

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

***Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum E MICROALGA Parachlorella sp. ATUAM***  
***NO BIOCONTROLE in vitro DA Macrophomina phaseolina?***

RENATO RIBEIRO CONCOLATO

DOURADOS - MS  
2025

***Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum E MICROALGA Parachlorella sp. ATUAM  
NO BIOCONTROLE in vitro DA Macrophomina phaseolina?***

**RENATO RIBEIRO CONCOLATO**

Orientador: Prof. Dr. CLEBERTON CORREIA SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal da Grande Dourados,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Engenheiro Agrônomo.

**DOURADOS MS  
2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

C744b Concolato, Renato Ribeiro

Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum E MICROALGA Parachlorella sp. ATUAM NO BIOCONTROLE in vitro DA Macrohomina phaseolina? [recurso eletrônico] / Renato Ribeiro Concolato. -- 2025.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Cleberton Correia Santos.

TCC (Graduação em Agronomia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2025.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. antagonismo. 2. bioinsumos. 3. compostos difusíveis. 4. confrontação direta. 5. podridão de carvão. I. Santos, Cleberton Correia. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

***Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum E MICROALGA Parachlorella sp.  
ATUAM NO BIOCONTROLE *in vitro* DA Macrophomina phaseolina?***

Por

**RENATO RIBEIRO CONCOLATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para obtenção do  
título de ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Aprovado em: 18/11/2025

---

Prof. Dr. Cleberton Correia Santos  
Orientador – UFGD/FCA

---

Dra. Juliana Milene Silverio  
Membro da banca – UFGD/FCA

---

Me. Anderson dos Santos Dias  
Membro da banca – UFGD/FCA

## AGRADECIMENTOS

À Deus agradeço por ter me concedido o dom da vida, por me dar forças e capacidade de enfrentar todos os desafios passados até aqui, por me proporcionar discernimento para buscar evoluir e me tornar uma pessoa melhor todos os dias.

Agradeço de todo coração a minha família, meu pai José Silvio (*in memoriam*), minha mãe Iraci Ribeiro, por tudo que já fizeram e fazem por mim, por não medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui, me dando apoio tanto emocional quanto financeiro, sem vocês, nada em minha vida seria possível.

Gostaria também, de agradecer a todos os membros da minha família, sem exceção, cada um tem contribuição na minha formação e principalmente em minha caminhada de vida.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Cleberton Correia Santos, que desde o início se prontificou a ser um excelente orientador, com paciência, disponibilidade, atencioso e muito empenhado em me auxiliar no que fosse preciso, da melhor forma possível.

A minha professora Lilian Maria Arruda Bacchi e ao seu orientado de mestrado, Anderson dos Santos Dias, que também se fizeram presentes durante as atividades desenvolvidas no laboratório de fitopatologia.

A minha amiga conquistada dentro dos bancos da universidade, Luana Alves Filgueira, que inicialmente era minha dupla, agradeço pela amizade, companheirismo, e por sempre estar empenhada neste projeto.

A todos os amigos que fiz durante a graduação e que estão comigo até hoje, e a todos que se dispuseram em me auxiliar nas avaliações, Samara Lima, Anderson dos Santos Dias, João Paulo, Rian Jansen, Luiz Guilherme, Obadias Alves, Luiz Martins, Dalton Dantas, Sinval Vicenzi, Miguel Ortolan, a todos os membros do grupo GEEP pelo auxílio e orientação no desenvolvimento das atividades na universidade.

A todos os professores que me auxiliaram e que me transmitiram conhecimento desde o período de escola até o fim da graduação.

CONCOLATO, Renato Ribeiro. *Bacillus subtilis, Trichoderma harzianum e microalga Parachlorella sp. atuam no biocontrole in vitro da Macrophomina phaseolina?* 2025. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Agronômica) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2025.

## RESUMO

O manejo de patógenos de solo representa um desafio crescente na agricultura moderna, especialmente diante da persistência de espécies como *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão de carvão, capaz de sobreviver por longos períodos no solo por meio da formação de microescleródios. Nesse contexto, o uso de agentes biológicos tem se destacado como alternativa sustentável para reduzir a dependência de fungicidas químicos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antagonista de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*, isolados ou em associação, além da interação desses microrganismos com a microalga *Parachlorella* sp., no controle *in vitro* de *M. phaseolina*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois ensaios: (i) confrontação direta, para avaliar o efeito por contato físico, e (ii) ensaio de compostos voláteis, para analisar a ação de metabólitos à distância. Foram determinadas a taxa de crescimento micelial do patógeno, o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM). Na confrontação direta, *T. harzianum* reduziu o crescimento micelial de *M. phaseolina* em 61,3 %, enquanto *B. subtilis* promoveu redução de 44,7 %. A associação entre ambos apresentou a maior inibição, com 71,5 % de redução em relação à testemunha. Nos ensaios com compostos voláteis, isoladamente *B. subtilis* apresentou maior eficiência, reduzindo a AACCM em 58,9 %, *T. harzianum* (46,2 %) e a associação dos dois agentes (65,4 %). A presença de *Parachlorella* sp. não apresentou efeito antagônico direto e reduziu parcialmente a eficiência dos microrganismos no confronto físico ( $\approx$ 10 % de perda de inibição), embora não tenha interferido nos ensaios com voláteis. Os resultados demonstram que *B. subtilis* e *T. harzianum* são eficazes no biocontrole de *M. phaseolina*, apresentando mecanismos complementares: micoparasitismo e competição para *T. harzianum*, e produção de compostos voláteis para *B. subtilis*. A associação entre ambos potencializou os efeitos de controle, indicando sinergismo. A microalga apresentou comportamento neutro ou levemente competitivo, sugerindo necessidade de avaliações adicionais em condições de campo. Conclui-se que o uso de microrganismos antagonistas representa uma alternativa viável e sustentável para o controle de *M. phaseolina* *in vivo*.

**Palavras-chave:** antagonismo, bioinsumos, compostos difusíveis, confrontação direta, podridão de carvão.

## ABSTRACT

Managing soil-borne pathogens represents a growing challenge in modern agriculture, especially given the persistence of species such as *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot, which can survive for long periods in the soil through the formation of microsclerotia. In this context, the use of biological agents has been highlighted as a sustainable alternative to reduce dependence on chemical fungicides. This study aimed to evaluate the antagonistic potential of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*, alone or in combination, as well as the interaction of these microorganisms with the microalgae *Parachlorella* sp., in the in vitro control of *M. phaseolina*. The experiment was conducted in a randomized design, with two assays: (i) direct confrontation, to evaluate the effect of physical contact, and (ii) a volatile compound assay, to analyze the action of metabolites at a distance. The pathogen's mycelial growth rates, mycelial growth rate index (MGII), and area under the mycelial growth curve (AUCCM) were determined. In direct confrontation, *T. harzianum* reduced the mycelial growth of *M. phaseolina* by 61.3%, while *B. subtilis* promoted a 44.7% reduction. The combination between the two showed greater interference, with a 71.5% reduction compared to the control. In tests with volatile compounds, *B. subtilis* showed greater efficiency, improving AUCCM by 58.9%, followed by *T. harzianum* (46.2%) and the combination of both agents (65.4%). The presence of *Parachlorella* sp. did not present a direct antagonistic effect and partially impaired the efficiency of the microorganisms in physical confrontation ( $\approx 10\%$  loss of deficiency), although it did not impair the tests with volatiles. The results demonstrate that *B. subtilis* and *T. harzianum* are effective in biocontrolling *M. phaseolina*, exhibiting complementary mechanisms: mycoparasitism and competition for *T. harzianum*, and production of volatile compounds for *B. subtilis*. The combination of both enhanced the control effects, reducing synergism. The microalgae displayed neutral or slightly competitive behavior, requiring further evaluation under field conditions. It is concluded that the use of antagonistic microorganisms represents a viable and sustainable alternative for control of *M. phaseolina* *in vivo*.

**Keywords:** antagonism, bioinputs, diffusible compounds, direct confrontation, charcoal rot.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. <i>Macrophomina phaseolina</i> : características, distribuição e impacto na soja .....	4
2. 2. Bioinsumos e estratégias de biocontrole em sistemas agrícolas.....	5
2. 3. Microalgas: diversidade, funções e aplicações na agricultura.....	6
2. 4. <i>Bacillus subtilis</i> : potencial como agente de biocontrole e promotor do crescimento vegetal.....	7
2. 5. <i>Trichoderma harzianum</i> : mecanismos de ação e uso em manejo sustentável de doenças.	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3. 1. Local de condução experimental .....	9
3. 2. Obtenção, multiplicação e manutenção do isolado fúngico .....	9
3. 3. Fatores em estudo para o biocontrole de <i>M. phaseolina</i> .....	9
3. 4. Ensaio 1: Confrontação direta de bioinsumos com <i>M. phaseolina</i> .....	9
3. 5. Ensaio 2: Compostos difusíveis no biocontrole de <i>M. phaseolina</i> .....	11
3. 6. Análise de dados .....	13
4 RESULTADOS .....	14
4. 1. Confrontação direta de bioinsumos em <i>M. phaseolina</i> .....	14
4. 2. Compostos difusíveis de bioinsumos no controle de <i>M. phaseolina</i> .....	16
5 DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

Diante do cenário de mudanças climáticas, o Brasil é listado como um dos países vulneráveis de variações acentuadas, incluindo aumentos de temperatura em regiões propensas a secas (SHARMA et al., 2018; KOTZ et al., 2021; SANTOS et al., 2023). Em associação, tais condições climáticas são fatores ambientais que predispõem as plantas a infecção pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid (SUCUR et al., 2023), o qual tem prejudicado drasticamente as lavouras em diversas regiões no Mundo (SALES-JÚNIOR et al., 2020; COHEN et al., 2022; DELL'OLMO et al., 2022).

*M. phaseolina* é um fungo fitopatogênico necrotrófico, capaz de infectar mais de 500 espécies vegetais, dentre elas encontram-se feijão, milho, amendoim, girassol, soja, sorgo e crotalária, as espécies mais comumente conhecidas no Brasil (MARQUEZ et al., 2021; BASANDRAI et al., 2021; ALIZADEH et al., 2025). A capacidade de persistir por vários anos no solo e em restos culturais é um dos problemas de controle desse patógeno (PENNORMAN et al., 2024). Portanto, o controle da *M. phaseolina* é imprescindível para a manutenção da produtividade dos sistemas agrícolas.

Nessa perspectiva, o biocontrole tem sido considerado uma tecnologia importante no controle fitossanitário das doenças de plantas. Ainda, como medida de manejo, o uso de microrganismos antagônicos efetiva sustentabilidade ambiental, econômica e da performance agronômica em alternativa ao controle químico. No biocontrole, a biomassa de microalga como a *Parachlorella* sp. e microrganismos multifuncionais como o *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*, entre outros agentes que atuam beneficamente no controle fitossanitário tem ganhado destaque no mercado e aplicações agrícolas.

Esses incluem a competição por nutrientes e espaço, a produção de compostos antimicrobianos e voláteis, a indução de resistência sistêmica em plantas e a melhoria do crescimento vegetal (RUBAYET e BHUIYAN, 2023; DANISH et al., 2024; DHANABALAN et al., 2024). O uso combinado ou integrado desses bioinsumos têm despertado interesse no mercado agrícola e na pesquisa científica, especialmente em sistemas produtivos que buscam reduzir a dependência de insumos sintéticos. Entretanto, pouco se conhece a respeito do efeito desses bioinsumos por contato direto ou por compostos voláteis produzidos com o patógeno, aqui em nosso estudo com a *M. phaseolina*.

Nessa perspectiva, o biocontrole tem se consolidado como uma estratégia promissora no manejo fitossanitário de doenças de plantas, representando uma alternativa sustentável aos

métodos convencionais baseados no uso intensivo de defensivos químicos. A aplicação de microrganismos antagônicos contribui não apenas para a supressão de patógenos, mas também para a promoção da sustentabilidade ambiental, a redução de custos de produção e a melhoria da performance agronômica das culturas (ALI et al., 2024; YUSUF et al., 2025).

