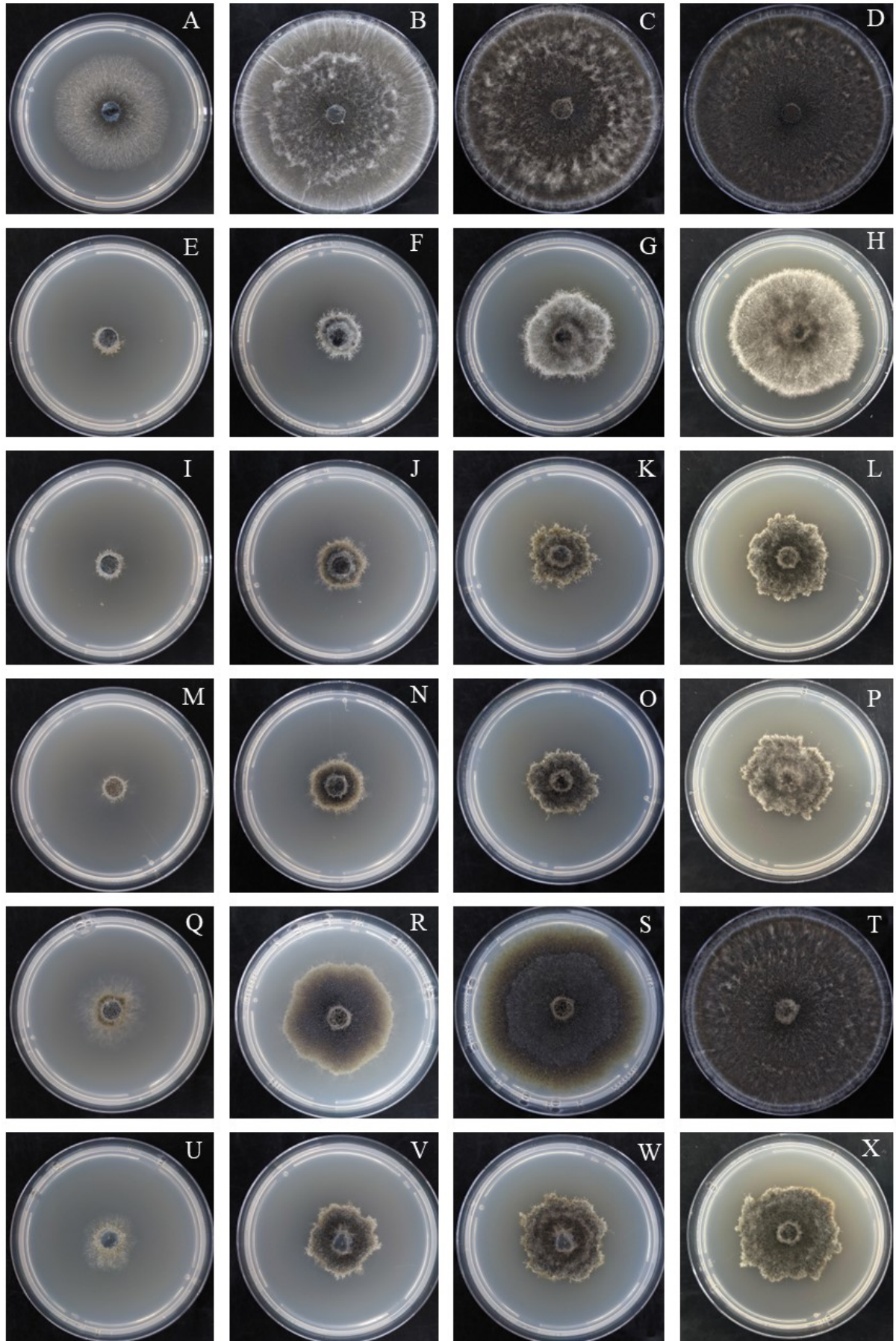
Fonte: Elaborada pela autora.

Em avaliação posterior, no quarto dia, o controle atingiu o crescimento máximo (Tabela 2). Na concentração de 1%, B105 e B120 perderam a eficiência se igualando a testemunha.

