

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Avaliação da compatibilidade entre produto comercial biológico à base de
Bacillus velezensis e defensivos químicos *in vitro***

Karolline de Paula Silva Gomes
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

KAROLLINE DE PAULA SILVA GOMES

**Avaliação da compatibilidade entre produto comercial biológico à base de
Bacillus velezensis e defensivos químicos *in vitro***

Dissertação Mestrado Profissional
apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Defesa
Sanitária Vegetal (Profissional), para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Franklin Jackson Machado

Coorientador: Odair José Kuhn

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

G633a
2026

Gomes, Karolline de Paula Silva, 1992-
Avaliação da compatibilidade entre produto comercial
biológico à base de *Bacillus velezensis* e defensivos químicos *in vitro* / Karolline de Paula Silva Gomes. – Viçosa, MG, 2026.
1 dissertação eletrônica (41 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Franklin Jackson Machado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Entomologia, 2026.
Referências bibliográficas: f. 38-41.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.412>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Pesticidas - Avaliação de riscos. 2. Plantas - Doenças e pragas - Controle integrado. I. Machado, Franklin Jackson, 1991-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Defesa Sanitária Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 632.95

KAROLLINE DE PAULA SILVA GOMES

**Avaliação da compatibilidade entre produto comercial biológico à base de
Bacillus velezensis e defensivos químicos *in vitro***

Dissertação Mestrado Profissional
apresentada à Universidade Federal de
Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Defesa
Sanitária Vegetal (Profissional), para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de setembro de 2025.

Assentimento:

Karolline de Paula Silva Gomes
Autora

Franklin Jackson Machado
Orientador

Essa dissertação mestrado profissional foi assinada digitalmente pela autora em 04/08/2026 às 11:49:33 e pelo orientador em 04/08/2026 às 13:35:59. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **4SYF.7NP9.RXT8** e clique no botão 'Validar documento'.

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos."
(Eleanor Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força, sabedoria e saúde para enfrentar e superar os desafios ao longo desta caminhada.

À minha mãe, Ângela, e às minhas irmãs, Kássia e Geovana, pelo amor incondicional, apoio constante e por sempre acreditarem no meu potencial.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o mestrado e pela contribuição essencial à minha formação acadêmica e profissional.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, pelo apoio e pela disponibilização das instalações do Laboratório de Fitopatologia, fundamentais para a condução dos experimentos deste trabalho.

Ao meu orientador professor Franklin, pela dedicação, paciência e orientação contínua, que foram indispensáveis para a concretização deste trabalho.

Ao meu coorientador professor Odair, pelos ensinamentos compartilhados, pelas valiosas contribuições científicas e pelo suporte durante o desenvolvimento do projeto.

Ao meu marido, Rafael, por toda paciência, compreensão e companheirismo durante essa jornada, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia da UNIOESTE, Marta, Rafa, Thaís e, em especial, Sabrina pelo suporte técnico, pela parceria no dia a dia e pelo apoio nas diferentes fases da pesquisa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, expresso aqui minha mais sincera gratidão.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

GOMES, Karolline de Paula Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2025. **Avaliação da compatibilidade entre produto comercial biológico à base de *Bacillus velezensis* e defensivos químicos *in vitro***. Orientador: Franklin Jackson Machado. Coorientador: Odair José Kuhn.

O uso de agentes biológicos, como *Bacillus velezensis*, tem se destacado no manejo integrado de doenças, sendo uma alternativa sustentável aos defensivos químicos. No entanto, a compatibilidade físico-química e biológica entre biofungicidas e agroquímicos é essencial para garantir a eficácia da aplicação em tanque. Este estudo avaliou, *in vitro*, (i) a compatibilidade de um produto comercial biológico à base de *B. velezensis* com diferentes grupos de defensivos químicos, determinando o impacto dessas misturas no crescimento e na viabilidade do microrganismo após duas horas de exposição, (ii) as propriedades físico-químicas das caldas, visando identificar possíveis alterações que pudessem comprometer sua estabilidade e eficácia em condições de laboratório. Três experimentos foram conduzidos: (i) determinação da diluição ideal do biofungicida para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), (ii) avaliação da viabilidade microbiana após duas horas de exposição às misturas e (iii) análise quantitativa (pH, condutividade elétrica e temperatura) e qualitativa (flotação, sedimentação, formação de grumos e separação de fases) das caldas. Os resultados indicaram que a maioria das misturas manteve condições adequadas para a sobrevivência do agente de controle biológico, porém, algumas combinações, especialmente aquelas contendo glifosato, mancozebe, clorotalonil e acefato, apresentaram alterações significativas no crescimento de *Bacillus velezensis*, pH, condutividade elétrica e características visuais, como formação de grumos, sedimentação e separação de fases, sugerindo incompatibilidade. Estes achados evidenciam que a interação entre princípios ativos pode influenciar a compatibilidade biológica e físico-química, reforçando a importância de avaliações prévias de misturas para otimizar a eficácia do biofungicida e promover a sustentabilidade do manejo fitossanitário.

Palavras-chave: misturas de agroquímicos; compatibilidade físico-química; eficiência biológica; manejo integrado de doenças

ABSTRACT

GOMES, Karolline de Paula Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2025. **Evaluation of compatibility between a commercial biological product based on *Bacillus velezensis* and chemical pesticides in vitro.** Adviser: Franklin Jackson Machado. Co-adviser: Odair José Kuhn.

The use of biological agents, such as *Bacillus velezensis*, has gained prominence in integrated disease management, representing a sustainable alternative to chemical pesticides. However, the physicochemical and biological compatibility between biofungicides and agrochemicals is essential to ensure the effectiveness of tank-mix applications. This study evaluated, in vitro, (i) the compatibility of a commercial biological product based on *B. velezensis* with different groups of chemical pesticides, determining the impact of these mixtures on the growth and viability of the microorganism after two hours of exposure, and (ii) the physicochemical properties of the spray mixtures, aiming to identify potential changes that could compromise their stability and efficacy under laboratory conditions. Three experiments were conducted: (i) determination of the optimal dilution of the biofungicide for colony-forming unit (CFU) counts, (ii) assessment of microbial viability after two hours of exposure to the mixtures, and (iii) quantitative (pH, electrical conductivity, and temperature) and qualitative (flotation, sedimentation, clumping, and phase separation) analyses of the spray mixtures. The results indicated that most mixtures maintained conditions suitable for the survival of the biological control agent. However, some combinations, particularly those containing glyphosate, mancozeb, chlorothalonil, and acephate, caused significant changes in *Bacillus velezensis* growth, pH, electrical conductivity, and visual characteristics, such as clumping, sedimentation, and phase separation, suggesting incompatibility. These findings highlight that interactions between active ingredients can influence both biological compatibility and physicochemical stability, emphasizing the importance of prior evaluation of mixtures to optimize biofungicide efficacy and promote sustainable plant protection management.

Keywords: agrochemical mixtures; physicochemical compatibility; biological efficiency; integrated disease management

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	8
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1	Controle biológico e sua relevância na agricultura	9
2.1.1	Definição e princípios do controle biológico.....	9
2.1.2	Microrganismos	10
2.1.3	Vantagens e desafios do controle biológico em comparação aos defensivos químicos.....	12
2.2	Gênero <i>Bacillus</i> e sua aplicação na proteção de plantas	14
2.3	Compatibilidade de produtos biológicos e misturas de defensivos químicos	16
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Local do experimento	18
3.2	Tratamento das amostras	18
3.3	Preparo do meio de cultura	19
3.4	Diluição seriada	20
3.5	Avaliação da viabilidade de <i>Bacillus velezensis</i> em mistura com defensivos químicos in vitro.....	22
3.6	Análise das propriedades físico-químicas da calda	23
3.7	Delineamento experimental e análise estatística	24
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	Diluição seriada.....	25
4.2	Viabilidade de <i>Bacillus velezensis</i> em associação com defensivos químicos.....	27
4.3	Propriedades físico-químicas das caldas.....	32
4.3.1	Análise dos parâmetros quantitativos.....	32
4.3.2	Análise dos parâmetros qualitativos	34
5.	CONCLUSÕES.....	37
	REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A agricultura contemporânea enfrenta desafios cada vez mais complexos, especialmente no que se refere à sustentabilidade e à segurança alimentar, impulsionados pela necessidade de conciliar o aumento da produtividade com a mitigação dos impactos ambientais (Reis Duarte et al., 2025). Entre os fatores que ameaçam esse equilíbrio, as doenças de plantas se destacam por seu potencial de causar perdas expressivas em culturas de importância econômica global. Na soja, por exemplo, as perdas podem superar 30% da produção (Chang et al., 2017; Guo et al., 2021), enquanto no milho, a redução de produtividade pode variar de 10% a 80%, a depender das condições ambientais e da suscetibilidade das cultivares (Sousa; Bonfín; Lima, 2023).

Para mitigar esses impactos, o Manejo Integrado de Pragas e Doenças (MID) emerge como uma estratégia abrangente e sustentável. O MID preconiza a combinação de diversas táticas de controle, incluindo métodos biológicos, culturais, mecânicos, químicos e biotecnológicos, visando otimizar a eficácia do controle de doenças e minimizar a dependência de defensivos químicos sintéticos (Silva et al., 2024).

Historicamente, os fungicidas químicos têm sido a principal ferramenta no controle de doenças de plantas. No entanto, a crescente preocupação com os impactos ambientais e a saúde humana, bem como o surgimento de resistência a fungicidas em populações de fitopatógenos, têm impulsionado a busca por alternativas mais sustentáveis (Carmona-Hernandez et al., 2019; Santos, 2023). Nesse cenário, o controle biológico tem se consolidado como uma opção promissora, utilizando organismos vivos ou seus metabólitos para suprimir fitopatógenos.

Dentre os agentes de biocontrole, as bactérias do gênero *Bacillus* destacam-se pela sua versatilidade e eficácia. Caracterizadas por serem Gram-positivas, aeróbias ou facultativas anaeróbias, e pela capacidade de formar endósporos, as espécies de *Bacillus* exibem alta resistência a condições ambientais adversas (Zhou et al., 2021). Espécies como *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. velezensis* e *B. licheniformis* são reconhecidas por seu potencial no controle de diversos fitopatógenos e na promoção do crescimento vegetal (Barbieri, 2023).

Contudo, a prática comum de misturar produtos biológicos com defensivos químicos no mesmo tanque de pulverização, embora economicamente vantajosa, levanta questões cruciais sobre a compatibilidade e a manutenção da eficácia desses agentes biológicos (Conrad, 2022). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a interação entre microrganismos benéficos e agroquímicos pode ser complexa. Por exemplo, certos herbicidas, como o glifosato, podem afetar a viabilidade celular de espécies de *Bacillus*, embora a capacidade de biocontrole possa

ser mantida sob certas condições (Gonçalves, 2016). A complexidade dessas interações no ambiente agrícola, que envolvem variáveis como tempo de exposição, formulação dos defensivos e condições ambientais, reforça a necessidade de investigações aprofundadas.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a compatibilidade de um produto comercial biológico à base de *B. velezensis* com diferentes grupos de defensivos químicos, determinando o impacto dessas misturas no crescimento e na viabilidade do microrganismo após duas horas de exposição. Adicionalmente, foram analisadas as propriedades físico-químicas das caldas, visando identificar possíveis alterações que pudessem comprometer sua estabilidade e eficácia em condições de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Controle biológico e sua relevância na agricultura

O controle biológico tem se consolidado como uma estratégia para o manejo sustentável de doenças de plantas, baseando-se no uso de microrganismos vivos ou de seus metabólitos para suprimir a atividade de fitopatógenos (Lahlali et al., 2022; Collinge et al., 2022). Essa abordagem tem recebido crescente atenção devido à necessidade de sistemas produtivos mais sustentáveis e à busca por alternativas ao uso intensivo de defensivos químicos.