A bactéria *Bacillus subtilis*, embora frequentemente referida como Gram-positiva e formadora de endósporos, destaca-se como um importante agente de biocontrole em sistemas agrícolas. Sua eficiência está relacionada à atuação por múltiplos mecanismos, incluindo antibiose, parasitismo e competição por espaço e nutrientes (JAN et al., 2023; KARAČIĆ et al., 2024). Esse microrganismo é amplamente reconhecido pela capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários com ação antimicrobiana, como antibióticos (por exemplo, surfactina, iturina e fengicina), que inibem diretamente o crescimento de fungos fitopatogênicos.

*Trichoderma harzianum* destaca-se como um dos principais agentes de biocontrole utilizados na agricultura devido à sua ampla gama de mecanismos antagônicos contra fungos fitopatogênicos. Dentre esses mecanismos, a produção de metabólitos voláteis e não voláteis desempenha papel central com efeito fungistático ou fungicida. Entre esses metabólitos voláteis estão ácidos harziânico, alamectinas, trichonila, peptaibóis, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina e ácido heptelídico, compostos que podem interferir em processos fisiológicos essenciais dos patógenos, alterando a permeabilidade da membrana celular e induzir estresse oxidativo, resultando na inibição do crescimento micelial e da esporulação (GUO et al., 2023).

Além disso, o fungo produz metabólitos não voláteis, incluindo enzimas hidrolíticas como quitinases, glucanases e proteases, que degradam componentes estruturais da parede celular dos patógenos, atuando de forma direta no controle. Essa combinação de mecanismos que envolve ainda, micoparasitismo e competição por espaço e nutrientes, confere ao *T. harzianum* elevada eficiência no controle biológico, tanto em interações diretas quanto indiretas (KHAN et al., 2020).

Na literatura microalgas do gênero *Parachlorella* sp., *Chlorella* sp. e *Actodesmus dimorphus*, excretam metabólitos como ácidos graxos polinsaturados, fenóis, peptídeos cílicos e polifenóis, no qual alguns compostos vão se ligar a membrana celular do patógeno, danificando suas estruturas e levando à lise celular (BECKER, 2007; THIRUMURUGAN e RAJESH, 2018; ALALLAF et al., 2022).

Apesar dos avanços, ainda há lacunas no conhecimento sobre os efeitos específicos desses agentes quando em interação direta e/ou sinérgica com múltiplos agentes de biocontrole

sobre a atividade de fitopatógenos, sobretudo em condições de crescimento *in vitro* de *M. phaseolina*. Assim, hipotetizamos que (i) o *B. subtilis*, *T. harzianum* e a microalga *Parachlorella* sp. pode atuar no biocontrole de *M. phaseolina*, mas (ii) a eficiência do biocontrole é variável a interação entre os diferentes bioinsumos. Objetivou-se avaliar o potencial antagonista de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*, isolados ou em associação, além da interação desses microrganismos com a microalga *Parachlorella* sp., no controle *in vitro* de *M. phaseolina*

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Macrophomina phaseolina*: características, distribuição e impacto na soja

*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., é um fungo necrotrófico de elevada relevância econômica, associado à ocorrência de doenças transmitidas pelo solo e pelas sementes da soja (*Glycine max* (L.) Merrill), destacando-se a podridão do carvão e a podridão da raiz seca (YASMIN, 2020). O patógeno apresenta ampla distribuição geográfica e um vasto número de hospedeiros, abrangendo mais de 500 espécies vegetais cultivadas e não cultivadas, incluindo plantas daninhas, o que contribui para sua manutenção e disseminação em sistemas agrícolas (FREITAS et al., 2021; AOKI et al., 2023).

Sua principal estrutura de sobrevivência são os microescleródios, que conferem elevada resistência às condições adversas e permitem ao fungo permanecer viável no solo por longos períodos, mesmo na ausência de plantas hospedeiras (MUELLER et al., 2016). A infecção ocorre, predominantemente, por meio do sistema radicular, especialmente em situações de estresse hídrico e temperaturas elevadas, condições que favorecem tanto a germinação dos microescleródios quanto a colonização dos tecidos da planta hospedeira (BASHIR et al., 2019; FREITAS et al., 2021).

A doença tem ganhado importância crescente em regiões produtoras de soja, particularmente em áreas de expansão agrícola com solos arenosos e climas quentes, onde o manejo inadequado de resíduos culturais e a ausência de rotação de culturas têm contribuído para o aumento do inóculo no solo (AOKI et al., 2023). Estima-se que *M. phaseolina* seja responsável por perdas anuais de aproximadamente 2.505.000 toneladas de soja nos principais países produtores — Argentina, Bolívia, Brasil, Canadá, China, Índia, Paraguai e Estados Unidos — configurando-se como um dos patógenos mais impactantes para a cultura em escala global (YASMIN, 2020).

Os sintomas da podridão do carvão em soja se manifestam principalmente no final do ciclo, com murcha, clorose e senescência precoce das folhas. Nas raízes e na base do caule, observa-se escurecimento dos tecidos vasculares, fissuras e formação de microescleródios, podendo levar ao abortamento de vagens e morte prematura das plantas (MUELLER et al., 2016; FREITAS et al., 2021).

Devido à rápida progressão da doença e à ineficácia do controle curativo, é essencial adotar estratégias preventivas, como o uso de cultivares tolerantes, rotação de culturas, manejo da irrigação e aplicação de bioinsumos, visando reduzir o inóculo no solo e limitar perdas na

produtividade. No entanto, ainda são insuficientes informações técnicas a respeito de diversos manejos para o controle da doença.

## **2. 2. Bioinsumos e estratégias de biocontrole em sistemas agrícolas**

Nos últimos anos, a utilização de bioinsumos tem se intensificado em sistemas agrícolas modernos, sobretudo como estratégias sustentáveis de manejo. Entre os bioinsumos mais utilizados estão fungos e bactérias benéficas, como *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp., além de extratos vegetais e inoculantes microbianos, que promovem a saúde do solo, aumentam a resistência das plantas a patógenos e contribuem para a redução do uso de defensivos químicos. Assim, os bioinsumos apresentam potencial significativo para integrar práticas agrícolas sustentáveis, aumentando a produtividade e ao mesmo tempo minimizando impactos ambientais (SINGH et al., 2020; PEREIRA et al., 2022).

De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária (2020), os bioinsumos são produtos, processos e tecnologias projetados para preservar a saúde das plantas, concentrando-se no controle de pragas e doenças. Estes recursos abrangem uma variedade de elementos, como feromônios, aleloquímicos, bioacaricidas, biofungicidas e formulações à base de substâncias como cobre, boro, enxofre, óleo mineral, além de compostos e derivados provenientes de fontes vegetais, animais e minerais. Tais recursos são utilizados na produção, armazenamento e processamento de produtos agrícolas, em pastagens ou florestas plantadas. Seu propósito principal é modificar a composição da flora ou fauna, visando preservá-las contra os efeitos prejudiciais de organismos considerados nocivos.

De acordo com o Decreto Nº 10.375, de 26 de maio de 2020, que institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos, considera-se bioinsumo o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos.

No estado de Mato Grosso do Sul, de acordo com a Lei Nº 5.966, de 27 de outubro de 2022, fica instituído o Programa Estadual de bioinsumo, que caracteriza o bioinsumo como produto, processo ou a tecnologia de origem vegetal animal ou microbiana destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou nas florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no

desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos.

O uso de bioinsumos no controle fitossanitário tem se destacado como alternativa sustentável aos defensivos químicos. Microrganismos benéficos, como *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., além de extratos vegetais, atuam na competição por nutrientes, produção de metabólitos antifúngicos e indução de respostas de defesa nas plantas, reduzindo a incidência e severidade de doenças (SINGH et al., 2020; PEREIRA et al., 2023). Essas práticas contribuem para a sanidade das culturas, diminuindo impactos ambientais e riscos à saúde humana, e se inserem de forma eficiente em sistemas de manejo agrícola sustentável.

## **2. 3. Microalgas: diversidade, funções e aplicações na agricultura**

As microalgas são organismos fotossintetizantes de grande diversidade, presentes em ambientes aquáticos e terrestres, e desempenham papel central na produção primária e nos ciclos biogeoquímicos. Seu tamanho varia amplamente, do picoplâncton (0,2–2 µm) ao mesoplâncton (0,2–2 mm), sendo essa amplitude observada tanto entre quanto dentro de grupos taxonômicos (PIERRE et al., 2019).

Além da diversidade morfológica, as microalgas possuem ampla variedade funcional, produzindo compostos bioativos, pigmentos, lipídios e proteínas com aplicações biotecnológicas. Esse potencial tem sido explorado na agricultura, onde microalgas podem atuar como bioinsumos, promovendo o crescimento vegetal, aumentando a resistência a patógenos e melhorando a qualidade do solo, evidenciando sua importância para práticas agrícolas sustentáveis (PARMAR et al., 2023; RINCÓN-VALENCIA et al., 2023).

As principais microalgas cultivadas comercialmente são espécies dos gêneros *Arthrosphaera*, *Chlorella*, *Parachlorella*, *Aphanizomenon* e *Nostoc* (NAIK et al., 2024). Várias espécies são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida tem sido utilizada como fonte de produtos para aplicação na indústria de alimentos (SATHASIVAM et al., 2017). Na agricultura, as microalgas tem sido consideradas como biofertilizantes ou até bioestimulantes, por contribuir no crescimento, fisiologia e nutrição das plantas (SANTOS et al., 2023; ESIM et al., 2024) e na inoculação de sementes visando favorecer a germinação ou mitigar efeitos estressantes (SILVA et al., 2024).

Contudo, não há evidências científicas que comprovem o uso direto de *Parachlorella* sp. como agente biocontrolador de fitopatógenos. Embora essa microalga tenha demonstrado

potencial em diversas áreas, como produção de biomassa, mitigador de estresse abiótico, sua aplicação específica no biocontrole de doenças de plantas ainda não foi investigada. Estudos futuros são necessários para explorar essa possibilidade e avaliar a eficácia de *P. kessleri* como biofungicida ou biofertilizante em sistemas agrícolas.

## **2. 4. *Bacillus subtilis*: potencial como agente de biocontrole e promotor do crescimento vegetal**

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* estão entre os BCAs (Agentes de Controle Biológico, do inglês *Biological Control Agents*) mais comumente utilizados, aplicados como biofertilizantes ou biopesticidas em diferentes culturas e contra uma variedade de patógenos. O extenso desenvolvimento e registro de bioproductos à base de *Bacillus* está relacionado a algumas características únicas deste gênero que incluem alta taxa de replicação, resistência a condições ambientais adversas, maior eficiência na promoção do crescimento vegetal e atividade de amplo espectro (MAGNO-PÉREZ-BRYAN et. al., 2015).

Um dos principais mecanismos de ação do *B. subtilis* é a produção de compostos antimicrobianos, como lipopeptídeos e proteínas antimicrobianas. Esses compostos inibem o crescimento de uma ampla gama de fitopatógenos, incluindo fungos e bactérias, por meio da ruptura das membranas celulares dos patógenos e da interferência em processos metabólicos essenciais. Por exemplo, a produção de mycosubtilin, um lipopeptídeo da família iturina, tem demonstrado atividade antifúngica significativa contra patógenos como *Fusarium oxysporum* (LECLÉRE et al., 2020.) Recentemente, Liu et al. (2023) relataram que metabólitos produzidos por *B. amyloliquefaciens* não somente inibiram o crescimento micelial de *Fusarium incarnatum*, bem como ocasionaram alterações morfológicas nas hifas do patógeno sendo resultado associado aos compostos de origem antimicrobiana secretados pela bactéria.

Além disso, *B. subtilis* exerce um efeito antagonista físico e competitivo no ambiente rizosférico. Ele compete por nutrientes e espaços de adesão com patógenos, limitando sua capacidade de colonizar as raízes das plantas. Esse comportamento é facilitado pela formação de biofilmes estáveis, que proporcionam uma barreira protetora contra a invasão de patógenos (AKINSEMOLU et al., 2024).

Esses mecanismos multifacetados posicionam *B. subtilis* como uma ferramenta valiosa no manejo integrado de doenças, oferecendo uma alternativa sustentável ao uso de pesticidas químicos na agricultura.

## 2. 5. *Trichoderma harzianum*: mecanismos de ação e uso em manejo sustentável de doenças

*Trichoderma harzianum* destaca-se como um dos fungos saprofíticos mais estudados no contexto do biocontrole devido à sua eficácia, versatilidade ecológica e compatibilidade com práticas agrícolas sustentáveis. A literatura tem demonstrado que o sucesso de *T. harzianum* no controle de fitopatógenos deriva de um conjunto multifacetado de mecanismos de ação que atuam de forma sinérgica no ambiente rizosférico e sobre os tecidos vegetais, promovendo tanto supressão direta de patógenos quanto estímulos à defesa da planta (YAO et al., 2023; GUZMÁN-GUZMÁN et al., 2023).