Subsequentemente, no sexto dia, apenas o isolado B06 manteve atividade antifúngica na menor concentração. Na concentração de 2% (Figura 8), todos mantiveram atividade inibitória, com destaque para B16 e B86, que apresentaram 71,8% e 68,2% de inibição do crescimento micelial, respectivamente (Tabela 2). Esses isolados foram mais persistentes que B06 (63,5), B105 (27,1%) e B120 (58,8%).

No oitavo dia, para a concentração de metabólitos termoestáveis de 2%, com exceção do tratamento B105 que não diferiu do tratamento controle, todos os isolados foram eficientes no controle micelial do patógeno em todos os tempos de avaliação (2, 4, 6 e 8 dias) diferindo-se do tratamento controle (Tabela 2; Figura 8).

Figura 7 - Prancha representando da dosagem de 2%. (A-D) Testemunha; (E-H) Isolado B06; (I-L) isolado B16; (M-P) isolado B86; (Q-T) Isolado B105; (U-X) Isolado B120. Em todos os tratamentos, as avaliações correspondem a 2, 4, 6 e 8 dias de avaliação, respetivamente.



Fonte: Elaborada pela autora.

Este trabalho retrata a produção de metabólitos secundários, por *Bacillus* spp, com ênfase para os metabólitos termoe estáveis, buscando avaliar a aplicação destes como alternativa para o controle do fitopatógeno *M. phaseolina*, isolada de amostras de solo de propriedade rural situada no município de Patos de Minas. Conforme mencionado anteriormente, as diferentes espécies vegetais hospedeiras, somada a persistência de *M. phaseolina* nos solos, representam um desafio ao controle da doença, uma vez que sua presença nas lavouras resulta em perdas substanciais de rendimento, principalmente para as safras de soja, sorgo e amendoim (Marquez et al, 2021).

Para superar este desafio, produtores e pesquisadores buscam aliar o baixo custo e abordagens sustentáveis, como o controle biológico, com estratégia para minimizar os prejuízos econômicos e ambientais.

Os metabólitos secundários produzidos por *Bacillus* spp. têm sido associados ao controle de fitopatógenos, principalmente pela capacidade desses compostos de atuar sobre estruturas celulares, como membranas e paredes celulares. Entre as diferentes classes de metabólitos, se destacam os lipopeptídeos, como as iturinas, fengicinas e surfactinas, reconhecidas por sua atividade antifúngica (Ongena; Jacques 2008).

No presente estudo, os metabólitos produzidos pelas cepas B06, B16, B86, B105 e B120 foram submetidos à autoclavagem a 127 °C por 15 min e mantiveram sua atividade antifúngica, evidenciando termoe estabilidade marcante e corroborando com achados de outros estudos.

Zeidan et al. (2024) analisaram sobrenadantes bacterianos livres de células de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis*, que foram submetidos à autoclavagem a 100 °C por 20 minutos, apresentando termoe estabilidade e expressiva atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*. De maneira análoga, Higashi (2020) avaliou metabólitos de *Bacillus velezensis* em diferentes temperaturas, 70 °C a 121 °C, contra diferentes fitopatógenos, incluindo *M. phaseolina*. Além de apresentarem termoe estabilidade nas diferentes temperaturas, esses compostos também foram estáveis nas faixas de luz de 254 nm, 365 nm e luz branca e pH entre 3 e 11. O autor destacou o importante antagonismo frente aos fungos *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina*, *R. solani*, *B. cinerea*, *F. solani* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Adicionalmente, Lima et al. (2014) investigaram a atividade antifúngica de metabólitos de 10 isolados de *Bacillus* spp., os quais foram submetidos à autoclavagem a 120 °C por 20 minutos. Os autores constataram que cinco cepas diferiram estatisticamente da testemunha,

apresentando inibição micelial de 2,89 a 3,81 cm contra *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, evidenciando a atividade antifúngica mesmo após altas temperaturas.

De forma geral, considerando o conjunto das avaliações realizadas, a cepa B06 apresentou desempenho superior em relação aos outros isolados, pois manteve inibição nas duas concentrações, demonstrando maior estabilidade, e produção de compostos em relação aos demais isolados, indicando maior potencial antagonista. De forma semelhante, os isolados B16 e B86, demonstraram o maior percentual de redução no crescimento micelial do patógeno na maior concentração (2%), podendo ser uma opção em dosagens mais altas. Esse padrão, já descrito em estudos anteriores (Miljaković et al. 2020), reforça que cepas pertencentes ao mesmo gênero podem apresentar perfis metabólicos distintos, quanto à quantidade produzida, impactando na intensidade do efeito antifúngico.