As doenças de plantas representam uma das principais causas de perdas agrícolas, podendo reduzir entre 20% e 40% da produção mundial (Savary et al., 2019). Nesse contexto, o controle biológico constitui um componente importante do manejo integrado de doenças, podendo ser aplicado em diferentes fases do ciclo produtivo, incluindo o tratamento de sementes, aplicações via solo e aplicações foliares (Collinge et al., 2022; Etesami; Jeong; Glick, 2023).

Além da supressão direta de patógenos, os agentes de biocontrole podem contribuir para a estabilidade microbiológica do sistema produtivo, favorecendo a sanidade das plantas e o equilíbrio do agroecossistema (Etesami; Jeong; Glick, 2023).

2.1.1 Definição e princípios do controle biológico

O controle biológico de doenças de plantas foi definido como o uso de microrganismos vivos ou de seus metabólitos para suprimir a atividade de fitopatógenos, baseando-se nas interações naturais entre microrganismos e patógenos vegetais, por meio de mecanismos como competição, antibiose e parasitismo (Cook & Baker, 1983). Posteriormente, verificou-se que agentes de biocontrole, especialmente espécies de *Trichoderma*, podem atuar não apenas na

supressão de patógenos, mas também na promoção do crescimento vegetal e na ativação de respostas de defesa das plantas (Harman, 2000).

O conceito foi então ampliado para incluir o uso de organismos vivos na redução dos efeitos dos patógenos sobre as plantas, enfatizando o caráter ecológico dessas interações (Eilenberg; Hajek; Lomer, 2001), sendo posteriormente descrito como uma estratégia complementar aos métodos convencionais de controle (Fravel, 2005).

Estudos recentes detalharam os principais mecanismos envolvidos, incluindo a produção de metabólitos antimicrobianos, competição por nutrientes e espaço e micoparasitismo (Etesami; Jeong; Glick, 2023; Barbieri, 2023). Além disso, muitos agentes de biocontrole podem induzir resistência sistêmica nas plantas, ativando vias de defesa associadas a compostos sinalizadores como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, mecanismo descrito para microrganismos como espécies de *Bacillus* e *Trichoderma* (Collinge et al., 2022; Barbieri, 2023).

Atualmente, o controle biológico é considerado uma alternativa sustentável para o manejo de doenças, reduzindo a dependência de defensivos químicos e podendo ser integrado a outras práticas de manejo (Lahlali et al., 2022; Etesami; Jeong; Glick, 2023; Santos, 2023; Silva et al., 2024). Seu sucesso depende da capacidade de sobrevivência e adaptação dos microrganismos ao ambiente, sendo a seleção de isolados e o desenvolvimento de formulações fatores importantes para sua eficácia em campo (Russi, 2024).

2.1.2 Microrganismos

O sucesso do controle biológico de doenças de plantas está diretamente associado à escolha e aplicação de microrganismos eficazes, capazes de atuar por diferentes mecanismos sobre os patógenos vegetais. Ao longo das últimas décadas, diversos gêneros microbianos foram estudados, selecionados e incorporados em produtos comerciais, tanto no Brasil quanto em outros países, consolidando-se como ferramentas fundamentais para o manejo fitossanitário sustentável. Esses microrganismos podem pertencer a grupos bacterianos (incluindo actinobactérias), fúngicos e, em menor escala, virais, sendo aplicados principalmente no solo, nas sementes ou na parte aérea das plantas.

Entre os microrganismos mais utilizados globalmente destacam-se os fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Clonostachys*, e as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Burkholderia* (Collinge et al., 2022; Etesami; Jeong; Glick, 2023). No Brasil, o destaque é para *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp., que dominam o mercado de biofungicidas,

sendo amplamente utilizados em culturas como soja, milho, tomate, algodão e hortaliças (Barbieri, 2023; Santos, 2023).

O gênero *Bacillus*, especialmente as espécies *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. velezensis*, tem se mostrado altamente eficaz no controle de uma ampla gama de fitopatógenos, como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinerea*. Esses bacilos gram-positivos produtores de endósporos produzem uma variedade de compostos antimicrobianos, incluindo lipopeptídeos como surfactinas, fengicinas e iturinas, que atuam na inibição do crescimento micelial, destruição da membrana celular dos patógenos e bioestimulação das defesas da planta (Félix, 2023; Keshmirshekan; Mesquita; Ventura, 2024). Além disso, sua capacidade de formar endósporos confere maior estabilidade às formulações comerciais, favorecendo sua viabilidade sob diferentes condições ambientais (Russi, 2024).

Já o gênero *Trichoderma* é amplamente reconhecido por sua atuação como fungo micoparasítico, além de estimular o crescimento vegetal e induzir resistência sistêmica. Espécies como *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. virens* são eficazes no controle de doenças radiculares e foliares causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotinia*, entre outros. Esses fungos agem por enovelamento e penetração das hifas dos patógenos, pela produção de enzimas como quitinases e glucanases, e pela liberação de metabólitos voláteis e não voláteis (difusíveis) com ação antifúngica (Barbieri, 2023; Santos, 2023).

Outro gênero relevante é *Pseudomonas*, especialmente *P. fluorescens*, conhecida por seu papel em solos supressivos e por sua habilidade em competir por ferro por meio da produção de sideróforos, além da emissão de antibióticos como a 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) (DAPG). Embora sua aplicação comercial ainda seja limitada no Brasil, *Pseudomonas* apresenta utilização comercial em diferentes países, com vários produtos registrados, especialmente na Europa e nos Estados Unidos no controle de doenças bacterianas e fúngicas em hortaliças, cereais e frutíferas (Collinge et al., 2022; Etesami; Jeong; Glick, 2023).

O gênero *Streptomyces*, pertencente ao grupo das actinobactérias, tem ganhado notoriedade pelo seu potencial de produção de antibióticos de amplo espectro e enzimas degradativas. Algumas espécies, como *S. griseus* e *S. lydicus*, são eficazes contra patógenos de solo e pós-colheita, e já são utilizadas em formulações comerciais para o tratamento de sementes e substratos, sobretudo em sistemas de produção orgânica (Lahlali et al., 2022).

Além desses, microrganismos como *Clonostachys rósea*, *Burkholderia cepacia* e leveduras do gênero *Saccharomyces* também são empregados em nichos específicos, como o controle de doenças em pós-colheita e o manejo de patógenos em ambientes protegidos (Collinge et al., 2022; Santos, 2023).

No Brasil, o mercado de agentes de controle biológico tem se expandido de forma expressiva, impulsionado por políticas públicas, avanços na pesquisa e maior aceitação por parte dos produtores. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mais de 50% dos produtos registrados com ação fitossanitária biológica no país são destinados ao controle de doenças, com predominância das formulações à base de *Bacillus* e *Trichoderma* (Barbieri, 2023).

Com o avanço das tecnologias genômicas e das ferramentas de biologia molecular, observa-se uma tendência crescente na seleção de cepas microbianas mais eficientes e com múltiplos mecanismos de ação. Além disso, o desenvolvimento de formulações contendo consórcios microbianos tem sido explorado como estratégia para aumentar a robustez, a estabilidade e a amplitude dos efeitos protetores sobre as plantas, contribuindo para a maior eficiência dos agentes de controle biológico (Collinge et al., 2022; Etesami; Jeong; Glick, 2023).

2.1.3 Vantagens e desafios do controle biológico em comparação aos defensivos químicos

O controle biológico de doenças de plantas, por meio da aplicação de biofungicidas à base de microrganismos vivos ou de seus metabólitos, tem emergido como uma alternativa promissora aos defensivos químicos convencionais. Essa estratégia integra os princípios da agricultura sustentável, promovendo o manejo fitossanitário com menor impacto ambiental, sem comprometer a produtividade das culturas. No entanto, embora apresente inúmeras vantagens, também enfrenta desafios que ainda limitam sua adoção em larga escala no Brasil e no mundo.

Entre as principais vantagens do controle biológico destaca-se, em primeiro lugar, sua baixa toxicidade ambiental. Biofungicidas, ao contrário dos fungicidas sintéticos, geralmente não deixam resíduos tóxicos no ambiente, nos alimentos ou na água, sendo compatíveis com a agricultura orgânica e com os princípios da saúde única (One Health) (Collinge et al., 2022; Barbieri, 2023). Essa característica tem impulsionado a aceitação dos produtos biológicos por parte dos consumidores e dos mercados internacionais, especialmente na União Europeia, onde há severas restrições à presença de resíduos químicos em produtos agrícolas.

Outra vantagem dos agentes de biocontrole é o seu modo de ação relativamente seletivo em comparação aos defensivos químicos convencionais, podendo reduzir populações de fitopatógenos com menor impacto sobre a microbiota benéfica do solo e da planta. Esse fator pode contribuir para a manutenção do equilíbrio microbiano associado às culturas e favorecer

a saúde do solo e o desempenho fisiológico das plantas (Etesami; Jeong; Glick, 2023; Santos, 2023). Além disso, diversos microrganismos utilizados como agentes de controle biológico apresentam efeitos multifuncionais, atuando não apenas na supressão de patógenos, mas também na promoção do crescimento vegetal e na indução de resistência sistêmica (Félix, 2023; Russi, 2024).

Do ponto de vista da resistência, os biofungicidas apresentam risco significativamente reduzido de seleção de patógenos resistentes. Isso se deve, em grande parte, ao fato de que muitos microrganismos atuam por múltiplos mecanismos de ação, como antibiose, competição e micoparasitismo, dificultando a adaptação dos patógenos (Collinge et al., 2022). Em contraste, os fungicidas químicos geralmente possuem modos de ação específicos e repetitivos, o que acelera a seleção de mutações nos patógenos-alvo, como observado em populações de *Fusarium*, *Alternaria* e *Botrytis* resistentes a triazóis e estrobilurinas (Lahlali et al., 2022).

Contudo, o controle biológico ainda enfrenta desafios importantes que limitam sua adoção generalizada. Um dos principais entraves é a variabilidade de desempenho em campo, que pode ser afetada por fatores ambientais como temperatura, umidade, radiação solar, pH do solo e presença de antagonistas nativos. Muitos agentes biológicos apresentam elevada eficácia *in vitro*, mas perdem atividade sob condições adversas em campo (Santos, 2023; Silva et al., 2024). Essa instabilidade representa uma limitação prática frente à previsibilidade oferecida pelos fungicidas sintéticos.

Outro obstáculo relevante é a vida útil reduzida e a exigência de armazenamento adequado dos produtos biológicos. Microrganismos vivos requerem cuidados quanto à temperatura e umidade para manter sua viabilidade, o que pode dificultar a logística de distribuição e armazenamento, especialmente em regiões tropicais como o Brasil (Félix, 2023). Adicionalmente, muitos biofungicidas apresentam ação preventiva, com baixa efetividade curativa, exigindo aplicação antecipada à infecção do patógeno. Essa característica contrasta com diversos fungicidas químicos que possuem ação sistêmica e curativa, sendo capazes de conter o avanço da doença mesmo após o início da infecção (Etesami; Jeong; Glick, 2023). Por isso, o controle biológico costuma demandar monitoramento contínuo e aplicação criteriosa, o que exige capacitação técnica por parte dos produtores e consultores agrícolas.

Outro desafio está relacionado ao registro e regulamentação dos produtos biológicos. Embora o Brasil tenha avançado significativamente com o marco regulatório e a criação do Programa Nacional de Bioinsumos em 2020 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Vidal et al. 2021), ainda há gargalos burocráticos e técnicos que retardam a entrada

de novos produtos no mercado e a aprovação de cepas com potencial comprovado (Barbieri, 2023).

Em síntese, o controle biológico de doenças de plantas apresenta um potencial expressivo como estratégia sustentável, mas sua eficácia plena depende da superação de desafios técnicos, comerciais e logísticos. A combinação racional de biofungicidas com fungicidas químicos compatíveis, dentro de programas de manejo integrado de doenças (MID), representa atualmente uma das abordagens mais eficazes para aliar produtividade e sustentabilidade em sistemas agrícolas modernos.