Um dos mecanismos clássicos atribuídos a *T. harzianum* é o micoparasitismo, processo no qual hifas de *Trichoderma* reconhecem, aderem e penetram hifas de fungos fitopatogênicos, liberando enzimas hidrolíticas — como quitinases, glucanases e proteases — que degradam a parede celular do antagonista (MUKHERJEE et al., 2022). Complementarmente, *T. harzianum* produz uma gama de metabolitos secundários com atividade antibiótica e fungicida (por exemplo, peptídeos, polipeptídeos e compostos voláteis), que inibem o crescimento de patógenos à distância e modulam as interações microbianas na rizosfera (JEMO et al., 2023; ASGHAR et al., 2024).

No plano de aplicações práticas, *T. harzianum* tem sido empregado em formulações comerciais para tratamento de sementes, inoculação de substratos, aplicações no solo e como componente de misturas com outros bioinsumos (por exemplo, *Bacillus* spp. ou extratos vegetais). Resultados de campo e ensaios em condições controladas indicam benefícios consistentes na redução de doenças de solo, melhoria no estabelecimento de plântulas e aumento do vigor vegetal; entretanto, a eficiência depende fortemente da cepa utilizada, da formulação, das condições edafoclimáticas e do manejo integrado adotado (FIRDU et al., 2020; KHAN et al., 2022). Protocolos que conciliam rotação de culturas, manejo de restos culturais e uso de cultivares tolerantes costumam potencializar os efeitos de *Trichoderma*.

Apesar do amplo potencial, há limitações e desafios a serem superados para a adoção mais ampla e previsível de *T. harzianum*. A variabilidade entre cepas quanto à capacidade de antagonismo, colonização e sinergismo entre indivíduos antagônicos exige uma seleção criteriosa e testes regionais. Além disso, adversidades abióticas (temperatura, umidade, pH) podem reduzir a sobrevivência e eficácia.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3. 1. Local de condução experimental

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Brasil.

#### 3. 2. Obtenção, multiplicação e manutenção do isolado fúngico

O isolado de *M. phaseolina* foi obtido da micoteca do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia. Para multiplicação do patógeno, discos de micélios das colônias armazenadas em câmaras refrigeradas foram transferidos para placas de Petri, descartáveis e esterilizadas, contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). As placas foram vedadas, identificadas e incubadas em câmara B.O.D., submetidas a fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C, sendo repicados até a obtenção de culturas puras do fungo. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

#### 3. 3. Fatores em estudo para o biocontrole de *M. phaseolina*

Foram desenvolvidos dois ensaios *in vitro* independentes visando avaliar o potencial biocontrole de *M. phaseolina*: i) confrontação direta e ii) compostos voláteis, ambos realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias, na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados – Mato Grosso do Sul, Brasil. Em ambos ensaios foram testados os seguintes bioinsumos: i) *Bacillus subtilis*, ii) *Trichoderma harzianum* e iii) *B. subtilis* + *T. harzianum*, além da testemunha (sem microrganismos) (iv), todos associados ou não a adição da microalga *Parachlorella* sp. no preparo da calda.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 × 2 (microrganismos × microalga, respectivamente), com cinco repetições e cada unidade experimental foi constituída de uma placa de Petri.

#### 3. 4. Ensaio 1: Confrontação direta de bioinsumos com *M. phaseolina*

Para avaliar o potencial antagonista direto dos tratamentos na inibição do crescimento micelial do isolado patogênico de *M. phaseolina*, foi utilizada a técnica de confrontação direta (Rosa et al., 2010). Nesse procedimento, dois discos de micélio de *M. phaseolina* com 3 mm

de diâmetro foram dispostos a 2 cm de ambas às bordas da Placas de Petri (98 mm, Ø) e ao centro da placa foram dispostos os agentes antagônicos (Figura 1).

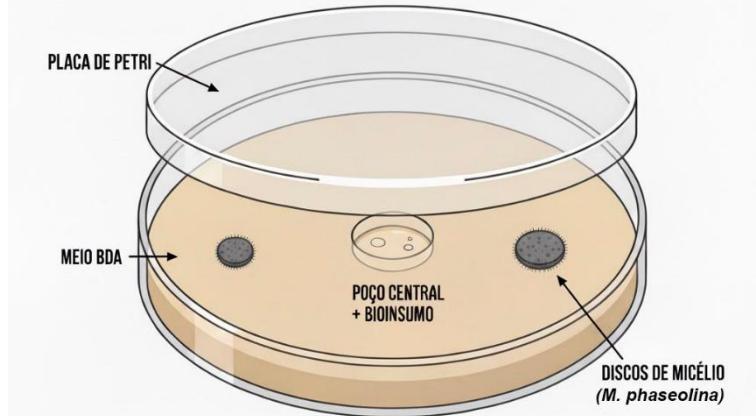


FIGURA 1. Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* exposto ao confronto com os diferentes agentes antagônicos. Fonte: Concolato (2025).

Após, foi realizada a transferência de 50 µL de uma solução dos produtos comerciais a base dos microrganismos, sendo contidos em micropoços (5 mm, Ø) ao centro das placas de Petri contendo BDA. Em seguida, as placas foram incubadas em BOD sob temperatura de 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 h. A medição do crescimento micelial foi realizada com o auxílio de um paquímetro digital em intervalos periódicos de 24 horas incubação até a estabilização do crescimento no tratamento controle.

Com relação as avaliações, foi realizada a mensuração do diâmetro da colônia fúngica em eixos ortogonais usando duas medidas diametralmente opostas com auxílio de um paquímetro digital (mm). De posse dos dados obtidos e períodos de incubação foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) usando fórmulas propostas por Oliveira (1991), por meio da seguinte equação:

$$IVCM = \frac{\sum(D - Da)}{N}$$

Em que:

D= diâmetro médio atual da colônia; Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação.

Ao final do período de incubação, as placas de Petri foram abertas cuidadosamente em ambiente controlado, a fim de evitar contaminações e interferências externas. Foram então realizados registros fotográficos padronizados para documentar o aspecto visual das colônias. As imagens foram obtidas sob iluminação uniforme, posicionando-se a câmera

perpendicularmente à superfície das placas, de modo a evidenciar características morfológicas como coloração, distribuição, textura e formação de estruturas típicas do crescimento microbiano em cada tratamento.

### 3. 5. Ensaio 2: Compostos difusíveis no biocontrole de *M. phaseolina*

O efeito inibidor de metabólitos voláteis em função dos bioinsumos foi testado pela metodologia de Dennis e Webster (1971). Nesta técnica, placas de Petri contendo meio cultura BDA solidificado receberam os diferentes agentes antagônicos contidos em minipoços (5 mm, Ø) ao centro das placas, os quais foram preenchidos com 50 µL da calda comercial.

Da mesma forma, no centro de outra placa de Petri, foi colocado um disco de micélio colonizado pelo patógeno. As placas contendo antagonista e patógeno foram sobrepostas formando uma atmosfera compartilhada. Por fim, o conjunto foi selado com filme de plástico filme, de forma que as placas contendo o patógeno ficasse na posição superior e o antagonista na posição inferior (Figura 2). O tratamento controle foi representado por placas contendo o patógeno, mas na ausência do antagonista na parte inferior. As placas foram incubadas em câmara do tipo BOD a 25º C com fotoperíodo de 12 horas.

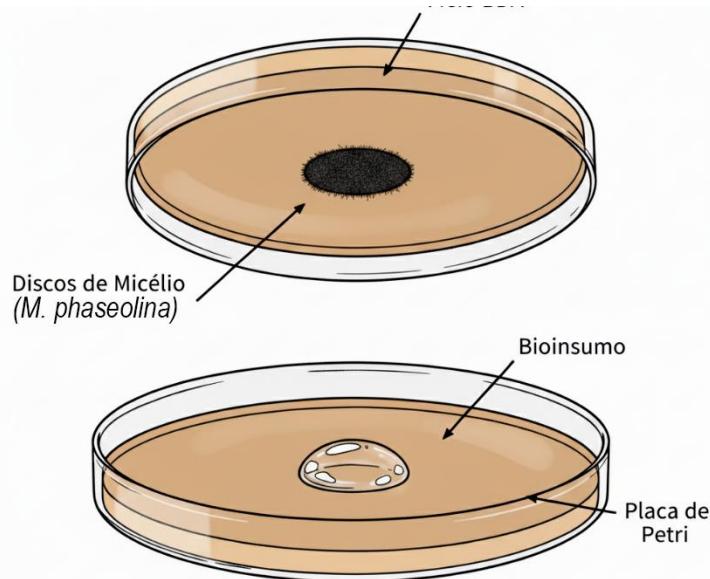


FIGURA 2. Diagrama do experimento de inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* exposto aos compostos orgânicos voláteis dos diferentes agentes antagônicos. Fonte: Adaptado de Dennis e Webster (1971).

As avaliações foram realizadas em intervalos fixos de 24 até a estabilização do crescimento no tratamento controle, procedendo a mensuração do diâmetro da colônia fúngica em eixos ortogonais usando duas medidas diametralmente opostas com auxílio de um

paquímetro digital, determinando o crescimento micelial da fase ativa vegetativa (micélio branco/jovem) e da fase de estrutura de resistência (micélio escuro/formação de escleródio), resultados expressos em mm. Além disso, utilizando os dados de crescimento de cada fase e períodos após a incubação foi calculado o índice de velocidade de crescimento micelial de cada fase utilizando a proposta de Oliveira (1991).

Ao final do período de incubação, as placas de Petri foram abertas cuidadosamente em ambiente controlado, a fim de evitar contaminações e interferências externas. Foram então realizados registros fotográficos padronizados para documentar o aspecto visual das colônias. As imagens foram obtidas sob iluminação uniforme, posicionando-se a câmera perpendicularmente à superfície das placas, de modo a evidenciar características morfológicas como coloração, distribuição, textura e formação de estruturas típicas do crescimento microbiano em cada tratamento.

Para a análise morfológica das estruturas fúngicas, foram confeccionadas lâminas semipermanentes a partir de fragmentos de micélio do fitopatógeno coletados na região próxima à zona de confronto com o antagonista. Os fragmentos foram cuidadosamente transferidos para lâminas de vidro utilizando uma agulha histológica estéril e, em seguida, cobertos com uma gota de azul de lactofenol. Posteriormente, foi posicionada uma lamínula sobre a amostra, evitando a formação de bolhas de ar. As lâminas foram observadas em microscópio óptico (aumento de 40x; NA 0.65), registrando-se as características morfológicas relevantes, como forma e disposição das hifas e alterações morfológicas decorrentes da interação entre os microrganismos.

Em ambos os ensaios, foi calculada a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) conforme proposta adaptada de Shaner e Finney (1977) utilizando a seguinte equação:

$$\text{AACCM} = \sum n [Y_{i+1} + Y_i/2] * [(T_{i+1} - T_i)] i-1$$

Em que:

Y<sub>i</sub>: valores de crescimento de colônia na época de avaliação i (i=1, n) Y<sub>i+1</sub>: valores de crescimento de colônia i + 1 T<sub>i</sub>: época da avaliação i, que considerou o intervalo entre as avaliações. T<sub>i+1</sub>: época da avaliação i + 1 n: número de observações.

### 3. 6. Análise de dados

Para cada ensaio (confrontação direta e compostos voláteis) e período de avaliação (horas após a incubação – HAI) isoladamente, os dados de crescimento micelial, AACCM e IVCM foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Quando significativos pelo teste F ( $p \leq 0,05$ ), as médias em função dos efeitos isolados e da interação foram comparadas pelo teste de Tukey para os microrganismos (*B. subtilis* e *T. harzianum*) e o teste F para o uso da microalga *Parachlorella* sp., todos a  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão, utilizando o software SISVAR 5.3. O aspecto visual de biocontrole nas placas de Petri e a imagem de microscopia em função dos fatores em estudo foram apresentados de maneira descritiva.