Nesse contexto, é importante ressaltar que o processo fermentativo exerce um papel fundamental na produção dos lipopeptídeos e suas propriedades estruturais e funcionais (Larini et al. 2017). Fatores como tipo de fontes de carbono, nitrogênio, pH, temperatura, agitação e disponibilidade de oxigênio podem modular a atividade metabólica das cepas, influenciando na quantidade e eficiência dos compostos produzidos (Sidorova et al., 2020; Souza, 2019; Félix, 2023).

A manutenção da atividade antifúngica mesmo após a autoclavagem em altas temperaturas evidencia a elevada termoestabilidade dos metabólitos produzidos pelos isolados avaliados, característica de grande relevância para aplicações práticas. A estabilidade térmica observada neste estudo demonstra que os compostos permanecem ativos mesmo após condições severas, se tornando uma grande vantagem. De forma complementar, Zeidan et al. (2024) relatou que compostos termoestáveis apresentam maior resistência a condições de armazenamento.

Assim, os resultados obtidos reforçam que os metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. mantêm atividade antifúngica mesmo após exposição a altas temperaturas, evidenciando estabilidade, podendo ser considerado um diferencial relevante no desenvolvimento de novas formulações, contribuindo com estratégias mais sustentáveis.

Complementarmente, a superioridade geral do isolado B06, aliada ao desempenho de B16 e B86, indica que esses metabólitos apresentam perfil promissor para estudos futuros. A partir desses resultados, novos estudos se tornam relevantes, bem como a identificação e caracterização desses compostos, a realização de ensaios *in vivo* contra a *M. phaseolina* e a avaliação da ação sobre os microescleródios. Essas abordagens permitirão consolidar a aplicabilidade desses metabólitos no manejo de doenças.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os isolados de *Bacillus* spp., especialmente os isolados B06, B16 e B86 mostraram eficiente propriedade antagonista, in vitro, contra o fitopatógeno *M. phaseolina*. O efeito inibitório observado nos extratos brutos dos isolados, mesmo após serem submetidos à temperatura de 127 °C, indica a produção de metabólitos termoestáveis, os quais foram capazes de desempenharem relevante atividade antifúngica.

Esses achados reforçam que os metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. representam uma estratégia promissora e sustentável para futuras aplicações para o controle biológico.

Como perspectivas futuras, recomenda-se a caracterização química dos metabólitos produzidos, visando identificar compostos antifúngicos, possivelmente lipopeptídeos como surfactina, iturina e fengicina, além da caracterização das cepas de *Bacillus*. Também são necessários ensaios em casa de vegetação e em campo, a fim de validar a eficiência e o comportamento desses metabólitos no controle de *M. phaseolina* e de seus microescleródios.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; FARIAS, J. R. B. et al. ***Macrophomina phaseolina* em soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 55 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/989352>. Acesso em: 16 fev. 2026.
- BAGGIO, J. S., CORDOVA, L. G., PERES, N.A. Sources of Inoculum and Survival of *Macrophomina phaseolina* in Florida Strawberry Fields. **Plant Dis.** 2019 Sep;103(9):2417-2424. doi: 10.1094/PDIS-03-19-0510-RE. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31322978.
- BALLEZA, D.; ALESSANDRINI, A.; BELTRÁN GARCÍA, M. J. Role of Lipid Composition, Physicochemical Interactions, and Membrane Mechanics in the Molecular Actions of Microbial Cyclic Lipopeptides. **J Membrane Biol** 252, 131–157, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00067-4>. Acesso em: 26 fev. 2026.
- BEDENDO, I. P. Podridões de raiz e colo. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de Fitopatologia**. 5ª ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres, p. 573. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Mapa registra algumas inovações tecnológicas para o controle de pragas na agricultura**. Brasília, DF: MAPA, 11 out. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/2023/mapa-registra-algumas-inovacoes-tecnologicas-para-o-controle-de-pragas-na-agricultura>. Acesso em: 16 fev. 2026.
- BURGES, H.D.; JONES, K.A. (1998). Introduction. In: Burges, H.D. (ed). Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht ISBN 0 412 62520 2. P. 1-4.
- CARMONA-HERNANDEZ, S.; REYES-PÉREZ, J. J.; CHIQUITO-CONTRERAS, R. G. *et al.* Biocontrol of Postharvest Fruit Fungal Diseases by Bacterial Antagonists: A Review. **Agronomy**, V. 9, p. 121, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>. Acesso em: 24 fev. 2026.
- CHO, W., CHUNG, M-S. “*Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies.” **Food science and biotechnology**, vol. 29,11 1447-1461. 6 Oct. 2020. Disponível em: doi:10.1007/s10068-020-00809-4. Acesso em: 16 fev. 2026.
- DRIKS, A. “Overview: Development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*.” Cellular and molecular life sciences: **CMLS** vol. 59,3 (2002): 389-91. Disponível em: doi:10.1007/s00018-002-8430-x. Acesso em: 16 fev. 2026.