2.2 Gênero *Bacillus* e sua aplicação na proteção de plantas

O gênero *Bacillus* compreende bactérias Gram-positivas, aeróbias ou facultativas anaeróbias, formadoras de endósporos, amplamente distribuídas no solo e na rizosfera. A formação de endósporos confere elevada resistência a condições ambientais adversas, permitindo a sobrevivência prolongada e favorecendo o desenvolvimento de formulações comerciais estáveis (Keshmirshekan; Mesquita; Ventura, 2024; Barbieri, 2023).

Espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheni* formis e *B. velezensis*, são amplamente utilizadas em biofungicidas comerciais devido à colonização eficiente da rizosfera, supressão de patógenos e efeitos promotores de crescimento vegetal, além da capacidade de atuar por múltiplos mecanismos contra os patógenos, proporcionando uma barreira complexa e eficaz de proteção (Etesami; Jeong; Glick, 2023; Santos, 2023; Barbieri, 2023).

Dentre essas, *B. velezensis* é uma espécie do complexo *B. subtilis*, inicialmente classificada como uma variante de *B. amyloliquefaciens*, foi posteriormente reconhecida como uma espécie distinta com base em análises genômicas e filogenômicas. Trata-se de uma bactéria rizosférica com amplo potencial para aplicação no controle biológico de doenças de plantas, destacando-se por sua capacidade de produção de lipopeptídeos, atuação como bioestimulante e adaptação a diferentes condições ambientais (Keshmirshekan; Mesquita; Ventura, 2024; Etesami; Jeong; Glick, 2023).

Essa espécie é particularmente eficaz contra patógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Phytophthora* spp., graças à sua capacidade de sintetizar compostos como surfactina, fengicina e bacilomicinas, que possuem ação direta sobre membranas celulares fúngicas, causando sua desorganização e lise (Félix, 2023; Barbieri, 2023). A iturina, que causa poros nas membranas fúngicas; fengicina, que promove ruptura e apoptose celular; e surfactina, que além de ação antifúngica atua como

agente tensoativo, favorecendo a colonização da rizosfera e a dispersão bacteriana. Esses metabólitos atuam de forma sinérgica, garantindo ampla eficácia contra patógenos esses parógenos, enquanto antibióticos peptídicos produzidos pela espécie, como bacilomicinas e difficidina, conferem adicional ação bactericida e fungicida (Félix, 2023; Barbieri, 2023; Keshmirshakan; Mesquita; Ventura, 2024).

Além do controle direto, *B. velezensis* é capaz de ativar a resistência sistêmica induzida (RSI) nas plantas. Ao colonizar a rizosfera ou tecidos superficiais, a bactéria desencadeia sinais bioquímicos que ativam vias hormonais de defesa, como ácido jasmônico (JA), etileno (ET) e, em menor grau, ácido salicílico (SA). Isso resulta na produção de proteínas de defesa (PR-proteínas), lignificação de paredes celulares e acúmulo de compostos fenólicos e peroxidases, fortalecendo a planta contra infecções subsequentes. A RSI promovida por *B. velezensis* tem sido observada em culturas como soja, pimentão, morangueiro e tomate (Russi, 2024; Santos, 2023).

Outro diferencial de *B. velezensis* é a sua alta eficiência na formação de biofilmes e na colonização da rizosfera, características que aumentam sua persistência no ambiente agrícola e sua capacidade de competir com patógenos do solo. A formação de biofilmes, aliada à produção de sideróforos, também favorece a mobilização de nutrientes essenciais, como ferro e fósforo, tornando esse microrganismo um agente promotor de crescimento além de protetor fitossanitário (Russi, 2024; Keshmirshakan; Mesquita; Ventura, 2024).

No contexto comercial, o *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* são responsáveis por grande parte dos biofungicidas registrados no Brasil, seguidos por *B. pumilus* e, mais recentemente, por *B. velezensis*, que desponta como uma das espécies com maior potencial de inovação tecnológica (Barbieri, 2023; MAPA, 2023). Esta última tem sido estudada para formulações líquidas e em pó molhável destinadas ao tratamento de sementes e aplicação no sulco de plantio. Essas formulações têm demonstrado resultados promissores em ensaios com soja, milho, hortaliças e frutíferas, tanto na supressão de doenças quanto na promoção de crescimento (Félix, 2023; Barbieri, 2023).

Embora a promoção de crescimento não seja um mecanismo de controle direto, reforça a tolerância das plantas a estresses bióticos, uma vez que a espécie solubiliza fosfatos, fixa nitrogênio e sintetiza fitormônios como ácido indolacético (AIA), melhorando a estrutura da raiz e a absorção de nutrientes (Félix, 2023; Keshmirshakan; Mesquita; Ventura, 2024).

A espécie também se destaca por seu perfil de segurança ambiental, sem efeitos negativos sobre a fauna edáfica e a microbiota nativa, tornando-a compatível com sistemas de produção orgânica e integrando-se a programas de manejo sustentável e às diretrizes globais de redução

do uso de defensivos químicos (Collinge et al., 2022). Diante de suas características genéticas, fisiológicas e funcionais, *B. velezensis* é considerada um dos microrganismos mais promissores para proteção biológica de plantas, refletindo a tendência global de substituir produtos sintéticos por tecnologias baseadas em microrganismos eficientes, seguros e multifuncionais.

No cenário internacional, produtos comerciais à base de *Bacillus* spp., como Serenade® (*B. subtilis* QST 713), Taegro® (*B. amyloliquefaciens*) e Double Nickel® (*B. amyloliquefaciens* D747), estão consolidados no manejo de doenças foliares, de solo e pós-colheita em diversas culturas. Entretanto, desafios persistem, incluindo padronização de protocolos de produção, formulação e avaliação de eficácia em campo, além da variabilidade de desempenho das cepas em diferentes solos e culturas, exigindo seleção criteriosa de isolados (Félix, 2023; Silva et al., 2024). No Brasil, a regulamentação e programas como o Programa Nacional de Bioinsumos (2020) têm favorecido a expansão do setor, promovendo pesquisa, capacitação e aceitação por produtores, consolidando *Bacillus* spp. como componente central da agricultura sustentável.

2.3 Compatibilidade de produtos biológicos e misturas de defensivos químicos

A prática da mistura de tanque entre produtos biológicos e defensivos químicos tem se intensificado na agricultura moderna como estratégia para otimizar recursos, reduzir custos operacionais e ampliar o espectro de controle fitossanitário. Entretanto, essa integração exige cautela, pois os agroquímicos podem afetar negativamente a viabilidade, estabilidade e funcionalidade de microrganismos benéficos, como os utilizados no controle biológico de doenças de plantas (Félix, 2023; Santos, 2023).

No caso dos produtos à base de *Bacillus* spp., especialmente *B. velezensis*, os estudos apontam que a formação de endósporos confere relativa resistência às misturas com defensivos químicos. No entanto, a compatibilidade é variável e depende do tipo de agroquímico, concentração, tempo de exposição e formulação. Ensaio laboratoriais demonstraram que a mistura com certos fungicidas, como piraclostrobina e azoxistrobina + ciproconazol (Comet® e Priori Xtra®), pode reduzir a viabilidade celular de *Bacillus*, mesmo após curtos períodos de exposição, principalmente em formulações líquidas (Halfeld-Vieira; Santos, 2018).

Além da viabilidade, a eficácia biológica dos produtos misturados também deve ser considerada. Estudos demonstraram que diferentes cepas de *Bacillus velezensis* podem produzir lipopeptídeos, como iturinas e fengicinas, que exercem forte antagonismo contra fungos fitopatogênicos (Pezarini Baptista et al., 2022; Puche et al., 2025; Cao et al., 2018). Ensaio in vitro mostraram inibição significativa de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* por isolados de *B. velezensis*, atribuída à produção desses metabólitos secundários, sugerindo que

formulações ou misturas que interfiram na síntese ou ação dos lipopeptídeos podem reduzir a eficácia biológica do produto (Puche et al., 2025).

No que se refere aos inseticidas, Halfeld-Vieira e Santos (2018) avaliaram a compatibilidade de *Bacillus aryabhattai* com o inseticida fipronil (Regent 800 WG) e constataram que o microrganismo permaneceu viável por até 24 horas após exposição ao produto. Embora o estudo não tenha sido feito com *B. velezensis*, ele sugere que o gênero *Bacillus*, de forma geral, pode apresentar boa tolerância a alguns inseticidas, desde que haja avaliação técnica prévia.

Quanto aos herbicidas, Gonçalves (2016) investigou os efeitos do glifosato sobre *B. subtilis* e relatou que, embora o herbicida tenha reduzido a taxa de crescimento e a viabilidade celular da bactéria, sua atividade de biocontrole contra *Fusarium* spp. foi preservada. Isso sugere que, mesmo sob estresse químico, o microrganismo pode manter sua funcionalidade, especialmente quando bem adaptado ao ambiente rizosférico.

Além dos efeitos diretos, as misturas podem alterar o pH da calda, a solubilidade dos ingredientes ativos e a estabilidade da formulação, influenciando a compatibilidade microbiológica (Rakes et al., 2017). Halfeld-Vieira e Santos (2018) demonstraram que a viabilidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi comprometida quando misturado à piraclostrobina, mas não ao fipronil, destacando o papel do ingrediente ativo e da exposição prolongada na estabilidade das interações.

Com relação à eficácia das misturas, é importante destacar que a simples sobrevivência do microrganismo não garante seu desempenho funcional. Etesami, Jeong e Glick (2023) apontam que *B. velezensis* pode apresentar redução na síntese de compostos antimicrobianos em determinadas combinações químicas, o que afeta diretamente seu desempenho no controle de doenças.

Dessa forma, a compatibilidade entre produtos biológicos e defensivos químicos deve ser avaliada caso a caso, considerando variáveis como tempo de exposição, tipo de formulação, pH e ingredientes inertes. Estratégias como aplicações sequenciais ou tratamentos diferenciados (por exemplo, biológicos via sementes e químicos via foliar) são recomendadas para evitar antagonismos e garantir o desempenho agrônomo de ambos os produtos (Félix, 2023; Santos, 2023; Silva et al., 2024).

Portanto, embora o uso conjunto de produtos biológicos e defensivos químicos possa resultar em sinergias benéficas, é fundamental que a compatibilidade seja verificada com base em ensaios técnicos padronizados, incluindo não apenas a viabilidade celular, mas também a manutenção da atividade funcional do microrganismo, como antibiose, indução de resistência

e colonização da rizosfera. Somente com essa abordagem será possível integrar de forma segura e eficaz os bioinsumos nos sistemas modernos de manejo fitossanitário

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O estudo *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), campus Marechal Cândido Rondon, localizado na região Oeste do Estado do Paraná (24°33'28"S 54°02'56"W).

3.2 Tratamento das amostras

O experimento avaliou a interação entre um biofungicida foliar e seis defensivos químicos pertencentes a diferentes grupos, selecionados com base na sua relevância agronômica e ampla utilização em sistemas de produção agrícola.

O biofungicida empregado neste estudo foi o produto comercial Frontier Control, desenvolvido pela empresa Simbiose, que tem como ingrediente ativo a cepa Labin 40 da espécie *B. velezensis*. A escolha deste produto baseou-se em sua crescente utilização no mercado e no reconhecido potencial de *B. velezensis* como agente de biocontrole.

Os defensivos químicos selecionados incluíram dois herbicidas: Roundup Original Mais (glifosato; 48% do ingrediente ativo [i.a.]; Bayer) e Select 240 EC (cletodim; 24% i.a.; UPL); dois fungicidas: Unizeb Gold 750 WG (mancozebe; 75% i.a.; UPL) e Bravonil 720 SC (clorotalonil; 72% i.a.; Syngenta); e dois inseticidas: Perito 970 SG (acefato; 97% i.a.; UPL) e Benfentrina 100 EC (bifentrina; 10% i.a.; Nortox).