## 4 RESULTADOS

### 4. 1. Confrontação direta de bioinsumos em *M. phaseolina*

Na confrontação direta, observamos que o crescimento micelial da *M. phaseolina* foi influenciado pela interação microrganismos × microalga *Parachlorella* sp. em 24, 48 e 72 HAI. Decorrido 24 HAI, sem microalga a associação de *B. subtilis* + *T. harzianum* contribuiu no menor crescimento do micélio (28,15 mm) (Figura 3a), mantendo a mesma tendência as 48 HAI, mas com resposta descrente (Figura 3b). Decorridos 72 HAI, observamos eficiência do *T. harzianum* e *B. subtilis* + *T. harzianum* no controle do crescimento micelial da *M. phaseolina*, diferindo dos demais, independente do uso da microalga (Figura 3c).

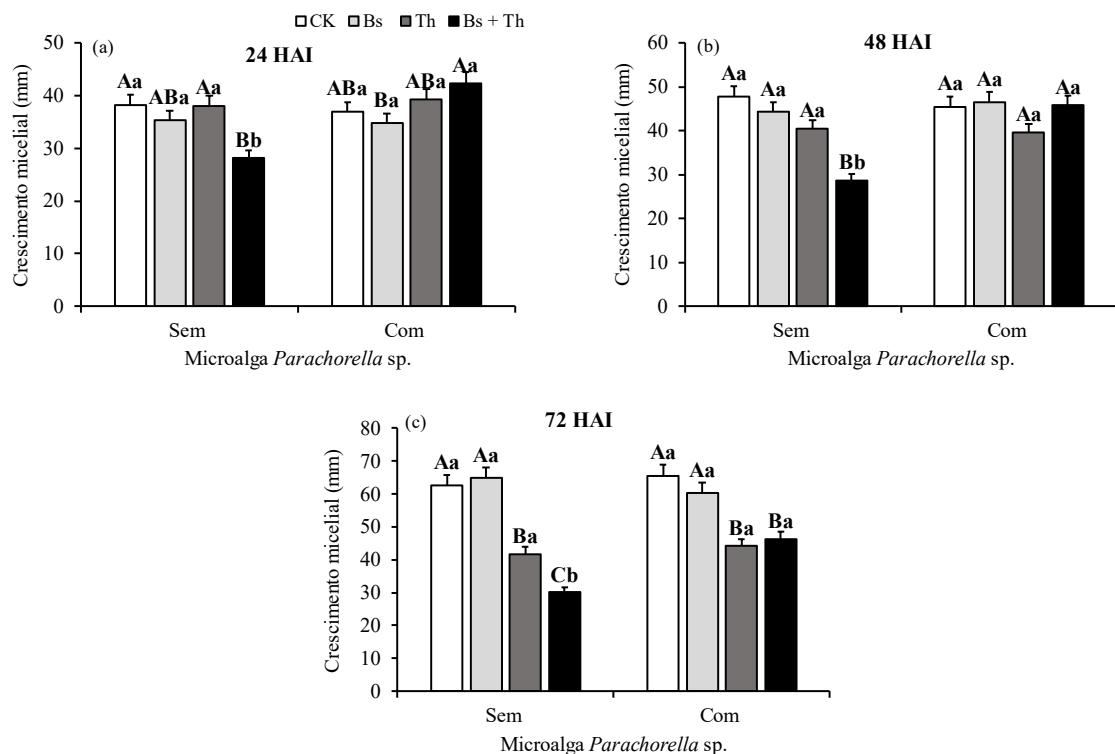


FIGURA 3. Crescimento micelial da *Macrophomina phaseolina* por meio da técnica de confrontação direta com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* microalga *Parachlorella* sp. isolados ou associados, em diferentes períodos (horas após a inoculação – HAI). Letras maiúsculas comparam o efeito dos microrganismos (teste de Tukey,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). Letras minúsculas comparam o efeito da microalga *Parachlorella* sp. (teste F,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). CK = testemunha, Bs = *B. subtilis*, Th = *T. harzianum*.

Os menores valores da área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACCM) e índice de velocidade de crescimento médio (IVCM) do micélio de *M. phaseolina* foram observados com *B. subtilis*, independente da microalga *Parachlorella* sp., bem como na associação *B. subtilis* + *T. harzianum* sem microalga (Figura 4a e 4b).

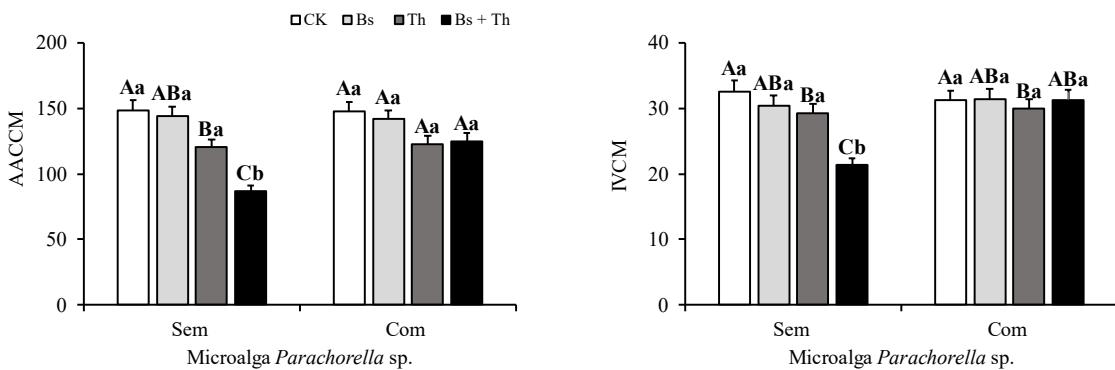


FIGURA 4. Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) (a) e Índice de velocidade de crescimento médio (IVCM) (b) do micélio de *Macrophomina phaseolina* por meio da técnica de confrontação direta com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* microalga *Parachlorella* sp. isolados ou associados, em diferentes períodos (horas após a inoculação – HAI). Letras maiúsculas comparam o efeito dos microrganismos (teste de Tukey,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). Letras minúsculas comparam o efeito da microalga *Parachlorella* sp. (teste F,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). CK = testemunha, Bs = *B. subtilis*, Th = *T. harzianum*.

Após 96 horas de incubação, foi possível observar diferenças marcantes no crescimento de *Macrophomina phaseolina* em função dos diferentes bioinsumos utilizados (Figura 5). Na testemunha (A), o patógeno apresentou crescimento uniforme e abundante, com coloração escura característica, recobrindo praticamente toda a superfície do meio de cultura. No tratamento com *Bacillus subtilis* (B), notou-se a presença de uma colônia bacteriana central, porém sem a formação de halos de inibição evidentes, resultando em um padrão de crescimento semelhante ao controle.

Em contraste, a presença de *Trichoderma harzianum* (C) promoveu clara interferência no desenvolvimento do patógeno, evidenciada pela formação de uma zona de interação bem definida, na qual o micélio esverdeado do antagonista avançou sobre a colônia de *M. phaseolina*. Situação semelhante foi observada na associação *B. subtilis* + *T. harzianum* (D), em que ambos os agentes se desenvolveram simultaneamente, com colonização esverdeada típica de *T. harzianum* e presença da colônia bacteriana no centro da placa, resultando em sobreposição parcial sobre o micélio do patógeno.

Os tratamentos envolvendo *Parachlorella* sp. isoladamente (E) ou em combinação com *B. subtilis* (F) não apresentaram efeito visual expressivo na restrição do crescimento de *M. phaseolina*, mantendo um padrão semelhante ao observado na testemunha. Por outro lado, na associação *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. (G), verificou-se comportamento análogo ao observado para *T. harzianum* isolado, indicando ação antagonista predominante do fungo. A associação tripla (*B. subtilis* + *T. harzianum* + *Parachlorella* sp.) (H) promoveu intensa

colonização esverdeada e redução visível da área ocupada pelo patógeno, sugerindo um efeito combinado entre os agentes.

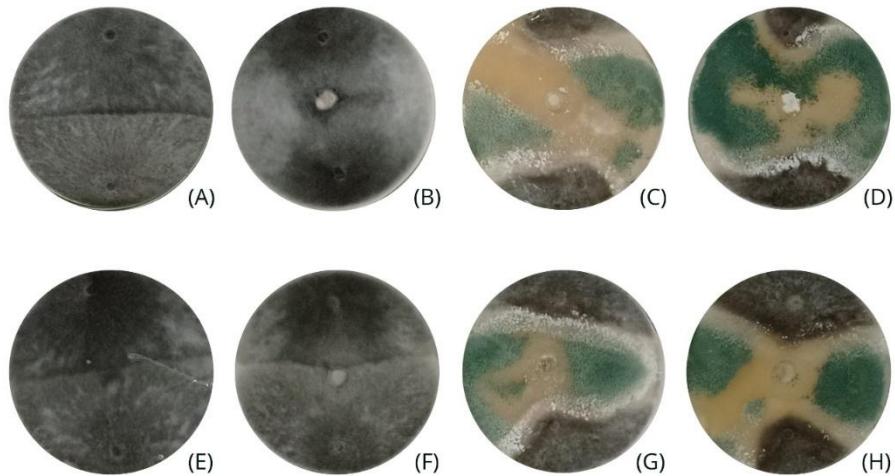


FIGURA 5. Aspecto visual das placas de Petri com *Macrophomina phaseolina* por meio da técnica de confrontação direta” com diferentes bioinsumos isolados ou associados. (A) testemunha, (B) *Bacillus subtilis*, (C) *Trichoderma harzianum*, (D) *B. subtilis* + *T. harzianum*, (E) *Parachlorella* sp., (F) *B. subtilis* + *Parachlorella* sp., (G) *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. e (H) *B. subtilis* + *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. em 96 horas após o período de incubação.

#### 4. 2. Compostos difusíveis de bioinsumos no controle de *M. phaseolina*

O crescimento do micélio em fase vegetativa foi influenciado pela interação dos microrganismos e microalga as 48 HAI, enquanto que as 72, 96 e 120 HAI houve efeito dos microrganismos, independente da adição da microalga *Parachlorella* sp. (Figura 6). Em 48 HAI, os menores valores ocorreram ao utilizar *B. subtilis* + *T. harzianum* e *B. subtilis* sem e com microalga, respectivamente (Figura 6a).

Verificamos menores valores de crescimento micelial com *B. subtilis* e *B. subtilis* + *T. harzianum*, diferindo do CK as 72 HAI (Figura 6b). Decorridos 96 HAI, o uso dos microrganismos isolados ou associados resultaram em menor crescimento do micélio jovem (Figura 6c), enquanto que as 120 HAI apenas *B. subtilis* + *T. harzianum* inibiram o crescimento do patógeno, diferindo estatisticamente das CK (Figura 6d).

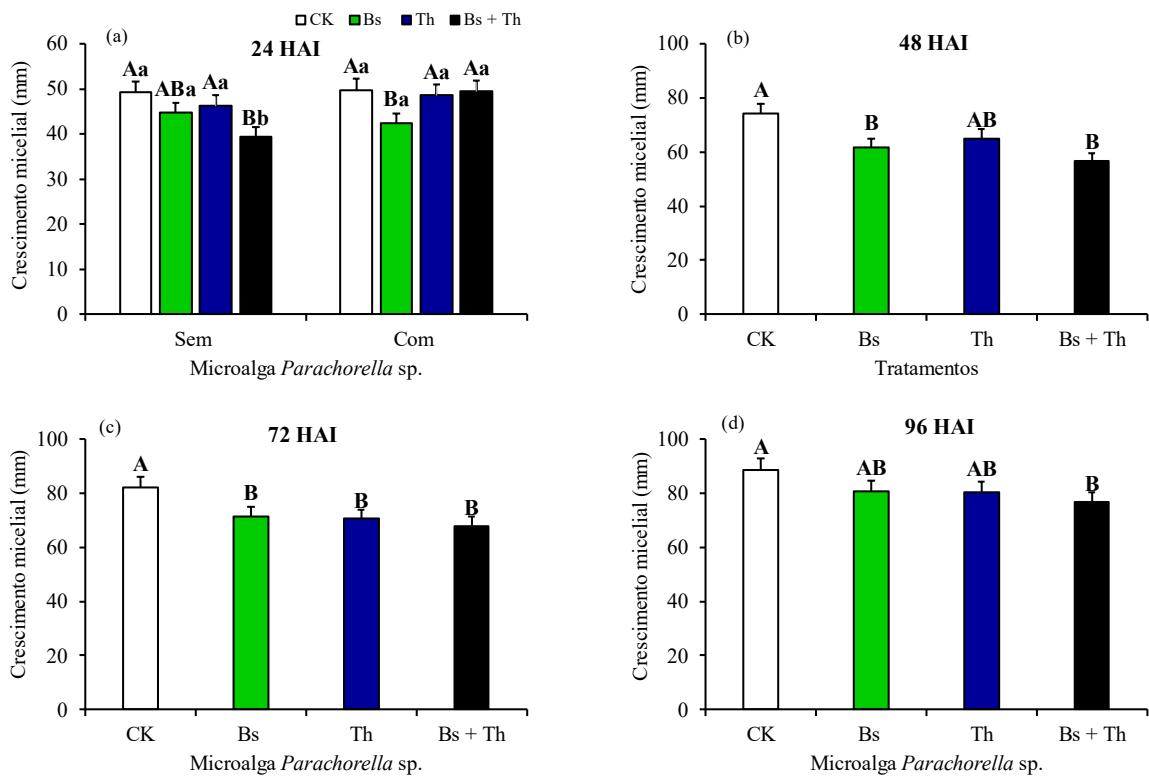


FIGURA 6. Crescimento do micélio na fase ativa vegetativa (jovem/branco) de *Macrophomina phaseolina* por meio da técnica de compostos difusíveis com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* microalga *Parachlorella* sp. isolados ou associados, em diferentes períodos (horas após a inoculação – HAI). Letras maiúsculas comparam o efeito dos microrganismos (teste de Tukey,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). Letras minúsculas comparam o efeito da microalga *Parachlorella* sp. (teste t de Bonferroni,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). CK= testemunha, Bs= *B. subtilis*, Th= *T. harzianum*.