DUBEY, R. C.; KUMAR, H.; PANDEY, R. R. Fungitoxic effect of Neem extracts on growth and sclerotial survival of *Macrophomina phaseolina* in vitro. **Journal of American Science**, v. 5, n. 5, p. 17-24, 2009.

FÉLIX, J. S. **Otimização da produção de lipopeptídeos por *Bacillus velezensis* visando ao controle de fungos fitopatogênicos**. 2023. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.103>. Acesso em: 16 fev. 2026.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes: Experimental Designs Package. R package version 1.2.2**. 2025. Disponível: <https://cran.r-project.org/web/packages/ExpDes/ExpDes.pdf>.

GONZÁLEZ-JARAMILLO, L. M.; ARANDA, F. J.; TERUEL, J. A.; VILLEGAS-ESCOBAR, V.; ORTIZ, A. Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Volume 156, 2017, Pages 114-122, ISSN 0927-7765. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.021>. Acesso em: 17 fev. 2026.

GOUVEIA, A. F. **Caracterização de metabólitos antifúngicos produzidos por *Bacillus velezensis* e seu potencial no controle de fitopatógenos**. 2024. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/items/f8470e27-b121-4675-b512-bcf647b9c53d>. Acesso em: 27 jan. 2026.

HIGASHI, A. Y. **Antagonismo da cepa LABIM22 de *Bacillus velezensis* frente a fungos fitopatogênicos e biocontrole do mofo branco em sementes de soja**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/items/33ae96bd-5998-4347-ae04-a32f03f96302>. Acesso em: 24 fev. 2026.

LARINI, M. M. et al. Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos em sua produção. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, v. 17, n. 2, p. 105-118, 2017.

LIMA, O. D. R.; OLIVEIRA, L. J. M.; SILVA, M. S. B. S.; RODRIGUES, A. A. C. Ação antifúngica in vitro de isolados de *Bacillus* ssp. sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*¹. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 57-64, 2014. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/2371/237132753008.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2026.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; and DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. **Front. Plant. Sci.** Vol. 12. 21 abril. 2021.

MARRONI, I. V.; GERMANI, J. C. Eficiência de rizobactérias *Bacillus* spp. no controle in vitro de *Macrophomina phaseolina* agente etiológico da podridão de tronco da mamona (*Ricinus communis* L). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 3, p. 159–167, 2011. Disponível em: <https://periodicos.unb.br/index.php/rbagroecologia/article/view/49263>. Acesso em: 27 jan. 2026.

MATROSE, N. A.; OBIKEZE, K.; BELAY, Z. A. *et al.* Plant extracts and other natural compounds as alternatives for post-harvest management of fruit fungal pathogens: A review. **Food Bioscience**, Volume 41, 2021, 100840, ISSN 2212-4292. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100840>. Acesso em: 24 fev. 2026.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/13447>. Acesso em: 28 jan. 2026.

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The importance of *Bacillus* species in the suppression of diseases and plant growth promotion in agricultural and horticultural crops. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 1037, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>. Acesso em: 01 fev. 2026.

MYCOBANK. *Macrophomina phaseolina*. Disponível online: <https://www.mycobank.org/page/Name%20details%20page/name/macrophomina%20phaseolina>. Acessado em 16 de fev. 2026.