A preparação das caldas em todos os experimentos realizados neste estudo seguiu uma sequência de mistura padronizada, definida com base nas características físico-químicas das formulações, a fim de evitar reações indesejadas, como a formação de precipitados. Primeiramente, foram diluídos os defensivos sólidos: mancozebe, classificado como grânulo dispersível em água (WG), seguido por acefato, um grânulo solúvel (SG). Na sequência, adicionou-se o clorotalonil, uma suspensão concentrada (SC). Após a completa dispersão desses produtos, foram incorporados os concentrados emulsionáveis (EC): inicialmente a bifentrina, seguida do cletodim. Por fim, completou-se a mistura com o glifosato, um concentrado solúvel (SL).

Esses produtos foram testados em combinação com o biofungicida, tanto individualmente quanto em misturas múltiplas (Tabela 1), simulando o uso prático em campo, onde as misturas em tanque são amplamente empregadas para otimizar recursos e racionalizar

operações. Para garantir a aplicabilidade dos resultados, todas as caldas foram preparadas utilizando as doses máximas recomendadas pelos fabricantes, água destilada como diluente e considerando um volume padrão de aplicação de 150 L/ha.

Tabela 1. Tratamentos utilizados para a avaliação *in vitro* da compatibilidade entre *Bacillus velezensis* e defensivos químicos.

Tratamento	Misturas ¹	Concentração
T1	AGD	1 L/há
T2	BAC	4,5 L/ha + 4 L/há
T3	GLI + BAC	1 L/ha + 4 L/há
T4	CLE + BAC	3 Kg/ha + 4 L/há
T5	MAN + BAC	2L/ha + 4 L/há
T6	CLO + BAC	1200 g/ha + 4 L/há
T7	ACE + BAC	1200 mL/ha + 4 L/ha
T8	BIF + BAC	4,5 L/ha + 1 L/ha + 4 L/ha
T9	GLI + CLE + BAC	3 Kg/ha + 2L/ha + 4 L/ha
T10	MAN + CLO + BAC	1200 g/ha + 1200 mL/ha + 4 L/ha
T11	ACE + BIF + BAC	1200 g/ha + 3 Kg/ha + 4 L/ha
T12	ACE + MAN + BAC	1200 g/ha + 2L/ha + 4 L/ha
T13	ACE + CLO + BAC	1200 mL/ha + 3 Kg/ha + 4 L/ha
T14	BIF + MAN + BAC	1200 mL/ha + 2L/ha + 4 L/ha
T15	BIF + CLO + BAC	4,5 L/ha + 1200 g/ha + 4 L/ha
T16	GLI + ACE + BAC	4,5 L/ha + 1200 mL/ha + 4 L/ha
T17	GLI + BIF + BAC	1 L/ha + 1200 g/ha + 4 L/ha
T18	CLE + ACE + BAC	1 L/ha + 1200 mL/ha + 4 L/ha
T19	CLE + BIF + BAC	3 Kg/ha + 4,5 L/ha + 4 L/ha
T20	MAN + GLI + BAC	2L/ha + 4,5 L/ha + 4 L/ha
T21	CLO + GLI + BAC	3 Kg/ha + 1 L/ha + 4 L/ha
T22	MAN + CLE + BAC	2L/ha + 1 L/ha + 4 L/ha
T23	CLO + CLE + BAC	3 Kg/ha + 1 L/ha + 4 L/ha

¹Caldas contendo água deionizada (AGD), *Bacillus velezensis* (BAC), glifosato (GLI), cletodim (CLE), mancozebe (MAN), clorotalonil (CLO), acefato (ACE) e bifentrina (BIF). Os tratamentos consistem em aplicações individuais ou combinações de defensivos com *Bacillus velezensis*.

3.3 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado para suprir os nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento de *B. velezensis*, presente no biofungicida avaliado neste estudo, foi o Nutriente Agar. A preparação do meio seguiu rigorosamente as instruções do fabricante,

realizando-se a diluição de 28 g do produto comercial Nutrient Agar ISO em 1000 mL de água destilada. Para garantir a dissolução completa do meio, a solução foi submetida a sucessivos ciclos de aquecimento em forno de micro-ondas, até que não houvesse mais vestígios de partículas sólidas. Posteriormente, o meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm por 20 minutos, com o objetivo de eliminar possíveis contaminantes. Ainda em estado líquido, aproximadamente 20 mL do meio foram vertidos em placas de Petri previamente esterilizadas, assegurando uma distribuição homogênea adequada ao crescimento uniforme das colônias bacterianas.

Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por uma noite, permitindo a secagem do meio e a verificação de sua esterilidade. As placas preparadas foram então armazenadas sob refrigeração a 4°C por até sete dias.

3.4 Diluição seriada

Para a determinação da concentração adequada do biofungicida que permitisse a contagem precisa das unidades formadoras de colônias (UFC) de *B. velezensis*, foi adotado o método de diluições seriadas, conforme descrito por Bettiol et al. (2022). O processo iniciou-se com a aclimação da amostra contendo o biofungicida à temperatura ambiente durante um período de 30 minutos.

Para o estabelecimento do controle negativo, foi utilizado 0,1 mL de solução salina estéril (diluyente), que foi transferida para uma placa de Petri contendo o meio de cultura previamente solidificado. A amostra foi então distribuída uniformemente sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça de *Drigalski* esterilizada, a fim de verificar a ausência de contaminação e validar as condições assépticas do processo.

Conforme demonstrado na figura 1, as diluições foram preparadas em tubos de ensaio estéreis de 15 mL. A primeira diluição (10^{-1}) foi obtida pela adição de 1 mL do biofungicida em 9 mL de solução salina estéril, totalizando 10 mL de solução. A partir dessa diluição inicial, procedeu-se à realização de uma série de diluições em base 10. Para cada etapa, 1 mL da solução do tubo anterior foi transferido para um novo tubo contendo 9 mL de solução salina estéril. Esse processo foi repetido sucessivamente até se atingir a diluição 10^{-14} . Antes e após cada transferência, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado por 10 segundos em agitador tipo vortex, a 200 rpm, garantindo a dispersão uniforme das células viáveis na solução.

Para a determinação da concentração mínima de células viáveis presentes no biofungicida, foi empregada a técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*). Essa metodologia consiste na inoculação de 0,1 mL de cada diluição decimal no centro de placas de

Petri contendo o meio de cultura previamente esterilizado e solidificado. O inóculo foi distribuído uniformemente sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça de *Drigalski* esterilizada, garantindo cobertura completa e homogênea da superfície. Todo o procedimento foi conduzido em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas.

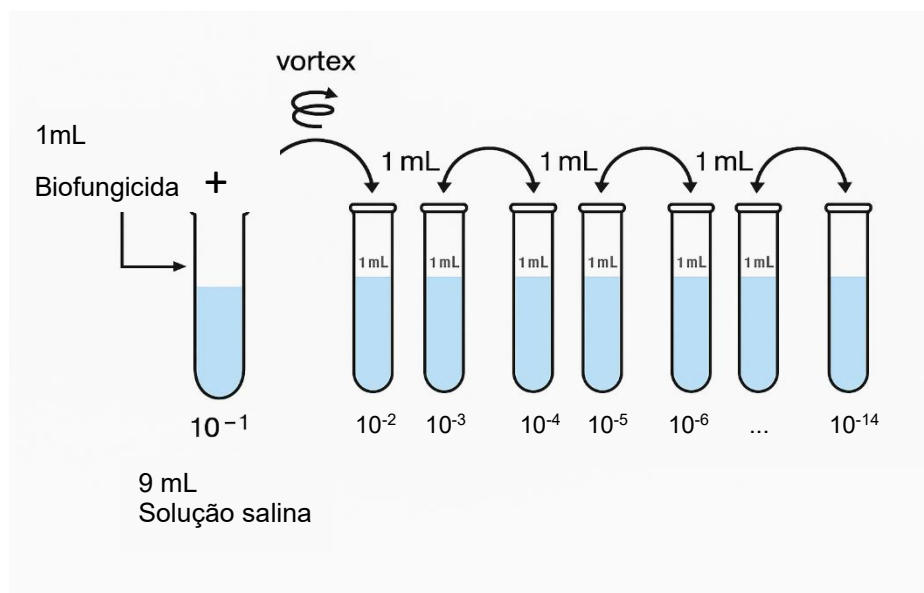


Figura 1. Representação esquemática do processo de diluição seriada decimal, utilizado para determinação da concentração viável de *Bacillus velezensis* presente no biofungicida comercial. A primeira diluição (10^{-1}) foi obtida pela adição de 1 mL da amostra do biofungicida a 9 mL de solução salina estéril. A partir desta, realizaram-se diluições sucessivas em base 10 até atingir a diluição 10^{-14} .

Após a absorção do inóculo pelo meio, as placas foram incubadas em estufa tipo B.O.D., a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, no escuro, por um período de 17 a 24 horas, até que as colônias se tornassem visíveis e aptas à contagem.

Concluído o período de incubação, procedeu-se à contagem das UFC com o auxílio de uma lupa e iluminação artificial, selecionando-se a diluição que apresentou entre 30 e 300 colônias individualizadas por placa. A população celular (PC) foi então calculada por meio da seguinte equação (Bettioli, 2022):

$$PC = NC \times 10 / D$$

Onde:

- PC: população celular obtida (UFC/mL);
- NC: número de colônias contadas;

- D: diluição em que foi realizada a contagem das colônias.

3.5 Avaliação da viabilidade de *Bacillus velezensis* em mistura com defensivos químicos *in vitro*

O ensaio de compatibilidade *in vitro* entre *B. velezensis* e defensivos químicos foi conduzido com o objetivo de avaliar o impacto de diferentes ingredientes ativos sobre a viabilidade do agente biológico de controle, simulando condições práticas de mistura em tanque.

Para cada tratamento, foram preparados 25 mL de calda em tubos de ensaio estéreis, conforme descrito no tópico 3.2, respeitando-se a ordem padronizada de adição dos produtos, estabelecida com base nas características físico-químicas das formulações. Ao final da preparação das caldas contendo os defensivos químicos, foi adicionada a alíquota correspondente ao biofungicida à base de *B. velezensis*. As misturas foram homogeneizadas em agitador tipo vórtex por 10 segundos a 200 rpm, assegurando a incorporação uniforme do biofungicida às soluções.

Na sequência, as caldas foram mantidas em repouso por duas horas, em temperatura ambiente, simulando o intervalo médio entre o preparo e a aplicação da calda em campo. Esse procedimento teve por finalidade reproduzir o tempo de exposição do agente biológico aos ingredientes ativos dos defensivos químicos no interior do tanque de pulverização, condição que pode influenciar negativamente a viabilidade do agente biológico.

Decorrido esse período, as caldas foram novamente homogeneizadas por 10 segundos e submetidas a diluições decimais seriadas até a concentração final de 10^{-6} , utilizando-se água deionizada como diluente. Esse procedimento seguiu o protocolo metodológico previamente descrito no tópico 3.4. A escolha da diluição 10^{-6} fundamentou-se nos resultados obtidos no referido experimento, o qual demonstrou que tal concentração permite a quantificação precisa e confiável das UFCs, mesmo diante de potenciais efeitos deletérios provocados pelos defensivos testados.

A quantificação da sobrevivência bacteriana, bem como os procedimentos de inoculação, incubação e contagem das UFC, seguiram a mesma metodologia descrita anteriormente no tópico 3.4. O uso dessa abordagem padronizada assegurou a comparabilidade dos dados obtidos entre os tratamentos e garantiu a reprodutibilidade dos resultados.

Os dados gerados foram comparados aos controles positivo (biofungicida) e negativo (água deionizada), permitindo a identificação de eventuais efeitos adversos das formulações químicas sobre a viabilidade do agente biológico.

3.6 Análise das propriedades físico-químicas da calda

A compatibilidade físico-química entre o biofungicida e diferentes defensivos químicos foi avaliada conforme normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) seguindo a norma NBR 13875 de 2014, que regulamenta o estudo de compatibilidade físico-química de agrotóxicos e afins, estabelecendo os testes a serem realizados e orientando quanto a sequência correta de incorporação dos produtos nas caldas, e os parâmetros a serem avaliados para identificação de possíveis alterações na homogeneidade das misturas (ABNT, 2014; Freitas, 2021).