A AACCM jovem foi influenciada pela interação entre os fatores em estudo, no qual sem microalga o uso de *B. subtilis* + *T. harzianum* refletiu em menor valor, diferindo de CK e *T. harzianum*. Com microalga não se verificou diferença estatística entre os microrganismos, mas diferiu daquelas sem microalga com *B. subtilis* + *T. harzianum* (Figura 7a). O IVCM do micélio na fase ativa vegetativa foi menor *B. subtilis* + *T. harzianum*, diferindo de CK (Figura 7b).

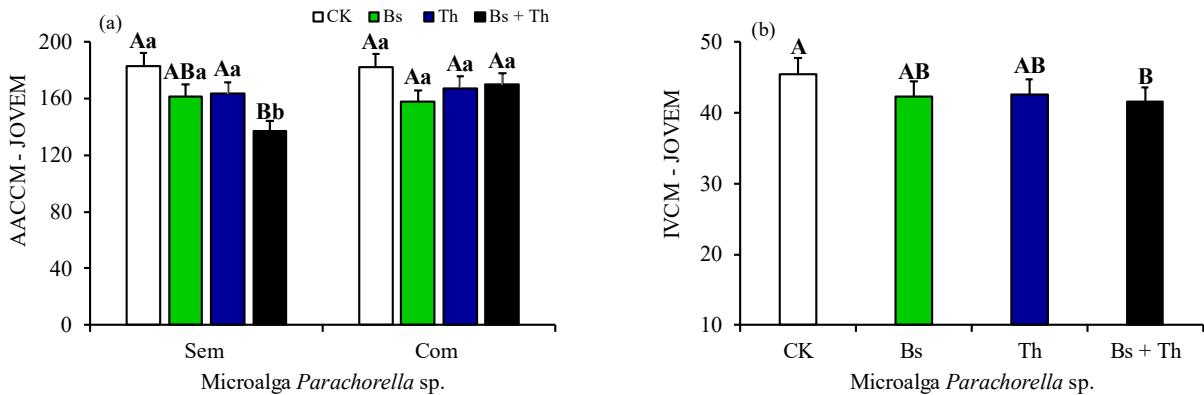


FIGURA 7. Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM) (a) e Índice de velocidade de crescimento médio (IVCM) (b) do micélio jovem na fase ativa vegetativa com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* microalga *Parachlorella* sp. isolados ou associados. Letras maiúsculas comparam o efeito dos microrganismos (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas comparam o efeito da microalga *Parachlorella* sp. (teste F,  $p \leq 0,05$ ). CK= Testemunha, Bs= *B. subtilis*, Th= *T. harzianum*.

O crescimento do micélio na fase de formação de escleródio foi influenciado pelos microrganismos, independente da microalga em todos os períodos de incubação (Figura 8). De modo geral, em 48, 72 e 96 HAI os menores valores ocorreram com *B. subtilis* e *B. subtilis* + *T. harzianum*, enquanto que aos 120 HAI foi menor com *B. subtilis*.

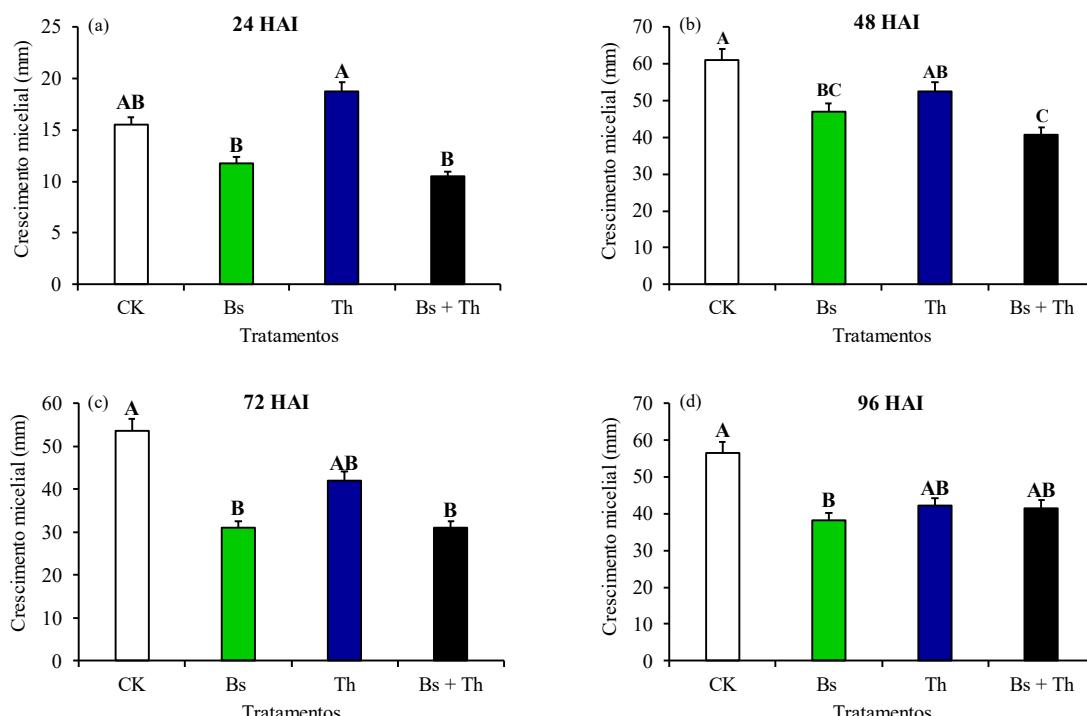


FIGURA 8. Crescimento do micélio na fase de estrutura de resistência (escleródio) de *Macrophomina phaseolina* por meio da técnica de compostos difusíveis com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* e microalga *Parachlorella* sp. isolados

ou associados, em diferentes períodos (horas após a inoculação – HAI). Letras maiúsculas comparam o efeito dos microrganismos (teste de Tukey,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). Letras minúsculas comparam o efeito da microalga *Parachlorella* sp. (teste t de Bonferroni,  $p \leq 0,05 \pm$  erro padrão). CK= Testemunha, Bs= *B. subtilis*, Th= *T. harzianum*.

Na fase de formação de estrutura de resistência (escleródios) a AACCM foi influenciada pelos microrganismos, independente da microalga e o IVCM foi influenciado pela interação entre os fatores em estudo (Figura 9). Os menores valores de AACCM ocorreu com *B. subtilis* e *B. subtilis* + *T. harzianum*, diferindo de CK (Figura 9a). Para IVCM, sem microalga ao utilizar o *B. subtilis* e *T. harzianum* isolados ou associados refletiram em menores valores, enquanto que com microalga apenas *B. subtilis* resultou em menor IVCM (Figura 9b).

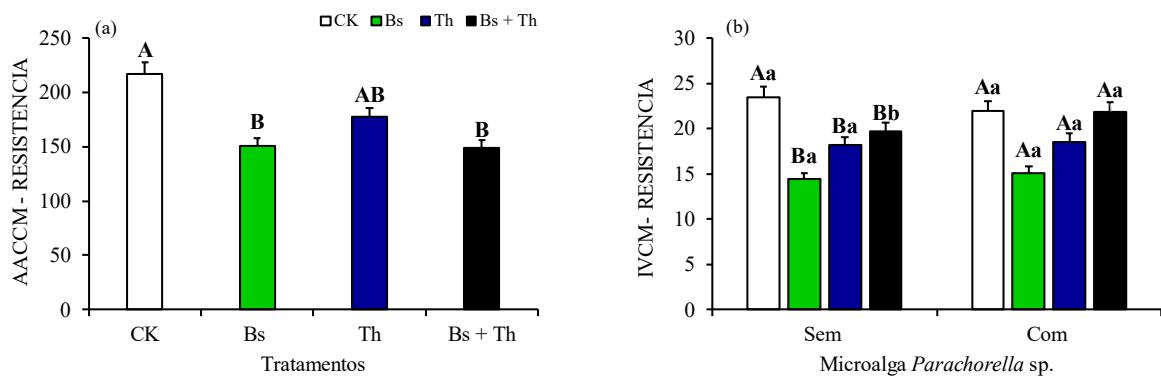


FIGURA 9. Área abaixo da curva de progresso do crescimento micelial (AACCM) (a) e Índice de velocidade de crescimento médio (IVCM) (b) do micélio na fase de estrutura de resistência (escleródio) com *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* microalga *Parachlorella* sp. isolados ou associados. Letras maiúsculas comparam o efeito dos microrganismos (teste de Tukey,  $p \leq 0,05$ ). Letras minúsculas comparam o efeito da microalga *Parachlorella* sp. (teste F,  $p \leq 0,05$ ). CK= Testemunha, Bs= *B. subtilis*, Th= *T. harzianum*.

Após 120 horas de incubação, foi possível observar o desenvolvimento de micélio jovem de *Macrophomina phaseolina* a partir do disco de 3 mm depositado no centro das placas de Petri, com diferenças sutis entre os tratamentos avaliados (Figura 10). Na testemunha (A), o fungo apresentou crescimento micelial uniforme e denso, com formação de zonas concêntricas bem definidas e coloração acinzentada escura no centro, característica da espécie. O tratamento com *Bacillus subtilis* (B) resultou em pequenas alterações visuais no desenvolvimento do patógeno, reduzindo a densidade micelial visual ao centro da placa.

Nos tratamentos com *Trichoderma harzianum* (C) e com a associação *B. subtilis* + *T. harzianum* (D), não foram observadas zonas de inibição visíveis na colônia de *M. phaseolina*. Contudo, foi possível observar um menor desenvolvimento da região de maturação (coloração

escura) indicando que, nesse período de avaliação, houve redução do crescimento micelial maturo em relação ao controle.

O uso de *Parachlorella* sp. isoladamente (E) ou em combinação com *B. subtilis* (F) não promoveu modificações perceptíveis no diâmetro das colônias. No tratamento com *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. (G) e a associação tripla (*B. subtilis* + *T. harzianum* + *Parachlorella* sp.) (H) o fungo manteve um padrão de crescimento radial da zona de resistência inferior ao controle, indicando uma pequena alteração na proporção de microesclerodios formados, em relação ao controle.