NASCIMENTO, P. M. L. et al. Incidence of root rot of muskmelon in different soil management practices. **European Journal of Plant Pathology**, Holanda, v. 152, n. 2, p. 433–446, 2018.

ONGENA, M., JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, Volume 16, Issue 3, 115 – 125, 2008. Disponível em: DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009. Acesso em: 17 fev. 2026.

ONU BRASIL. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 16 fev. 2026.

PACÍFICO, M. G.; BETTIOL, W.; ECKSTEIN, B. Avaliação da produção e termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in vitro. In: **SIMPÓSIO DE MANEJO DE DOENÇAS DE PLANTAS**, 18., 2018, Lavras.

Anais... Lavras: NEFIT-UFLA, 2018. p. 189. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1103210>. Acesso em: 27 jan. 2026.

PEREIRA DO NASCIMENTO, P. V.; RODRIGUES, M. L.; SILVA, R. S.; et al. Detection of enzymatic compounds and antagonism of *Bacillus* species on the development of *Macrophomina phaseolina*. **Bioagro**, v. 37, n. 1, p. 53–66, 2025. Disponível em: <https://revistas.uclave.org/index.php/bioagro/article/view/5159>. Acesso em: 27 jan. 2026.

QUEIROZ, M.R. Bactérias *Bacillus*: principais espécies e usos na agricultura, saúde e indústria. **Blog Agroadvance**. 2025. Disponível em: <https://agroadvance.com.br/blog-bacterias-bacillus/>. Acesso em: 13 fev. 2026.

SARTORI, D. F. **Bactérias solubilizadoras de fósforo, adubação química, aplicação de fungicidas e cultivares no manejo de doenças da soja**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, 2023. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/33771>. Acesso em: 26 fev. 2026.

SETLOW, P. “Spore Resistance Properties.” **Microbiology spectrum** vol. 2,5 (2014): 10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012. Disponível em: doi:10.1128/microbiolspec.TBS-0003-2012. Acesso em: 16 fev. 2026.

SIDOROVA, T. M. et al. Optimization of laboratory cultivation conditions for the synthesis of antifungal metabolites by *Bacillus subtilis* strains. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 7, p. 1879–1885, 2020.

SOUZA, C. Produção e processo de downstream de lipopeptídeos fungicidas produzidos pelo *Bacillus subtilis* CNPMS 22. **Universidade Federal do Ceará**, p. 105, 2019.

SOUZA, J. W. C. **Potencial de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. no controle de *Macrophomina phaseolina* na cultura da soja**. 2024. Dissertação (Especialização em Fitossanidade) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2024. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/handle/1884/97327>. Acesso em: 27 jan. 2026.

RANGEL-MONTOYA, E. A. et al. Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* using *Bacillus amyloliquefaciens* strains in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **Agronomy**, v. 12, n. 3, p. 676, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/12/3/676>. Acesso em: 27 jan. 2026.

RODRIGUES, F. G. et al. Bioensaio para avaliação de *Bacillus* spp. no controle biológico de microescleródios de *Macrophomina phaseolina*. In: **SEMINÁRIO JOVENS TALENTOS**, 16., 2022, Santo Antônio de Goiás. *Anais...* Brasília, DF: Embrapa Arroz e Feijão, 2022.

Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1151343>. Acesso em: 27 jan. 2026.

ROMERO LUNA, M. P.; MUELLER, D.; MENGISTU, A. et al. Advancing Our Understanding of Charcoal Rot in Soybeans, **Journal of Integrated Pest Management**, Volume 8, Issue 1, January 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jipm/pmw020>. Acesso em: 23 fev. 2026.

ZEIDAN, R.; HASSAN, Z. U.; ASHFAQ, M. Y. et al. Investigation of heat-resistant antifungal agents from *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* for biocontrol of mycotoxigenic fungi. **Environmental Technology & Innovation**, Volume 36, 2024, 103748, ISSN 2352-1864. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2024.103748>. Acesso em: 24 fev. 2026.

ZHIMO, V. Y.; BHUTIA, D. D.; SAHA, J. Biological control of post harvest fruit diseases using antagonistic yeasts in Índia. **Journal of Plant Pathology**, Vol. 98, No. 2, pp. 275-283, July 2016. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20173230966>. Acesso em: 24 fev. 2026.