A NBR 13875 determina que a avaliação da compatibilidade físico-química de agrotóxicos e afins deve ser feita por meio de dois testes: estático e dinâmico (ABNT, 2014). Neste trabalho, optou-se por realizar exclusivamente o teste estático, que consiste em manter as caldas em repouso durante um determinado período, simulando o intervalo entre o preparo e a aplicação em campo. A fim de observar eventuais instabilidades físicas que podem surgir da interação entre os componentes da mistura.

As caldas foram preparadas em frascos Erlenmeyer previamente higienizados com solução de ácido clorídrico 1 mol/L, enxaguados com água destilada e secos à temperatura ambiente. Utilizou-se água deionizada como diluente, fixando-se o volume total da calda em 200 mL por unidade experimental. Os defensivos com formulações sólidas, como grânulo dispersível em água (WG) e grânulo solúvel (SG), foram previamente pesados em balança analítica de precisão (0,001 g) e acondicionados em papel alumínio até o momento do uso. Os produtos líquidos foram medidos no momento da preparação utilizando pipetas graduadas com ponteiros estéreis.

A ordem de adição dos produtos seguiu o procedimento padronizado estabelecido no tópico 3.2, com base nas propriedades físico-químicas das formulações. Inicialmente, foram preparadas as caldas contendo apenas os defensivos químicos, com agitação manual após cada adição para garantir a dispersão adequada. Essas soluções permaneceram em repouso, à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), durante duas horas, simulando o intervalo habitual entre o preparo da calda e sua aplicação em campo.

Após esse período, foi realizada a primeira avaliação físico-química (T0). Em seguida, adicionou-se a alíquota correspondente ao biofungicida à base de *B. velezensis*, as caldas foram novamente homogeneizadas manualmente e mantidas em repouso por mais duas horas. Ao final (T1), as análises físico-químicas foram repetidas para verificar o efeito da adição do agente biológico sobre a estabilidade da calda.

As avaliações quantitativas foram realizadas com equipamentos previamente calibrados. A condutividade elétrica foi determinada com condutivímetro digital da marca Akso, modelo AK53, o potencial hidrogeniônico (pH) com pHmetro de bancada da mesma marca, modelo AK110 e a temperatura com termômetro digital acoplado ao condutivímetro. Para cada atributo, realizaram-se duas medições por unidade experimental, sendo os resultados expressos como valores médios.

As avaliações visuais das caldas foram conduzidas com base na observação da presença (+) ou ausência (-) de alterações físicas nas caldas. Misturas que apresentaram aparência homogênea, ausência de precipitação e estabilidade nos parâmetros físicos foram consideradas compatíveis. Por outro lado, aquelas que evidenciaram instabilidade, como decantação, floculação, formação de grumos, pasta, agregados ou cristais, além de formação de espuma após agitação vigorosa por 30 segundos, foram classificadas como incompatíveis. Para facilitar a detecção de partículas sólidas e materiais não dissolvidos, utilizou-se uma peneira metálica com malha de 500 mesh.

3.7 Delineamento experimental e análise estatística

Foram conduzidos três experimentos distintos neste estudo. O primeiro, referente à avaliação da concentração ideal do biofungicida para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 15 tratamentos representando diferentes diluições decimais na base 10 do biofungicida. Cada unidade experimental correspondeu a uma placa de Petri contendo o meio de cultura sólido inoculado com 0,1 mL da respectiva diluição. O experimento foi composto por três repetições por tratamento, totalizando 45 unidades experimentais. Os dados obtidos foram registrados em planilhas e para a estimativa da concentração adequada, foi calculada a média do número de colônias por placa por diluição utilizando o software Microsoft Excel®.

O segundo experimento, consistiu na avaliação da viabilidade de *B. velezensis* em mistura com defensivos químicos *in vitro*, também foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foram testados 23 tratamentos (Tabela 1), com três repetições cada, totalizando 69 unidades experimentais. Cada unidade experimental correspondeu a uma placa de Petri contendo meio de cultura sólido inoculado com calda do respectivo tratamento. Visando maior confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados, o experimento foi realizado em duas repetições independentes.

Os dados de viabilidade, expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar diferenças entre

os tratamentos. A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando detectada significância ($p \leq 0,05$), as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. As análises e a elaboração do gráfico foram realizadas no software R (R Core Team, 2025®).

Por fim, no terceiro experimento, que tratou da análise das propriedades físico-químicas das caldas, os dados quantitativos (pH, condutividade elétrica e temperatura) foram analisados por meio do cálculo da média aritmética dos valores obtidos em cada repetição. Já os atributos qualitativos (flotação, sedimentação, separação de fases, formação de grumos, pasta, cristais e espuma) foram avaliados visualmente, de forma descritiva, atribuindo-se a presença ou ausência de cada característica para cada tratamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diluição seriada

O método da diluição seriada é amplamente utilizado na microbiologia para estimar o número de microrganismos viáveis em uma amostra, sendo fundamental para garantir a precisão na quantificação das colônias (Bettiol et al., 2022). Neste estudo, a concentração ideal foi determinada com base no intervalo recomendado de 30 a 300 colônias por placa, o qual permite uma contagem eficiente e reduz a sobreposição entre colônias (Bettiol et al., 2022).

Os resultados demonstraram que a diluição 10^{-6} apresentou, em média, 295,17 colônias/placa, valor enquadrado dentro da faixa adequada para contagem (Figura 2). A diluição 10^{-7} também atendeu aos critérios, com média de 58,50 colônias/placa, mas foi considerada menos representativa por apresentar um número relativamente baixo de colônias, o que poderia dificultar a percepção de diferenças entre tratamentos compatíveis e incompatíveis com o biofungicida. Assim, optou-se pela diluição 10^{-6} para dar seguimento aos testes de viabilidade.

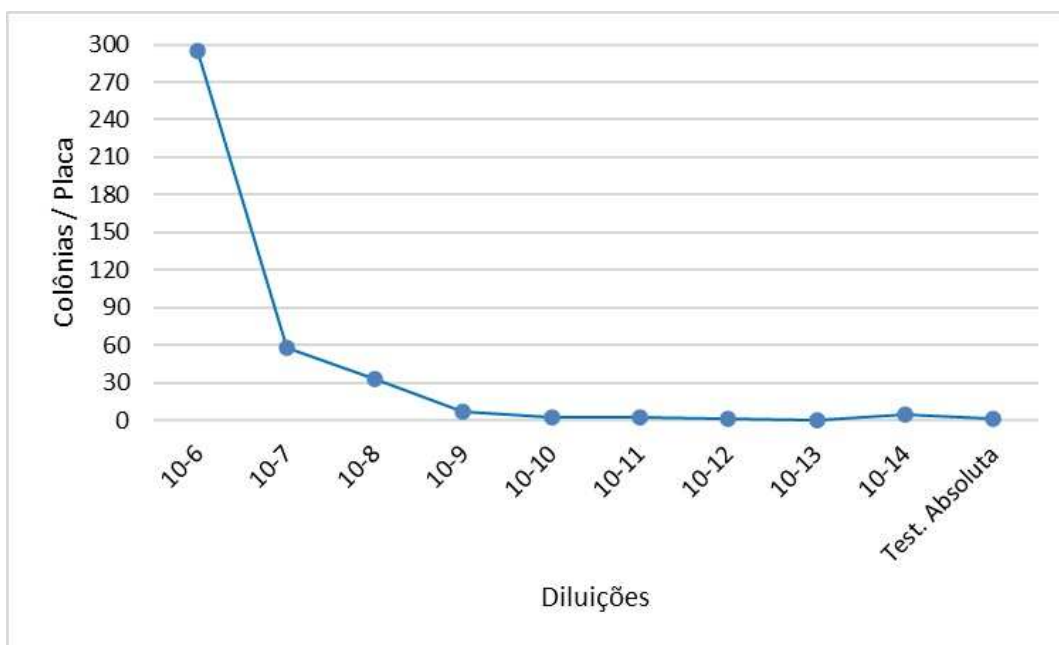


Figura 2. Média do número de colônias de *Bacillus velezensis* por placa obtidas a partir de diferentes diluições decimais do biofungicida comercial. A testemunha absoluta corresponde ao controle negativo, constituído por solução salina estéril.

As diluições 10^{-4} e 10^{-5} apresentaram crescimento excessivo de colônias (Figura 3 – b e c). sendo classificadas como "não contáveis". Com base nos dados da diluição 10^{-6} , estimou-se que a diluição 10^{-5} apresentou aproximadamente 2.951,7 colônias/placa e que a diluição 10^{-4} atingiu cerca de 29.517 colônias/placa, valores incompatíveis com uma contagem precisa. Tais valores reforçam a escolha da diluição 10^{-6} como a mais adequada para o desenvolvimento do ensaio de viabilidade *in vitro*.

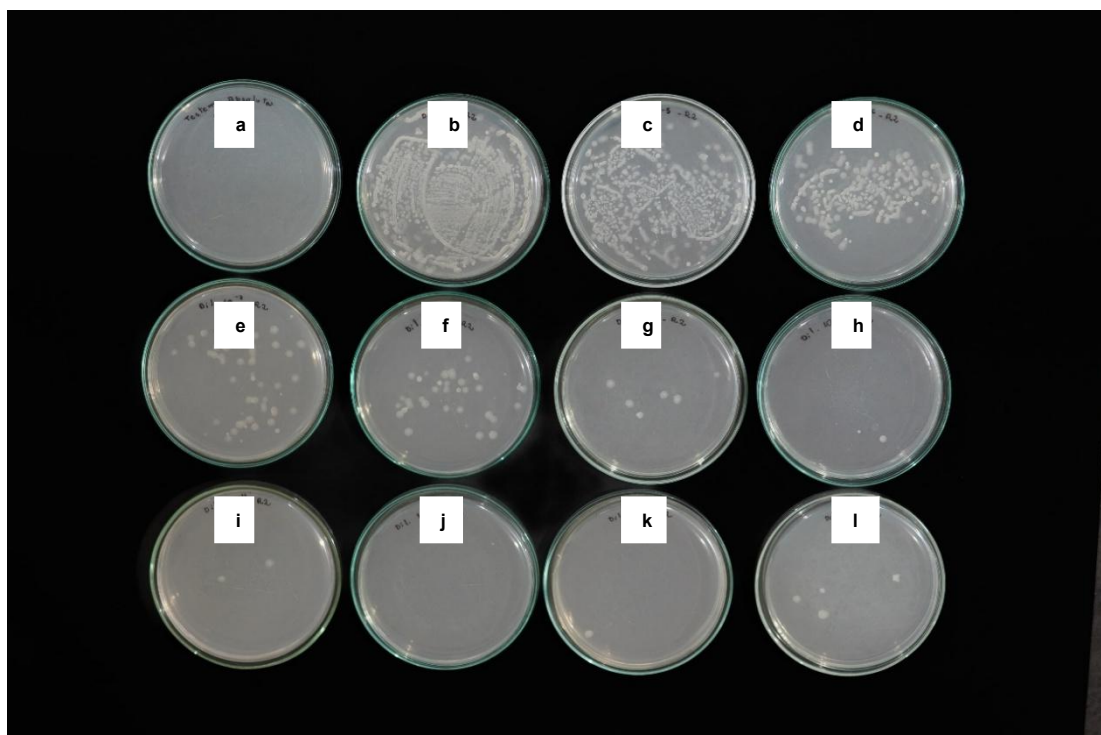


Figura 3. Representação das placas obtidas após o plaqueamento em superfície das diluições decimais seriadas do biofungicida à base de *Bacillus velezensis*. (a) testemunha absoluta (água deionizada), (b) diluição 10^{-4} , (c) diluição 10^{-5} , (d) diluição 10^{-6} , (e) diluição 10^{-7} , (f) diluição 10^{-8} , (g) diluição 10^{-9} , (h) diluição 10^{-10} , (i) diluição 10^{-11} , (j) diluição 10^{-12} , (k) diluição 10^{-13} e (l) diluição 10^{-14} . Observa-se a redução gradativa no número de unidades formadoras de colônia (UFC) com o aumento da diluição.