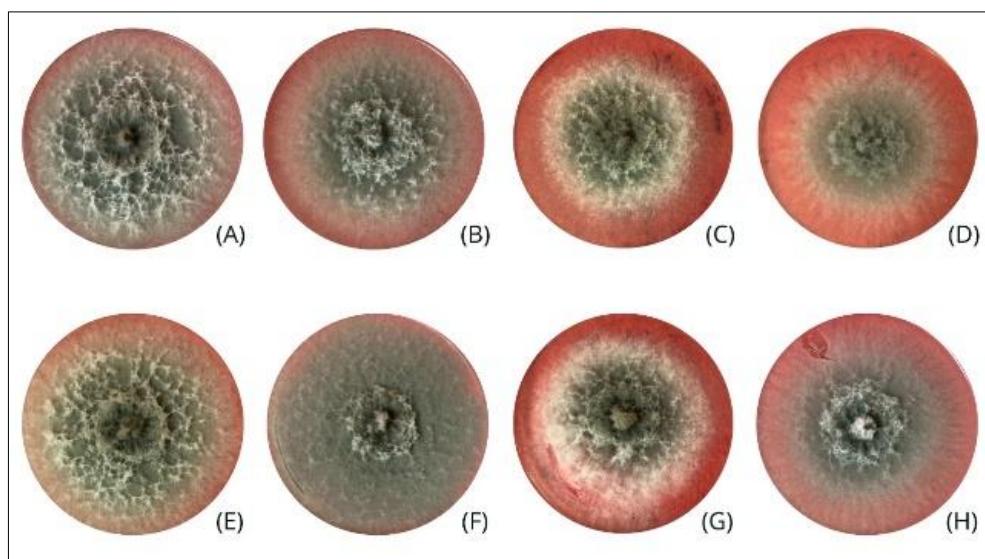


FIGURA 10. Aspecto visual do efeito de diferentes bioinsumos no controle de *Macrophomina phaseolina* ao 120 horas após a incubação (HAI). (A) testemunha, (B) *Bacillus subtilis*, (C) *Trichoderma harzianum*, (D) *B. subtilis* + *T. harzianum*, (E) *Parachlorella* sp., (F) *B. subtilis* + *Parachlorella* sp., (G) *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. e (H) *B. subtilis* + *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. A imagem mostra discos de micélio de 3 mm de *M. phaseolina*, em fase inicial de crescimento sobre meio de cultura BDA, podendo-se observar o crescimento de micélios jovens ao redor destes discos. Fonte: Próprio autor.

Por meio da microscopia óptica foi possível observar morfológicas no micélio de *M. phaseolina* sob exposição aos voláteis dos bioinsumos, foi possível observar anormalidades recorrentes na estrutura física do micélio (Figura 11). Foi observado que a exposição a compostos voláteis produzidos por *B. subtilis* resultou no aumento volumétrico entre os septos (Fig. 11 - B). Ainda, compostos voláteis produzidos por *T. harzianum* e a associação com *B. subtilis* apresentaram as mesmas anomalias citadas, com exceção do enrolamento das hifas do patógeno (Fig. 11 – C, D). Em complemento, nenhuma alteração foi observada nos demais

tratamentos, com excessão da associação de *B. subtilis* + *Parachlorella* sp. onde as hifas de *M. phaseolina* apresentaram ligeira em espessura dos entre-septos (Fig. 11 – G).

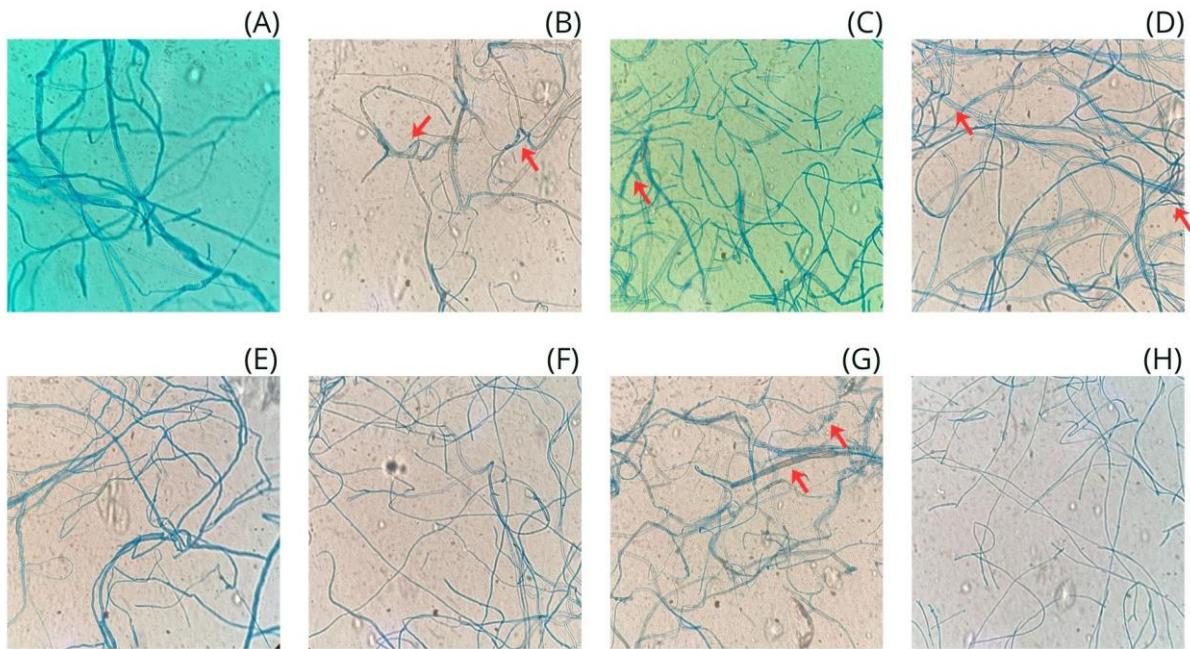


FIGURA 11. Microscopia óptica para análise visual micelial do fungo *Macrohomina phaseolina* sob influência de compostos voláteis proveniente de *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum* microalga *Parachlorella* sp. isolados ou associados. (A) testemunha, (B) *Bacillus subtilis*, (C) *Trichoderma harzianum*, (D) *B. subtilis* + *T. harzianum*, (E) *Parachlorella* sp., (F) *B. subtilis* + *Parachlorella* sp., (G) *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. e (H) *B. subtilis* + *T. harzianum* + *Parachlorella* sp. Todas as imagens possuem inserções com ampliação de 40/0.65. Fonte: Próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

Em geral, observamos que o uso de *T. harzianum* e *B. subtilis*, isoladamente ou em associação, foram eficazes em inibir o crescimento micelial de *M. phaseolina*, seja por confronto direto ou compostos difusíveis, confirmando nossa hipótese inicial. Entretanto, as respostas de eficiência no biocontrole de *M. phaseolina* variaram de acordo com a técnica de confronto dos diferentes agentes biológicos. Ainda, observamos que a microalga *Parachlorella* sp. isolada ou combinada não contribuiu no biocontrole. Em acréscimo, a associação da microalga aos demais microrganismos reduziu a eficiência dos antagonistas sobre o fitopatógeno, refutando uma das hipóteses propostas, sugerindo incompatibilidade biológica ou outros mecanismos de interação.

Devido à sua ação antagonista multifatorial, *T. harzianum* apresentou elevado potencial como agente de biocontrole contra *M. phaseolina*, promovendo inibição expressiva do crescimento micelial. No entanto, apesar da redução significativa do crescimento vegetativo, o antagonista não foi capaz de impedir a transição da fase vegetativa para a fase de resistência, permitindo a formação de microescleródios. Essa observação indica que a ação de *T. harzianum* sobre *M. phaseolina* caracteriza-se predominantemente como um antagonismo fungistático não persistente, uma vez que, embora haja inibição inicial do desenvolvimento micelial, a formação de estruturas de sobrevivência não é completamente suprimida.

É conhecido que, o gênero *Trichoderma* atua principalmente por meio de dois mecanismos: o micoparasitismo e a competição (SILVA et al., 2022). Outros autores complementam ainda que, o micoparasitismo ocorre por estímulos químicos emitidos pelas hifas do fungo hospedeiro, os quais são detectados pelo *Trichoderma*, crescendo em direção a essas estruturas do fitopatógeno para então estabelecer a relação parasitária, enquanto a antibiose decorre da produção de metabólitos secundários antifúngicos (MAURYA et al., 2024).

Em estudo semelhante, Bleckwedel et al. (2024) demonstraram que espécies nativas de *Trichoderma* são capazes de sintetizar uma variedade de compostos antifúngicos, como enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários, que comprometem a integridade da parede celular dos fitopatógenos. Em complemento, os autores verificaram que as alterações na integridade da parede celular das hifas do patógeno possibilitam o estabelecimento do micoparasitismo, sendo ambos mecanismos antagônicos complementares.

No que se refere ao *Bacillus* spp., a eficácia observada pode ser atribuída à produção de metabólitos antifúngicos, como os lipopeptídeos cíclicos, capazes de alterar os processos vitais

do desenvolvimento fúngico, alterando a permeabilidade e a síntese da membrana celular, levando a deformidades na estrutura morfológica da hifa patogênica, o que afeta diretamente a capacidade do fitopatógeno em estabelecer relações parasitárias com plantas hospedeiras (LIANG et al., 2023; YOUSFI et al., 2024).

Estudando o comportamento *in vitro* de duas cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, Rangel-Montoya et al. (2022) observaram inibição de até 66,8% no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, resultado atribuído à ação combinada de compostos voláteis e difusíveis produzidos pelas bactérias. Diversos metabólitos secundários têm sido relatados como responsáveis pela atividade antagonista de isolados de *Bacillus* spp. apresentando efeito inibitório sobre o crescimento de *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium longisporum*, *Monilinia laxa*, *M. fruticola* e *V. longisporum*, evidenciando a ampla gama de ação desses metabólitos. Assim, entre os metabólitos mais comumente caracterizados destacam-se os lipopeptídeos como bacilomicina, macrolactina, iturina, surfactina e fengicina, os quais apresentam elevada atividade antifúngica e têm sido associados à inibição de *M. phaseolina* em diferentes estudos (BOJÓRQUEZ-ARMENTA et al., 2021; WU et al., 2019; DHANABALAN et al., 2024).

Assim, com base nos mecanismos de ação de espécie do gênero *Bacillus*, Rodrigues et al. (2022), destacam que a produção de compostos orgânicos, competição por nutrientes podem ocasionar a redução no crescimento micelial e, assim, redução da AACCM, como observado em nosso estudo. Por outro lado, *T. harzianum* produz uma ampla gama de compostos voláteis com ação antimicrobiana, tais como o ácido harzianico, alamectinas, trichonila, peptaibol, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, massoilactone, viridina, gliovirina, ácido heptelídico, inibindo não somente o crescimento e desenvolvimento do fitopatógeno, mas também, atuando como elicitores capazes de induzir respostas de defesa das plantas (LIM et al., 2023; MENDOZA-MENDOZA et al., 2024).

A redução dos valores de AACCM observada nos tratamentos com *B. subtilis* e *T. harzianum*, aplicados isoladamente ou em associação, reforça a capacidade desses microrganismos em inibir o desenvolvimento de *M. phaseolina*. A AACCM corresponde à quantificação do crescimento micelial acumulado ao longo do tempo (SIMKO; PIEPHO, 2012), sendo um indicador sensível da intensidade de inibição promovida por agentes antagonistas. Valores reduzidos indicam menor expansão do micélio e, consequentemente, maior efeito de biocontrole. Nesse contexto, verificou-se que *T. harzianum* apresentou maior eficiência nos ensaios de confrontação direta, provavelmente devido à sua habilidade de competir por espaço

e nutrientes, associada à produção de enzimas hidrolíticas e ao micoparasitismo direto sobre as hifas do patógeno.

Por outro lado, *B. subtilis* destacou-se na redução da AACCM nos ensaios com compostos voláteis, o que pode estar relacionado à produção de metabólitos secundários de natureza gasosa, como lipopeptídeos e antibióticos, capazes de difundir-se no meio e exercer ação antifúngica sem necessidade de contato físico. Esses mecanismos complementares podem afetar não apenas o crescimento vegetativo, mas também a reprodução e perenidade do patógeno, contribuindo para o aumento da eficiência de controle biológico.

Nos ensaios com compostos voláteis, a presença da microalga *Parachlorella* sp. pouco influenciou a AACCM e o IVMC, não interferindo negativamente na eficiência dos agentes de biocontrole. Isso pode estar relacionado ao fato de que, nesse tipo de ensaio, a ação antifúngica é predominantemente mediada por metabólitos produzidos pelos microrganismos antagonistas que atuam à distância. Como a microalga não apresenta atividade antifúngica direta expressiva, sua presença não competiu ou interferiu na liberação e difusão desses compostos produzidos por *B. subtilis* e *T. harzianum*, permitindo que os antagonistas mantivessem sua eficácia.

Por outro lado, na confrontação direta, a associação da microalga com *B. subtilis* + *T. harzianum* resultou em redução da eficiência de biocontrole. Esse comportamento pode estar ligado a interações competitivas ou espaciais no meio de cultura sólido. Embora em nossos ensaios a microalga não foi classificada como antagonista, pode competir por nutrientes ou modificar o microambiente local, alterando o crescimento e a expressão de mecanismos de defesa ou de antagonismo dos microrganismos de biocontrole (ASTAFYEVA et al., 2022; SANTO et al., 2022). Além disso, a presença física da microalga pode interferir na formação de halos de inibição ou no contato micoparasítico direto entre os antagonistas e o patógeno, reduzindo a eficiência das interações de confronto.

De forma geral, esse resultado sugere que *Parachlorella* sp. não interfere negativamente na atividade dos demais bioinsumos quando a ação é mediada por metabólitos voláteis, podendo inclusive atuar de forma neutra ou complementar, como observado em combinações com *B. subtilis*. No entanto, em interações que dependem de contato direto, sua presença pode alterar a dinâmica física ou nutricional do ambiente, impactando parcialmente o desempenho dos agentes de controle biológico (ECKSTIEN et al., 2024; LÓPEZ-ARELLANES et al., 2025).

Embora não seja especificamente com *Parachlorella* sp., estudos como o de Chokshi et al. (2020) apontam que microalgas do gênero *Chlorella* e *Parachlorella* produzem compostos bioativos como polissacarídeos, proteínas e antioxidantes que podem favorecer a estabilidade metabólica de microrganismos benéficos em co-inoculações ou agentes de biocontrole

especificamente. Em estudo realizado Alallaf et al. (2022), verificou-se a ação de compostos voláteis provenientes da *Chlorella vulgaris* sobre o crescimento micelial de *M. phaseolina*, apresentando inibição de 57,6%. Em complemento, os autores associaram a resposta a uma diversidade de compostos voláteis com propriedades antimicrobianas como alcanos cílicos, fenóis, compostos halogenados, amidas, ácidos, álcoois, cetonas, lactonas, ésteres graxos, ésteres metílicos de ácidos graxos, derivados do ácido ftálico e álcoois.

A atuação combinada desses microrganismos, aqui representados pelo *B. subtilis* e *T. harzianum*, resultou em respostas superiores nos dois mecanismos testados: confronto direto e metabólitos difusíveis. O desempenho positivo, mesmo sem a presença da microalga, reforça que tais agentes possuem ação robusta, o que os torna promissores para formulações comerciais e aplicação em sistemas agrícolas sustentáveis no biocontrole, como evidenciado nos bioensaios do presente estudo.

Contudo, a atuação sinérgica em alguns cenários envolvendo *Parachlorella* sp. sugere que essa microalga pode atuar como coadjuvante, fornecendo substratos ou promovendo a viabilidade dos agentes microbiológicos. Estudos futuros devem explorar essa interação em condições de campo, especialmente avaliando a aplicação desses agentes diretamente na planta e avaliar os possíveis mecanismos de biocontrole em um hospedeiro suscetível.

Com isso, apesar da microalga não apresentar atividade antagônica nos ensaios *in vitro*, outras respostas possam ser obtidas em condições *in vivo*. Assim, é provável que em associação com a planta hospedeira, a microalga contribua em estimular as respostas fisiológicas, enzimáticas ou bioquímicas conforme relatos na literatura e possam favorecer a indução da resistência, reforçando a necessidade de estudos complementares.

## 6. CONCLUSÃO

De forma geral, os resultados confirmam a eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* no biocontrole de *Macrophomina phaseolina*, tanto por confronto direto quanto por compostos voláteis, destacando seus mecanismos complementares de antagonismo, como micoparasitismo, competição e produção de metabólitos antifúngicos.

*T. harzianum* apresentou efeito fungistático expressivo, embora não tenha impedido totalmente a formação de microescleródios, o que pode limitar o controle em longo prazo. *B. subtilis*, por sua vez, mostrou maior eficiência na inibição mediada por metabólitos voláteis, reforçando seu potencial em sistemas de controle biológico.

A microalga *Parachlorella* sp., isolada ou em associação, não contribuiu para o biocontrole *in vitro* e, em confrontos diretos, reduziu a eficiência dos antagonistas, possivelmente por competição ou interferência física.

Assim, a combinação de *B. subtilis* e *T. harzianum* se mostrou promissora para formulações comerciais e estratégias sustentáveis de manejo, enquanto a interação com *Parachlorella* sp. requer estudos adicionais em condições de campo para elucidar possíveis efeitos positivos na indução de resistência ou promoção do crescimento vegetal.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, LUCIANA DE PAIVA SANTOS et al. Alternativa sustentável de uso da *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos: uma revisão. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 16, n. 1, 2022.
- ALI, A.; AHMED, T.; IBRAHIM, E.; RIZWAN, M.; CHONG, K. P.; YONG, J. W. H. A review on mechanisms and prospects of endophytic bacteria in biocontrol of plant pathogenic fungi and their plant growth-promoting activities. **Heliyon**, v. 10. N. 11, e31573, 2024.
- ALIZADEH, M.; MANESH, S. K.; FATHI, P.; KARIMI, H.; NOORABADI, M. T.; ROSHANROO, M.; KARIMZADEH, S.; DONI, F.; RAHIMI-SOUJEH, Z.; GHALEH, M. K.; QADERI, S.; ABBOD, M.; MOHAMMADI, S.; GHASEMI, H.; JAVARAN, Z. J.; MOBASSERI, M.; QARACHAL, J. F.; SAADATI, M.; ALIGHOLIZADEH, A.; BAHARI, A.; SHIAPOUSH, S.; XU, B.; VASEBI, Y. Biology and Host Ranges of the Plant Pathogenic Fungus *Macrophomina Phaseolina*: a Comprehensive Review. **Journal of Crop Health**, v. 77, n. 50, e11064, 2025.
- AMPOFO, J.; ABBEY, L. Microalgae: Bioactive Composition, Health Benefits, Safety and Prospects as Potential High-Value Ingredients for the Functional Food Industry. **Foods**, v. 11, n. 12, e1744, 2022.
- AOKI, T. et al. Current status of charcoal rot of soybean caused by *Macrophomina phaseolina* and management strategies. **Plant Pathology Journal**, v. 39, n. 4, p. 339–355, 2023.
- ASGHAR, W.; CRAVEN, K.D.; KATAOKA, R.; MAHMOOD, A.; ASGHAR, N.; RAZA, T.; IFTIKHAR, F. The application of *Trichoderma* spp., an old but new useful fungus, in sustainable soil health intensification: A comprehensive strategy for addressing challenges. **Plant Stress**, v. 12, e100455, 2024.
- ASTAFYEVA, Y.; GURSCHKE, M.; QI, M.; BERGMANN, L.; INDENBIRKEN, D.; DE GRAHL, I.; KATZOWITSCH, E.; REUMANN, S.; HANELT, D.; ALAWI, M.; STREIT, W. R.; KROHN, I. Microalgae and Bacteria Interaction-Evidence for Division of Diligence in the Alga Microbiota. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 4, e0063322, 2022
- BASANDRAI, A. K.; PANDEY, A. K.; SOMTA, P.; BASANDRAI, D. *Macrophomina phaseolina*–host interface: Insights into an emerging dry root rot pathogen of mungbean and urdbean, and its mitigation strategies. **Plant Pathology**, v. 70, p. 1263-1275, 2021.
- BASHIR, M. R. et al. Influence of temperature and soil moisture on the incidence of charcoal rot of soybean caused by *Macrophomina phaseolina*. **Plant Disease**, v. 103, n. 8, p. 2008–2016, 2019.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science, 2004. p. 312-351.
- BELTRAME, A.; PACHOLATTI, S. F. Cianobactérias e algas reduzem os sintomas causados Tobacco Mosaic Vírus (TMV) em plantas de fumo. **Summa Phytopathol.**, v. 32, n. 2, p. 140–145, 2011.

- BLECKWEDEL, J.; MARTÍNEZ, M. J.; CLAPS, M. P.; DE LISI, V.; GONZÁLEZ, V.; PLOPER, L. D.; REZNIKOV, S. Biological control of soybean charcoal rot by native *Trichoderma koningiopsis* in Tucumán, Argentina. **Biological Control**, v. 196, e105581, 2024.
- BLOKKER, P. et al. Estrutura química da algaenana da água doce *Tetraedron mínimo*, *Scenedesmus communis* e *Pediastrum boryanum*. **Organic Geochemistry**, v. 29, p. 1453–1468, 1998.
- BOJÓRQUEZ-ARMENTA, Y.D.J.; MORA-ROMERO, G.A.; LÓPEZ-MEYER, M.; MALDONADO-MENDOZA, I. E.; CASTRO-MARTÍNEZ, ROMERO-URÍAS, C. A.; CORDERO-RAMÍREZ, J. D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C. Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87 p. 377–386, 2021.
- COHEN, R.; ELKABETZ, M.; PARIS, H. S.; GUR, A.; DAI, N.; RABINOVITZ, O.; FREEMAN, S. Occurrence of *Macrophomina phaseolina* in Israel: Challenges for Disease Management and Crop Germplasm Enhancement. **Plant Disease**, v. 106, e1390, 2022.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Brasília, DF: v. 11, safra 2023/24, n. 1, primeiro levantamento, out. 2023.
- DANISH, M.; SHAHID, M.; FARAH, M. A.; AL-ANAZI, K. M.; ZEYAD, M. T. Synergistic interactions of biocontrol agents and chemical fungicides enhance the disease resistance in *Vigna radiata* (L.) against *Macrophomina phaseolina*-associated with dry root rot. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 134, e102441, 2024
- DELL'OLMO, E.; TRIPODI, P.; ZACCARDELLI, M.; SIGILLO, L. Occurrence of *Macrophomina phaseolina* on Chickpea in Italy: Pathogen Identification and Characterization. **Pathogens**, v. 11, n. 8, e842, 2022.
- DERNER, ROBERTO BIANCHINI et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959–1967, 2006.
- DHANABALAN, S.; MUTHUSAMY, K.; IRUTHAYASAMY, J.; KUMARESAN, P. V.; RAVIKUMAR, C.; KANDASAMY, R.; NATESAN, S.; PERIYANNAN, S. Unleashing *Bacillus* species as versatile antagonists: Harnessing the biocontrol potentials of the plant growth-promoting rhizobacteria to combat *Macrophomina phaseolina* infection in *Gloriosa superba*. **Microbiological Research**, v. 283, e127678, 2024
- DHANABALAN, S.; MUTHUSAMY, K.; IRUTHAYASAMY, J.; KUMARESAN, P. V.; RAVIKUMAR, C.; KANDASAMY R.; NATESAN, S.; PERIYANNAN, S. Unleashing *Bacillus* species as versatile antagonists: Harnessing the biocontrol potentials of the plant growth-promoting rhizobacteria to combat *Macrophomina phaseolina* infection in *Gloriosa superba*. **Microbiol Res.**, v. 283, e127678, 2024.
- DOS SANTOS, E. A. et al. Climate change in Brazilian agriculture: vulnerability and adaptation assessment. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1–18, 2023.
- DOS SANTOS, S. M. et al. Uso de microalgas no setor agrícola e agroindustrial. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 164–170, 2022.

ECKSTIEN, D. MAXIMOV, N.; MARGOLIS, N.; RAANAN, H. Towards sustainable biocontrol: inhibition of soil borne fungi by microalgae from harsh environments. **Front Microbiol**, v. 15, e1433765, 2024.

ESIM, N.; DAWAR, P.; ARSLAN, N. P.; ORAK, T.; DOYMUS, M.; AZAD, F.; ORTUCU, S.; ALBAYRAK, S.; TASKIN, M. Natural metabolites with antioxidant activity from micro- and macro-algae. **Food Bioscience**, v. 62, e105089, 2024.

FIRDU, Z.; ALEMU, T.; ASSEFA, F. Field performance of *Trichoderma harzianum* AAUT14 and *Bacillus subtilis* AAUB95 on faba bean (*Vicia faba* L.) growth promotion and management of chocolate spot (*Botrytis fabae* Sard.). **IJPSS**, v. 32, p. 35-45, 2020.