A partir da diluição 10^{-8} , observou-se um decréscimo mais acentuado no número de colônias viáveis, o que indica a efetividade do processo de diluição e a viabilidade dos microrganismos mesmo em concentrações reduzidas (Figura 3 – f, g, j, i, j, k e l). Na diluição 10^{-9} , a média foi de 6,50 colônias/placa, valor já próximo ao limite inferior de contagem confiável. Nas últimas diluições (10^{-13} e 10^{-14}), a média de colônias/placa foi extremamente baixa, refletindo a esperada redução logarítmica da população.

A testemunha absoluta, composta apenas por solução salina estéril em meio de cultura, apresentou média de 0,83 colônias/placa (Figura 3a), valor considerado desprezível e indicativo da ausência de contaminação externa durante o preparo e a execução dos procedimentos, validando a assepsia da metodologia adotada.

4.2 Viabilidade de *Bacillus velezensis* em associação com defensivos químicos

Para avaliação da compatibilidade entre defensivos químicos e o agente de controle biológico, o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi utilizado como indicador da sobrevivência do microrganismo, após duas horas de exposição às caldas contendo os agroquímicos. Os resultados revelam efeitos contrastantes entre os tratamentos, indicando que a compatibilidade é altamente dependente da natureza química dos ingredientes ativos e de suas combinações.

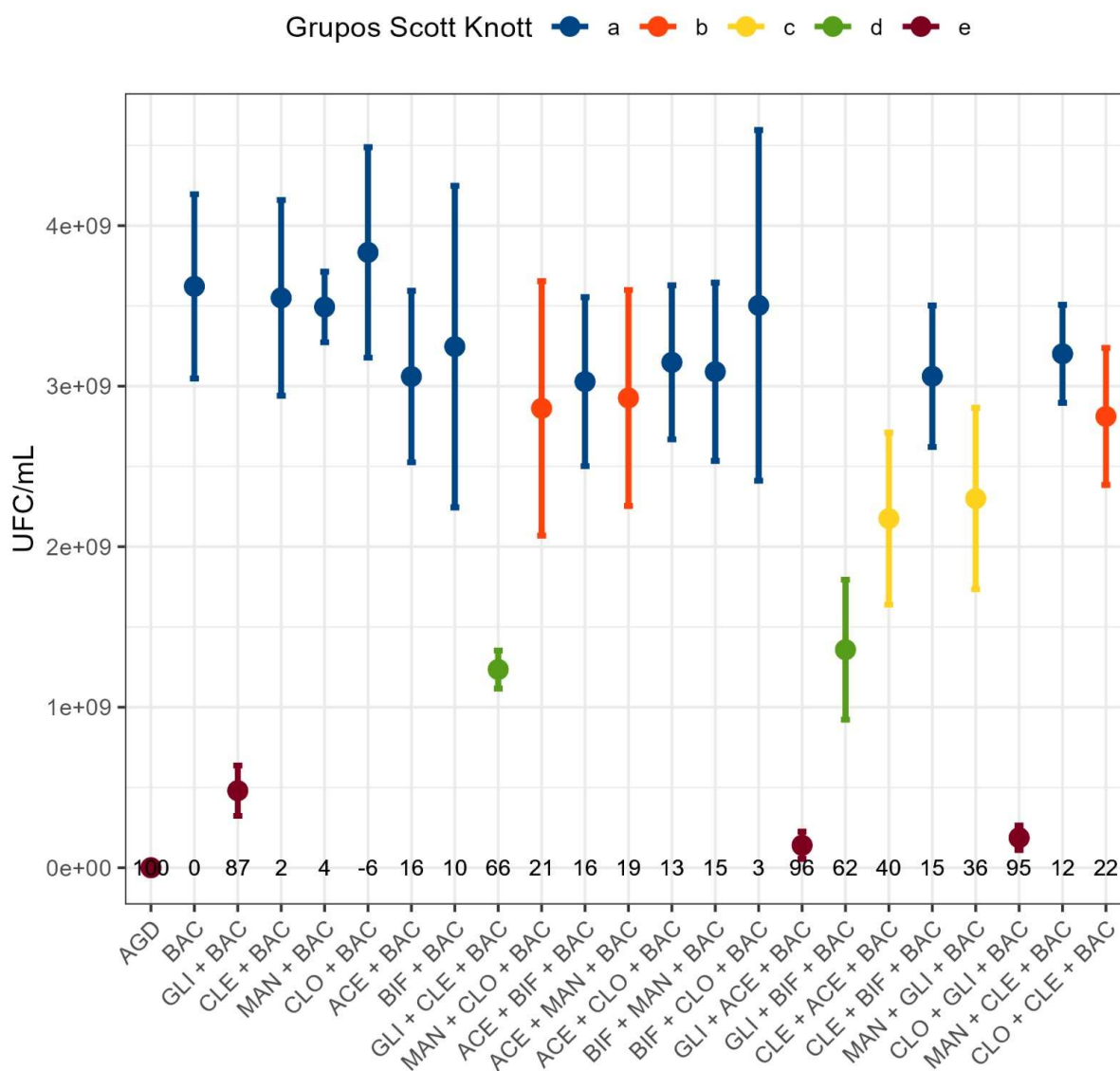


Figura 4. Número de colônias viáveis (UFC) de *Bacillus velezensis* nas caldas: Água deionizada (T1), *Bacillus velezensis* (T2), Glifosato + *Bacillus velezensis* (T3), Cletodim + *Bacillus velezensis* (T4), Mancozebe + *Bacillus velezensis* (T5), Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T6), Acefato + *Bacillus velezensis* (T7), Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T8), Glifosato + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T9), Mancozebe + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T10), Acefato + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T11), Acefato + Mancozeb + *Bacillus velezensis* (T12), Acefato + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T13),

Bifentrina + Mancozeb + *Bacillus velezensis* (T14), Bifentrina + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T15), Glifosato + Acefato + *Bacillus velezensis* (T16), Glifosato + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T17), Cletodim + Acefato + *Bacillus velezensis* (T18), Cletodim + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T19), Mancozebe + Glifosato + *Bacillus velezensis* (T20), Clorotalonil + Glifosato + *Bacillus velezensis* (T21), Mancozebe + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T22) e Clorotalonil + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T23), avaliados isoladamente ou em combinações.

A análise do gráfico (Figura 4), demonstra os efeitos da mistura de diferentes defensivos químicos com o biofungicida a base de *B. velezensis* sobre a viabilidade microbiana, expressa em (UFC/mL). O teste de Scott-Knott agrupou os tratamentos em cinco níveis distintos de resposta, classificados por pelas letras (a, b, c, d, e).

O grupo “a”, identificado pela cor azul, apresentou as maiores médias de UFC/mL e reduções inferiores a 16% na viabilidade do agente de biocontrole. Nesse grupo, destacaram-se as combinações do biofungicida com apenas um defensivo químico, T4 (cletodim), T5 (mancozebe), T6 (clorotalonil), T7 (acefato) e T8 (bifentrina), bem como misturas contendo dois defensivos químicos, como T11 (acefato + bifentrina), T13 (acefato + clorotalonil), T14 (bifentrina + mancozebe), T15 (bifentrina + clorotalonil) e T22 (cletodim + mancozebe). Todas essas formulações mantiveram médias superiores a 2×10^9 UFC/mL (Figuras 4 e 5) e não diferiram estatisticamente do controle positivo, evidenciando alta compatibilidade biológica nas condições avaliadas.

Resultados semelhantes foram observados por Perrony, Oliveira e Bettiol (2023), que verificaram elevada viabilidade de *B. velezensis* imediatamente após a exposição a matrizes químicas complexas, indicando a capacidade do microrganismo de manter a integridade celular frente a potenciais estresses químicos. Essa resistência pode estar associada à formação de endósporos e à robustez fisiológica da espécie, o que favorece sua sobrevivência mesmo na presença de determinados grupos químicos menos tóxicos ao agente de controle biológico.

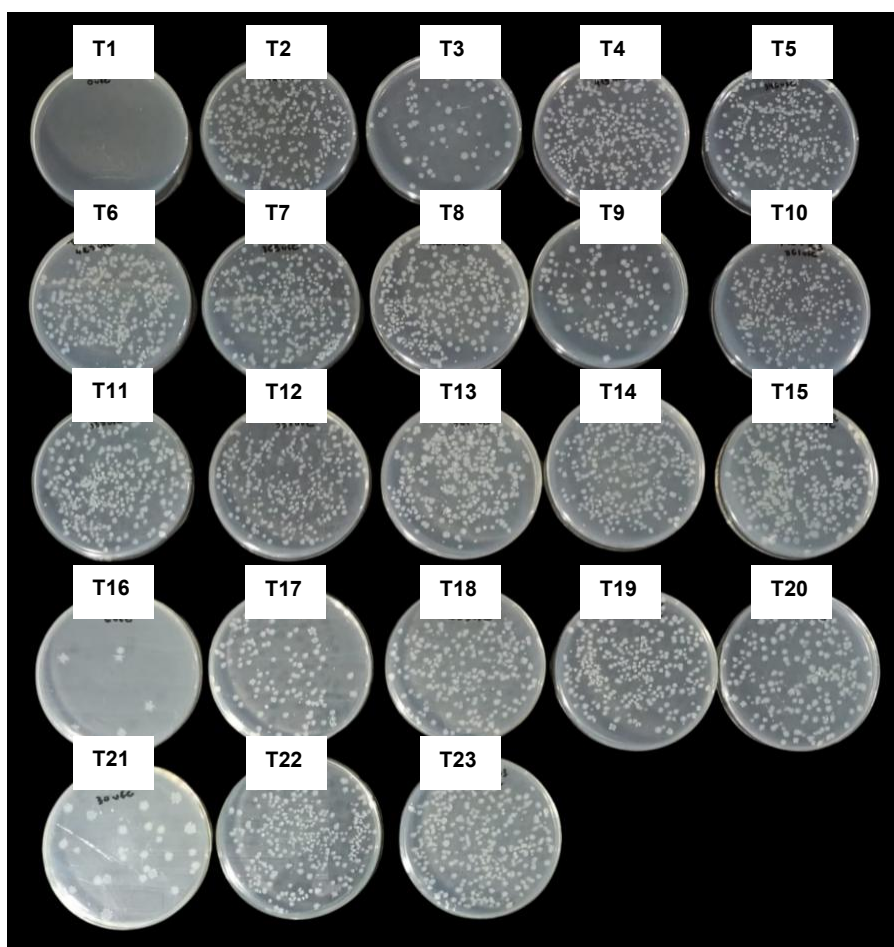


Figura 5. Crescimento de *Bacillus velezensis* após aproximadamente 18 horas de incubação em placas de Petri inoculadas com as caldas: Água deionizada (T1), *Bacillus velezensis* (T2), Glifosato + *Bacillus velezensis* (T3), Cletodim + *Bacillus velezensis* (T4), Mancozebe + *Bacillus velezensis* (T5), Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T6), Acefato + *Bacillus velezensis* (T7), Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T8), Glifosato + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T9), Mancozebe + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T10), Acefato + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T11), Acefato + Mancozeb + *Bacillus velezensis* (T12), Acefato + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T13), Bifentrina + Mancozeb + *Bacillus velezensis* (T14), Bifentrina + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T15), Glifosato + Acefato + *Bacillus velezensis* (T16), Glifosato + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T17), Cletodim + Acefato + *Bacillus velezensis* (T18), Cletodim + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T19), Mancozebe + Glifosato + *Bacillus velezensis* (T20), Clorotalonil + Glifosato + *Bacillus velezensis* (T21), Mancozebe + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T22) e Clorotalonil + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T23).

Em contrapartida, o grupo “e”, representado na cor vinho, apresentou as menores médias de UFC/mL (Figuras 4 e 5). Nesse grupo, destacaram-se os tratamentos contendo glifosato, isoladamente ou em misturas, que promoveram as maiores reduções na viabilidade do agente

biológico. O tratamento T3 (glifosato + *B. velezensis*) reduziu o número de UFC/mL em 87%, enquanto T16 (glifosato + acefato + *B. velezensis*) e T21 (glifosato + clorotalonil + *B. velezensis*) provocaram reduções ainda mais severas, de 96% e 95%, respectivamente. Esses resultados indicam incompatibilidade acentuada e provável efeito bactericida dos defensivos avaliados, possivelmente potencializado pelas interações entre princípios ativos. Esses achados corroboram as observações de Gonçalves (2016), que descreve o glifosato como prejudicial ao desenvolvimento de rizobactérias, afetando a integridade da membrana celular e inibindo rotas metabólicas essenciais, como a via do ácido chiquímico, fundamental para a biossíntese de aminoácidos. De forma semelhante, Zobiole et al. (2011) observaram que a aplicação de glifosato reduziu significativamente populações de rizobactérias promotoras de crescimento e de *Bacillus* spp. em sistemas agrícolas, confirmando o efeito deletério do herbicida sobre microrganismos benéficos.

Além dos casos mencionados, outros tratamentos que continham glifosato também apresentaram efeitos negativos relevantes. As misturas de glifosato + cletodim + *B. velezensis* (T9) e bifentrina + glifosato + *B. velezensis* (T17), ambas classificadas no grupo “d”, apresentaram reduções de 66% e 62%, respectivamente, na viabilidade do agente de biocontrole. Esses resultados sugerem que a presença de outros princípios ativos pode atenuar o efeito inibitório do glifosato sobre o microrganismo, resultando em menor impacto do que aquele observado quando o herbicida é aplicado isoladamente.

O grupo “c” incluiu os tratamentos T17 (cletodim + acefato + *B. velezensis*) e T20 (mancozebe + glifosato + *B. velezensis*), que promoveram reduções na viabilidade do microrganismo de 40% e 36%, respectivamente, caracterizando um impacto moderado. Embora cletodim e acefato apresentem baixa toxicidade direta para bactérias quando avaliados isoladamente, a associação desses princípios ativos pode modificar propriedades físico-químicas da calda, resultando em estresse subletal, comprometendo a integridade da membrana e reduzindo temporariamente a viabilidade celular (Santos et al., 2019). No caso de mancozebe + glifosato, o impacto observado provavelmente está ligado à toxicidade do herbicida, mas com atenuação parcial promovida pelo fungicida de contato, que pode reduzir a fração ativa do glifosato ou estabelecer interações físico-químicas capazes de proteger parte das células bacterianas.

Os grupos intermediários (b, c e d) revelam variações significativas, com redução parcial da viabilidade, apresentando reduções na viabilidade agente biológico variando entre 15 e 66%, o que destaca a necessidade de análises mais detalhadas sobre os efeitos combinados e a influência das formulações e concentrações dos defensivos na sobrevivência do biofungicida.

Por fim, o controle negativo com água deionizada não apresentou crescimento de colônias, como esperado, assegurando a validade do teste e a ausência de contaminação nas amostras.

4.3 Propriedades físico-químicas das caldas

4.3.1 Análise dos parâmetros quantitativos

Os valores de temperatura apresentaram variações discretas entre os dois momentos de avaliação T0 e T1, com reduções que oscilaram, em média, de 1,0 a 1,8 °C (Tabela 2). Atribuiu-se essas diferenças principalmente à perda natural de calor durante o período de repouso, sem indícios de reações exotérmicas ou endotérmicas relevantes decorrentes da interação dos produtos. Entre os extremos, observou-se a menor variação em T9 (glifosato + cletodim + *B. velezensis*), com apenas 0,63 °C de diferença (23,23 °C para 22,60 °C), e a maior em T5 (mancozebe + *B. velezensis*), que passou de 24,33 °C para 22,17 °C. Em todos os casos, as alterações mantiveram-se dentro da faixa considerada estável para caldas de pulverização, corroborando relatos de que, em condições controladas, a temperatura não é um fator limitante para a compatibilidade físico-química (ABNT, 2014).

O pH da testemunha T1 (água deionizada) manteve-se levemente ácido (5,90–5,79), enquanto T2 (formulação contendo *B. velezensis*) apresentou valores mais baixos (4,76) (Tabela 2). Essa acidificação provavelmente se deve à presença de tampões na formulação, e não à produção de ácidos orgânicos ou lipopeptídeos, já que culturas de *B. velezensis* apresentam pH neutro a básico, faixa em que ocorre a síntese de lipopeptídeos (Lee et al., 2025).

A maioria das misturas manteve o pH entre 4,5 e 7, faixa considerada adequada para a estabilidade e formação dos esporos de *B. velezensis* (Ji et al., 2021; Tang et al. 2024). Entretanto, os tratamentos T7, T11 e T18, contendo acefato apresentaram pH ácido, abaixo do intervalo ideal (Tabela 2). Além disso, foi observada redução acentuada de pH de 2,2, em T6 (clorotalonil + *B. velezensis*) capaz de afetar a estabilidade enzimática e a germinação de esporos de *Bacillus* spp., conforme evidenciado por Soriano-Peña et al. (2025).

A condutividade elétrica foi o parâmetro que apresentou as variações mais expressivas entre as misturas, refletindo diretamente a carga iônica e a concentração de sais dissolvidos nas caldas. Já na primeira avaliação (T0), as combinações contendo glifosato (T3, T9, T16, T17, T20 e T21) exibiram valores extremamente elevados, superiores a 9.000 µS/cm (Tabela 2), comportamento atribuído à elevada concentração de sais presentes nas formulações desse herbicida, como relatado por Zobiolo et al. (2010) e Ferreira et al. (2020), que associam o alto teor de íons à presença de sais de amônio, potássio ou isopropilamina utilizados como veículos

na formulação. Em seguida, destacaram-se as misturas com mancozebe, cujos valores ultrapassaram 1.413,3 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Tabela 2), possivelmente devido à composição do fungicida à base de sais de manganês e zinco (Arcanjo, 2019; Jesus, 2022).

Tabela 2. Valores médios de temperatura, pH e condutividade elétrica de 23 misturas de agroquímicos, após duas horas da preparação da calda contendo os exclusivamente os defensivos e após duas horas da inserção da alíquota contendo o biofungicida, seguindo a NBR 13 875.

Tratamento	Mistura	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		Ph		Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	
		T0	T2	T0	T2	T0	T2
T01	AGD	23,73	22,43	5,90	5,79	32,49	94,27
T02	BAC	23,40	22,43	4,76	4,76	95,13	128,03
T03	GLI + BAC	23,43	22,23	6,33	6,31	11030,00	11990,00
T04	CLE + BAC	23,30	22,30	4,57	4,62	26,91	134,90
T05	MAN + BAC	24,33	22,17	7,10	6,64	1549,33	1823,00
T06	CLO + BAC	23,23	21,93	7,60	5,25	64,80	178,67
T07	ACE + BAC	23,43	21,93	3,59	3,81	347,00	400,67
T08	BIF + BAC	23,00	21,90	4,76	4,70	36,42	123,47
T09	GLI + CLE + BAC	23,23	22,60	5,70	5,71	10730,00	13333,33
T10	MAN + CLO + BAC	23,03	22,53	7,01	6,47	1892,67	1811,00
T11	ACE + BIF + BAC	22,80	22,50	3,57	3,79	415,67	384,33
T12	ACE + MAN + BAC	22,97	22,33	6,12	5,99	2022,67	1935,67
T13	ACE + CLO + BAC	22,90	22,57	4,19	4,23	378,33	402,00
T14	BIF + MAN + BAC	23,00	22,63	7,14	6,73	1811,67	1791,33
T15	BIF + CLO + BAC	23,07	22,60	5,40	4,91	96,37	177,50
T16	GLI + ACE + BAC	22,90	22,60	6,29	6,29	12186,67	11216,67
T17	GLI + BIF + BAC	23,37	22,57	6,35	5,33	11935,00	9153,33
T18	CLE + ACE + BAC	23,27	22,60	3,67	3,93	361,67	374,67
T19	CLE + BIF + BAC	23,23	22,60	4,51	4,57	50,40	106,77
T20	MAN + GLI + BAC	23,30	22,57	6,22	6,30	10765,00	9086,67
T21	CLO + GLI + BAC	23,10	22,57	6,35	6,32	12501,67	5791,00
T22	MAN + CLE + BAC	23,20	22,60	6,75	6,41	1813,67	1471,00
T23	CLO + CLE + BAC	23,10	22,67	4,98	4,76	90,33	170,47

¹Misturas contendo água deionizada (AGD), *Bacillus velezensis* (BAC), glifosato (GLI), cletodim (CLE), mancozebe (MAN), clorotalonil (CLO), acefato (ACE), bifentrina (BIF) e suas múltiplas associações. Os tratamentos consistiram em aplicações individuais ou combinações dos defensivos com *Bacillus velezensis*.

Por outro lado, algumas combinações mantiveram valores próximos aos observados no controle positivo com *B. velezensis* (T2), como as caldas contendo cletodim (39,25 a 134,90 $\mu\text{S}/\text{cm}$), clorotalonil (96,20 a 178,27 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e bifentrina (35,59 a 123,47 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Tabela 2). Esses valores mais baixos indicam menor aporte de sais solúveis à mistura, o que, segundo

Tavares e Cunha (2023), tende a favorecer a estabilidade físico-química da calda e reduzir riscos de incompatibilidade.

Após a adição do biofungicida (T1), observou-se incremento de condutividade em algumas misturas, como T3 (de 11.030,00 para 11.990,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$) e T9 (de 10.730,00 para 13.333,33 $\mu\text{S}/\text{cm}$), possivelmente devido à presença de metabólitos e sais residuais da formulação líquida do produto biológico. Em contrapartida, houve reduções expressivas em misturas como T17 (glifosato + bifentrina + *B. velezensis*), que passou de 11.935,00 para 9.153,33 $\mu\text{S}/\text{cm}$, e T21 (clorotalonil + glifosato + *B. velezensis*), que apresentou queda acentuada de 12.501,67 para 5.791,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Tabela 2). Essas reduções abruptas sugerem a ocorrência de precipitação de sais ou formação de complexos insolúveis, fenômenos que reduzem a homogeneidade da calda e podem comprometer a eficácia da aplicação, conforme apontado por relatórios técnicos sobre práticas de mistura de tanque (Zollinger, 2022; Freitas et al. 2018).

4.3.2. Análise dos parâmetros qualitativos

A avaliação visual indicou que as misturas com glifosato foram as que mais apresentaram problemas de compatibilidade físico-química, especialmente pela formação de grumos, atributo ausente ou pouco intenso nos demais ingredientes ativos testados. Essa ocorrência foi notável em T3 (glifosato + *B. velezensis*), T9 (glifosato + cletodim + *B. velezensis*), T16 (glifosato + acefato + *B. velezensis*), T17 (glifosato + bifentrina + BAC), T20 (mancozebe + glifosato + *B. velezensis*) e T21 (clorotalonil + glifosato + *B. velezensis*). Em T20 e T21, além dos grumos, verificou-se sedimentação intensa e separação de fases em T20 e T21, sugerindo forte incompatibilidade (Figura 6 e Tabela 3).

A formação de grumos, sedimentação e separação de fases nessas misturas pode estar relacionada à interação entre os sais presentes no glifosato e às propriedades insolúveis dos fungicidas mancozebe e clorotalonil. Essa combinação favorece a ocorrência de reações de precipitação ou agregação coloidal, fenômeno amplamente relatado em estudos de compatibilidade envolvendo herbicidas salinos e fungicidas de contato (Ribeiro et al., 2020; Oliveira, 2021). Além disso, a presença de compostos tensoativos e polissacarídeos produzidos por *Bacillus* pode acelerar a coagulação de partículas em suspensões instáveis (Ongena e Jacques, 2008).