FREITAS, M. A. et al. Charcoal rot: a reemerging disease in soybean. **Tropical Plant Pathology**, v. 46, p. 325–337, 2021.

GUO, Q.; SHI, L.; WANG, X.; LI, D.; YIN, Z.; ZHANG, J.; DING, G.; CHEN, L. Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from the *Trichoderma* genus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 37, p. 13612, 13632, 2023.

GUZMÁN-GUZMÁN, P.; KUMAR, A.; SANTOS- VILLALOBOS, S.; PARRA-COTA, F. I.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; FADJI, A. E.; HYDER, S.; BABALOLA, O. O.; SANTOYO, G. Trichoderma Species: Our Best Fungal Allies in the Biocontrol of Plant Diseases—A Review. **Plants**, v. 12, n. 3, e432, 2023.

HIRAKURI, MARCELO HIROSHI. O contexto econômico da produção de soja. In: *Tecnologias de Produção de Soja*. Londrina: Embrapa Soja, p. 15–32, 2020. MAIDANA-OJEDA, M. et al. Quantificação do inóculo de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid em parcelas de soja no Departamento de Itapúa-Paraguai. **Investigações e Estudos – UNA**, v. 11, n. 2, p. 69–77, 2020.

JAN, F.; Arshad, H.; Ahad, M.; Jamal, Smith, D. L. *In vitro* assessment of *Bacillus subtilis* FJ3 affirms its biocontrol and plant growth promoting potential. **Frontiers Plant Science**, v. 14, e1205894, 2023.

JEMO, M.; NKENMEGNE, S.; BUERNOR, A.B.; RAKLAMI, A.; AMBANG, Z.; SOULEYAMANOU, A.; OUHDOUCH, Y.; HAFIDI, M. Mycorrhizas and *Trichoderma* fungi increase the accumulation of secondary metabolites in grain legume leaves and suppress foliar diseases in field-grown conditions of the humid forest of Cameroon. **BMC Plant Biol**, v. 23, e582, 2023.

KARAČIĆ, V.; MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; IGNJATOV, M.; MILOŠEVIĆ, D.; TAMINDŽIĆ, G.; IVANOVIĆ, M. *Bacillus* Species: Excellent Biocontrol Agents against Tomato Diseases. **Microorganisms**, v. 12, n. 3, e457, 2024.

KHAN, A.; BANI MFARREJ, M.F.; NADEEM, H.; AHAMAD, L.; HASHEM, M.; ALAMRI, S.; GUPTA, R.; AHMAD, F. *Trichoderma virens* mitigates the root-knot disease progression in the chickpea plant. **Acta Agric. Scand. Sect. B—Soil Plant Sci.** v. 72, p. 775–787, 2022.

KHAN, R. A. A.; NAJEEB, S.; HUSSAIN, S.; XIE, B.; LI, Y. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, e817, 2020.

LECLÉRE, V.; BÉCHET, M.; ADAM, A.; GUEZ, J. S.; WATHELET, B.; ONGENA, M.; THONART, P.; GANCEL, F.; CHOLLET-IMBERT, M.; JACQUES, P. Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities. **Biomolecules**, v. 71, p. 4577-4584, 2020.

LIANG, Y.; WU, W.; LI, R.; LU, Y.; WANG, G.; TAN, S.; CHEN, H.; XI, J.; HUANG, X.; HE, C.; YI, K. Evaluation of *Bacillus subtilis* Czk1 Metabolites by LC-MS/MS and Their Antifungal Potential against *Pyrrhoderma noxium* Causing Brow Rot Disease. **Agriculture**, v. 13, e1396, 2023.

LIM, J. S.; HONG, J. H.; LEE, D. Y.; LI, X.; LEE, D. E.; CHOI, J. U.; LEE, K. Y.; KIM, K. H.; CHO, Y. C. 6-Pentyl- $\alpha$ -Pyrone from *Trichoderma gamsii* Exert Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties in Lipopolysaccharide-Stimulated Mouse Macrophages. **Antioxidants**, v. 12, n.12, e2028, 2023.

LIU, J.; QIN, D.; HUANG, W.; WANG, X.; LI, Y.; ZHANG. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* Bafl against *Fusarium incarnatum* causing fruit rot in postharvest muskmelon (cv. Yugu) fruit. **LWT**, v. 181, e114714, 2023.

LÓPEZ-ARELLANES, M. E.; LÓPEZ-PACHECO, L. D.; ELIZONDO-LUEVANO, J. H.; GONZÁLEZ-MEZA, G. M. Algae and Cyanobacteria Fatty Acids and Bioactive Metabolites: Natural Antifungal Alternative Against *Fusarium* sp. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, e439, 2025.

MAGNO-PEREZ-BRYAN, M. C. et al. A genômica comparativa dentro do gênero *Bacillus* revela as singularidades de duas cepas robustas de biocontrole de *Bacillus amyloliquefaciens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 10, p. 1102–1116, 2015.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control. **Front. Plant Sci.** v. 12, e634397, 2021.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M.L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. **Front. Plant Sci.** v. 12, e634397, 2021.

MAURYA, S.; NTAKIRUTIMANA, R.; DEBNATH, B.; RANA, M.; KAUSHIK, D.; SRIVASTAVA, S. Trichoderma and Their Secondary Metabolites -A Potential Approach in Plant Disease Management. **Biopesticides International**, v. 20, n. 1, p. 21-33, 2024.

MENDOZA-MENDOZA, A.; ESQUIVEL-NARANJO, E. U.; SOTH, S.; WHELAN, H.; ALIZADEH, H.; ECHAIDE-AQUINO, J. F.; KANDULA, D.; HAMPTON, J. G. Uncovering the multifaceted properties of 6-pentyl-alpha-pyrone for control of plant pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, e1420068, 2024.

MICHAŁEK, W. et al. The influence of biostimulant Asahi SL on the photosynthetic activity of selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. **Roczn. Ochr. Sr.**, v. 20, p. 1286–1301, 2018.

MONTOYA, MARCO ANTONIO et al. Uma nota sobre consumo energético, emissões, renda e emprego na cadeia de soja no Brasil. **Revista Brasileira de Economia**, v. 73, p. 345–369, 2019.

MORAES, R. F. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. *Texto para Discussão 2506*. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA, Rio de Janeiro, p. 1–76, 2019.

MUELLER, D. S. et al. Charcoal rot of soybean—current status and management options. **Plant Health Progress**, v. 17, n. 4, p. 233–246, 2016.

MUKHERJEE, P. K.; MENDOZA- MENDOZA, A.; ZEILINGER, S.; HORWITZ, B. A. Mycoparasitism as a mechanism of *Trichoderma*-mediated suppression of plant diseases. **Fungal Biology Reviews**, v. 39, p. 15-33, 2022.

NAIK, B.; MISHRA, R.; KUMAR, V.; MISHRA, S.; GUPTA, U.; RUSTAGI, S.; GUPTA, A, K.; PREET, M. S.; BHATT, S. C.; RIZWANUDDIN, S. Micro-algae: Revolutionizing food production for a healthy and sustainable future. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 15, e100939, 2024.

NIE, PINGPING et al. Function of miR825 and miR825\* as negative regulators in *Bacillus cereus* AR156-elicited systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 20, p. 5032, 2019.

PARMAR, P.; KUMAR, R.; NEHA, Y.; SRIVATSAN, V. Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy-based solutions. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, e1073546, 2023.

PENNERMAN, K. K.; DILLA-ERMITA, C. J.; HENRY, P. M. Exaggerated plurivory of *Macrophomina phaseolina*: accounting for the large host range claim and the shifting of scientific language. **Phytopathology**, v. 114, p. 119-125, 2024.

PEREIRA, A. L.; SILVA, F. L.; COSTA, L. M. *El uso de biofertilizantes en la agricultura moderna: sus avances, desafíos y perspectivas*. **Multidisciplinary Collaborative Journal**, v. 1, n. 2, p. 52-64, 2023

PIERRE, GUILLAUME et al. O que está reservado para as microalgas EPS na próxima década?. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4296, 2019.

RANGEL-MONTOYA, E. A.; DELGADO-RAMÍREZ, C. S.; SEPULVEDA, E.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* Using *Bacillus amyloliquefaciens* Strains in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **Agronomy**, v. 12, n. 3, e676, 2022.

RUBAYET, T.; BHUIYAN K. A. *Trichoderma* spp.: A bio-agent for sustainable management of *Macrophomina phaseolina*. In: *Macrophomina Phaseolina. Ecobiology, Pathology and Management*, p. 265-290, 2023.

SALES-JUNIOR, R.; SILVA-NETO, A. N.; NEGREIROS, A. M. P.; GOMES, T. R. R.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; ARMENGOL, J. Pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in cowpea. **Rev. Caatinga**, v. 33, n. 2, p. 395 – 401, 2020.

SAMARAS, ANASTÁCIOS; KARAOGLANIDIS, GEORGE S.; TZELEPIS, GEORGIOS. Insights sobre as interações multitróficas entre o agente de biocontrole *Bacillus subtilis* MBI 600, o patógeno *Botrytis cinerea* e sua planta hospedeira. **Research in Microbiology**, v. 248, p. 126752, 2021.

SANTO, E. E.; ISHII, M.; PINTO, U. M.; MATSUDO, M. C.; CARVALHO. Obtaining Bioproducts from the Studies of Signals and Interactions between Microalgae and Bacteria. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, e2029, 2022.

SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ALLAH, E. F. A. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 709-722, 2017.

SILVA, L. R.; MELLO, S. C. M.; VALADARES-INGLIS, M. C.; COSTA, M. M. C.; SARAIVA, M. A. P.; RÉGO, E. C. S.; ZACARONI, A. B.; MUNIZ, P. H. P. C.; PAPPAS, M. C. R. Transcriptional responses and reduction in carpogenic germination of *Sclerotinia sclerotiorum* exposed to volatile organic compounds of *Trichoderma azevedoi*. **Biological Control**, v. 169, e104897, 2022.

SIMKO, I.; PIEPHO, H-P. The Area Under the Disease Progress Stairs: Calculation, Advantage, and Application. **Analytical and Theoretical Plant Pathology**, v. 102, n. 4, p. 381-389, 2012.

SINGH, R.; KUMAR, A.; SINGH, R. K. *Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible*. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 38, n. 1, p. 9-21, 2025.

ŠUĆUR ELEZ, JOVANA et al. Susceptibility of the most popular soybean cultivars in South-East Europe to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Plants**, v. 12, n. 13, p. 2467, 2023.

SZPARAGA, A. et al. Prototyping extracts from *Artemisia absinthium* L. for their biostimulating properties yield-enhancing, and farmer income-increasing properties. **Industrial Crops and Products**, v. 160, p. 113125, 2021.

SZPARAGA, A. et al. Towards sustainable agriculture—Agronomic and economic effects of biostimulant use in common bean cultivation. **Sustainability**, v. 11, p. 4575, 2019.

WU, Y.; ZHOU, J.; LI, C.; MA, Y. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. **MicrobiologyOpen** v. 8, e00813, 2019.

YAO, X.; GUO, H.; ZHANG, K.; ZHAO, M.; RUAN, J.; CHEN, J. Trichoderma and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, e1160551, 2023.

YASMIN, HUMAIRA et al. Identificação de novo agente de biocontrole contra a podridão do carvão causada por *Macrophomina phaseolina* em soja (*Glycine max* L.). **Sustainability**, v. 12, n. 17, p. 6856, 2020.

YASMIN, T. Impact of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on soybean yield. **Journal of Plant Pathology**, v. 102, n. 2, p. 401–407, 2020.

YOUSFI, S.; KRIER, F.; DERACINOIS, B.; STEELS, S.; COUTTE, F.; FRIKHAGARGOURI, O. Characterization of *Bacillus velezensis* 32a metabolites and their synergistic bioactivity against crown gall disease. **Microbiological Research**, v. 280, e127569, 2024.

YSUF, A.; YU, J.; ABDULLAHI, B.; GUMEL, A. M.; BISHIR, S.; ALIYU, Y. I.; LI, M.; DUAN, S.; ZHANG, Y. Biocontrol mechanisms, application potential, and challenges of *Burkholderia* spp. in plant fungal disease management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 10, e106746, 2025.

ZEFA, D. M. et al. Efeitos de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas na coinoculação com *Bradyrhizobium* na cultura da soja: uma meta-análise de estudos de 1987 a 2018. **PeerJ**, v. 8, e7905, 2020.