Alterações dessa magnitude reduzem a homogeneidade da calda e podem comprometer a distribuição uniforme do ingrediente ativo e do agente biológico no momento da aplicação, diminuindo a eficácia do controle e a viabilidade microbiana (Agarwal et al., 2021; Xu et al.,

2021). Estudos prévios demonstram que a instabilidade física observada em misturas tanque é um dos principais fatores de insucesso na integração de produtos biológicos com defensivos químicos (Ghini & Kimati, 2000; Xu et al., 2021).



Figura 6. Avaliação da compatibilidade físico-química entre o biofungicida à base de *Bacillus velezensis* nas caldas : Água deionizada (T1), *Bacillus velezensis* (T2), Glifosato + *Bacillus velezensis* (T3), Cletodim + *Bacillus velezensis* (T4), Mancozebe + *Bacillus velezensis* (T5), Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T6), Acefato + *Bacillus velezensis* (T7), Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T8), Glifosato + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T9), Mancozebe + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T10), Acefato + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T11), Acefato + Mancozeb + *Bacillus velezensis* (T12), Acefato + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T13), Bifentrina + Mancozeb + *Bacillus velezensis* (T14), Bifentrina + Clorotalonil + *Bacillus velezensis* (T15), Glifosato + Acefato + *Bacillus velezensis* (T16), Glifosato + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T17), Cletodim + Acefato + *Bacillus velezensis* (T18), Cletodim + Bifentrina + *Bacillus velezensis* (T19), Mancozebe + Glifosato + *Bacillus velezensis* (T20), Clorotalonil + Glifosato + *Bacillus velezensis* (T21), Mancozebe + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T22) e

Clorotalonil + Cletodim + *Bacillus velezensis* (T23)., avaliados isoladamente ou em combinações. Observa-se formação de grumos nos tratamentos T3 e T16, e ocorrência de sedimentação e separação de fases nos tratamentos T20 e T21.

Embora a formação de espuma tenha sido observada em todos os tratamentos (Tabela 4) após a adição do bioproduto, esse efeito foi generalizado e, portanto, de menor relevância diagnóstica para a incompatibilidade físico-química.

Tabela 3. Avaliação da compatibilidade físico-química de 23 misturas de agroquímicos, realizada conforme a NBR 13875.

Tratamentos	Misturas	Flotação		Sedimentação		Grumos		S. Fase		Pasta		Cristais		Espuma	
		T0	T2	T0	T2	T0	T2	T0	T2	T0	T2	T0	T2	T0	T2
T01	AGD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T02	BAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T03	GLI + BAC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
T04	CLE + BAC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T05	MAN + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T06	CLO + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T07	ACE + BAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T08	BIF + BAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T09	GLI + CLE + BAC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T10	MAN + CLO + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T11	ACE + BIF + BAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T12	ACE + MAN + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T13	ACE + CLO + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T14	BIF + MAN + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T15	BIF + CLO + BAC	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T16	GLI + ACE + BAC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
T17	GLI + BIF + BAC	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
T18	CLE + ACE + BAC	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T19	CLE + BIF + BAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T20	MAN + GLI + BAC	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
T21	CLO + GLI + BAC	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+
T22	MAN + CLE + BAC	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
T23	CLO + CLE + BAC	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

¹Misturas contendo água deionizada (AGD), *Bacillus velezensis* (BAC), glifosato (GLI), cletodim (CLE), mancozebe (MAN), clorotalonil (CLO), acefato (ACE) e bifentrina (BIF), aplicadas isoladamente ou em combinações com *Bacillus velezensis*. (T0) avaliação físico-química realizada duas horas após a preparação das caldas contendo apenas defensivos químicos; (T1) avaliação realizada duas horas após a adição da alíquota do produto biológico. Presença (+) ou ausência (-) de alterações físicas nas caldas para cada um dos atributos avaliados.

Portanto, recomenda-se que a adoção de misturas envolvendo *Bacillus velezensis* seja precedida de testes de compatibilidade, priorizando ingredientes ativos compatíveis e evitando combinações que comprometam a viabilidade do agente biológico. Esses achados contribuem para embasar práticas mais seguras no manejo integrado de doenças, favorecendo a integração entre controle biológico e químico de forma sustentável e tecnicamente eficiente.

5. CONCLUSÕES

A compatibilidade entre o produto biológico à base de *Bacillus velezensis* e defensivos químicos é fortemente influenciada pelo ingrediente ativo e pela combinação utilizada. Foi validada a hipótese de que determinados defensivos e misturas mantêm a viabilidade microbiana e a estabilidade físico-química da calda, possibilitando seu uso conjunto em mistura de tanque. Por outro lado, verificou-se que algumas formulações, especialmente aquelas contendo glifosato, acefato, mancozebe e clorotalonil em determinadas combinações, apresentam incompatibilidade significativa, confirmando parcialmente a hipótese de que nem todos os defensivos químicos preservam as características físico-químicas e biológicas necessárias para o desempenho do bioproduto.

REFERÊNCIAS

- ABNT. NBR 13875: **Agrotóxicos e afins – Avaliação de compatibilidade físico-química**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2014. 16 p.
- ARCANJO, M. E. **Monitoramento do agrotóxico mancozeb no solo em diferentes sistemas de plantios de tomate**. 2007.
- AGARWAL, D. K. et al. Insight view on synthetic strategies and biological applications of pyrimidobenzothiazoles. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 1012–1025, 2021.
- BARBIERI, C. R. **Biológicos no controle de doenças, indução de resistência e promoção de crescimento na cultura da soja**. 2023.
- BETTIOL, W. et al. **Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.: Proposta metodológica**. 2022.
- CARMONA-HERNANDEZ, S. et al. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. **Agronomy**, v. 9, n. 3, p. 121, 2019. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>
- CAO, Y. et al. Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
- CHANG, K. F. et al. Disease reaction to *Rhizoctonia solani* and yield losses in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 98, n. 1, p. 115–124, 2017. <https://doi.org/10.1139/cjps-2017-0031>
- COLLINGE, D. B. et al. Biological control of plant diseases—What has been achieved and what is the direction? **Plant Pathology**, v. 71, n. 5, p. 1024–1047, 2022. <https://doi.org/10.1111/ppa.13555>
- CONRAD, A. M. Management of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean using the biofungicides *Bacillus amyloliquefaciens* and *Coniothyrium minitans*. 2022. Master's thesis, Purdue University.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul, MN: APS Press, 1983.
- REIS DUARTE, E. et al. Impacto do glifosato sal de amônio em microrganismos benéficos do solo. **Caderno Pedagógico**, v. 22, n. 5, e15136, 2025.
- EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v. 46, n. 4, p. 387–400, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1014193329979>
- ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 126, 102048, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102048>
- FÉLIX, J. D. S.; TÓTOLA, M. R. **Otimização da produção de lipopeptídeos por *Bacillus velezensis* visando ao controle de fungos fitopatogênicos**. 2023.

FERREIRA, P. H. U. et al. Physicochemical properties, droplet size and volatility of dicamba with herbicides and adjuvants on tank-mixture. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 18833, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75848-4>

FRAVEL, D. R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 43, p. 337–359, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. 2000.

GONÇALVES, O. S. **Efeito do glifosato sobre traços funcionais de crescimento e biocontrole da rizobactéria *Bacillus subtilis***. 2016. Doctoral dissertation, Universidade de Rio Verde.

GUO, D. et al. Occurrence status and green control countermeasure for diseases and insect pests of soybeans in Shandong Province. **Soybean Science and Technology**, v. 4, p. 27–30, 2021.

HALFELD-VIEIRA, B. D. A.; SANTOS, M. D. S. **Compatibilidade entre ativos biológicos bacterianos e agroquímicos utilizados na produção de mudas de cana-de-açúcar**.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377–393, 2000. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.4.377>

JESUS, A. S. D. **Caracterização funcional do adjuvante condicionador de calda para fungicidas na cultura da soja**. 2022.

KESHMIRSHEKAN, A.; MESQUITA, L. M. S.; VENTURA, S. P. Biocontrol manufacturing and agricultural applications of *Bacillus velezensis*. **Trends in Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 986–1001, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.11.002>

LAHLALI, R. et al. Biological control of plant pathogens: **A global perspective**. **Microorganisms**, v. 10, n. 3, 596, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>

LEE, J. G. et al. Control of sweet potato Fusarium wilt and black rot by endophytic *Bacillus velezensis* with improved lipopeptide production. **BMC Microbiology**, v. 25, n. 1, 603, 2025.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

PERRONY, P. E. P.; OLIVEIRA, C. R.; BETTIOL, W. **Potencial de compatibilidade entre lodo de estação de tratamento de água e agentes de controle biológico**. 2024.

PEZARINI BAPTISTA, J. et al. Antifungal activity and genomic characterization of the biocontrol agent *Bacillus velezensis* CMRP 4489. **Scientific Reports**, v. 12, p. 22380, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22380-0>

PUCHE, R. A. et al. Antagonistic activity of autochthonous strains of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus velezensis* against fungi and oomycetes associated to damping-off. **Rhizosphere**, v. 29, p. 100678, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2025.101052>

RAKES, M. et al. Physicochemical compatibility of agrochemical mixtures in spray tanks for paddy field rice crops. **Planta Daninha**, v. 35, e017165185, 2017. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582017350100083>

RIBEIRO, R. P. M. et al. **Compatibilidade físico-química de caldas fungicidas e adjuvantes**. 2020.

RUSSI, A. **Desenvolvimento de bioformulações contendo endósporos de *Bacillus velezensis* S26 para controle biológico de doenças e promoção do crescimento vegetal**. 2024.

SANTOS, C. A. M.; et al. Effect of addition of adjuvants on physical and chemical characteristics of Bt bioinsecticide mixture. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 12525, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48939-y>

SANTOS, D. K. Q. D. **Biofungicidas e fungicidas químicos no manejo de doenças na cultura da soja**. 2023.

SAVARY, S. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>

SILVA, L. et al. How can an in vitro incompatibility of *Trichoderma*-based products and herbicides impact the parasitism and control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary)? **Crop Health**, v. 2, n. 1, 5, 2024.

SORIANO-PENÑA, E. Y. et al. Modulation of the sporulation dynamics in the plant-probiotic *Bacillus velezensis* 83 via carbon and quorum-sensing metabolites. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1–20, 2025. <https://doi.org/10.1007/s12602-025-10383-7>

SOUSA, J. A. S.; BONAFIN, M.; LIMA, R. P. Baixo rendimento da produção de milho relacionado a doenças fúngicas. **Facit Business and Technology Journal**, v. 2, n. 42, 2023.

TANG, J. et al. Genomic and phenotypic characterization of *Bacillus velezensis* LT1 reveals its potential as a plant growth-promoting rhizobacterium. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 1337655, 2024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1337655>

TAVARES, R. M.; CUNHA, J. P. A. R. Pesticide and adjuvant mixture impacts on the physical–chemical properties, droplet spectrum, and absorption of spray applied in soybean crop. **AgriEngineering**, v. 5, n. 1, p. 646–659, 2023. <https://doi.org/10.3390/agriengineering5010039>

TAVARES, R. M. et al. **Misturas de produtos em tanque influenciam o desempenho das aplicações fitossanitárias?** 2022.

VIDAL, M. C. et al. Bioinsumos: a construção de um Programa Nacional pela Sustentabilidade do Agro Brasileiro. **Economic Analysis of Law Review**, v. 12, n. 3, p. 557–574, 2021.

XU, Y.; et al. Biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* strain QSE-21 against postharvest grey mould of fruit. **Biological Control**, v. 161, 104711, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104711>

ZHOU, L.; et al. Antimicrobial activity screening of rhizosphere soil bacteria from tomato and genome-based analysis of their antimicrobial biosynthetic potential. **BMC Genomics**, v. 22, p. 1–14, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-08178-5>

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 176–180, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.12.003>

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 1, p. 118–127, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04864.x>