



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

LETÍCIA COSTA GERALDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

DEZEMBRO/2023



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

LETÍCIA COSTA GERALDO

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT
CO-ORIENTADORA: ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (11)**

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS**

LETÍCIA COSTA GERALDO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.**

APROVADA POR:

**ROSE GOMES MONNERAT, Ph.D., Empresa SoluBio, SoluScience (Orientadora)/
rosemonnerat@gmail.com**

**CRISTINA SCHETINO BASTOS, Dra., Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária – Universidade de Brasília – FAV (Membro Interno) / cshetino@gmail.com**

**ANTÔNIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA, Empresa SoluBio (Membro
Externo) / deboracamilla1@hotmail.com**

**SANDRO COELHO LINHARES MONTALVÃO, Empresa SoluBio (Membro Externo)
/ sandro.coelho@yahoo.com.br**

BRASÍLIA/DF, 07 de DEZEMBRO de 2023.

FICHA CATALOGRÁFICA

CG355p Costa Geraldo, Leticia
PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* E AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS. / Leticia Costa Geraldo ;
orientador Rose Gomes Monnerat. - Brasília, 2023.

p. 61

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Agronomia) --Universidade de Brasília, 2023.

1. Controle biológico. 2. Isolamento. 3. Estirpes. 4. Rizosfera. 5. Inseticida
microbiológico. I. Gomes Monnerat, Rose, orient. II. Título.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

GERALDO, L. C. **Prospecção de rizobactérias do gênero *Bacillus* e avaliação do potencial no controle de pragas agrícolas.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Leticia Costa Geraldo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NO CONTROLE DE PRAGAS AGRÍCOLAS

GRAU: Mestrado

ANO: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Nome: Leticia Costa Geraldo

CPF: 051.764.361-83

Tel: (61) 981339050

Endereço: SQS 415 sul, bloco I

Email: leticiacg1410@gmail.com

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me abençoarem e protegerem em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria da Conceição Costa e Luiz Carlos Geraldo por terem me concedido a dom da vida e por terem sempre acreditado em mim, até mesmo quando eu não acreditei. Obrigada pela educação e investimento nos meus estudos. Sem vocês nada disso seria possível!

Aos meus queridos avós, Dezinha Saraiva e Antônio Geraldo, que me incentivaram a acreditar sempre nos meus sonhos. Obrigada por todos os ensinamentos, colos e cafés. Vocês são fonte de amor e inspiração na minha vida!

Ao meu namorado Lucas Meira, que apesar da distância física, sempre se fez presente, me apoiando, acalentando e incentivando. Obrigada pelo companheirismo, amor e paciência comigo em todos os momentos. Você foi essencial nessa jornada!

A minha irmã Thayane Costa e meus primos Tássia Martins e Elvin Martins pelo amor fraterno e amizade.

As minhas queridas amigas, Anna Luísa Guimarães, Ana Beatriz Azevedo, Flávia Menezes, Isabela Pires, Izabella Mendonça, Carolina Chevalier, Iana França, Zuleide Costa e Marluce Lima por todo apoio e carinho. Obrigada por se fazerem sempre presentes!

A minha orientadora Dra. Rose Monnerat, por todos os conhecimentos transmitidos e pela condução ao longo dessa jornada. Sou muito grata por ter sido sua orientada!

A minha coorientadora Dra. Alessandra Monteiro de Paula pela condução e auxílio na elaboração do texto.

Aos colegas de trabalhos do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas: Camila Ferreira, Luana Dantas, Izabela Nunes, Jéssica Guimarães, Gabriela Teodoro, Lara Aguiar, Letícia Helena, Sônia Frantz, Amanda, Letícia Oliveira, Anderson de Oliveira, José Alves e Carol Bezerra, obrigada por me ajudarem em todos os momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação e Agronomia da Universidade de Brasília que me permitiu essa conquista.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro, em especial à Dra. Bárbara Eckestein e o Dr. Paulo Queiiroz.

À empresa SoluScience (Solubio) pelo suporte técnico e financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa jornada, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas iniciais do isolamento. A- Diluição do solo presente na raiz da planta em solução salina; B- Choque térmico; C- Plaqueamento do material em meio Embrapa sólido. 22
- Figura 2.** Armazenamento das estirpes inoculadas em papel filtro24
- Figura 3.** Precipitação de DNA em etanol.25
- Figura 4.** Etapas do ensaio de bicudo do algodoeiro. A: Larvas próximas ao segundo ínstar. B: Dieta vertida e separada em quadrantes com orifícios para a alocação das larvas. C: Leitura do ensaio após 7 dias.....29
- Figura 5.** Dieta 1 sendo vertida para ensaio com lepidópteras e placas prontas que foram levadas para a sala de crescimento.32
- Figura 6.** Copos de poliestireno com dieta 2 em sala de crescimento.32
- Figura 7:** Exemplo de análise visual da toxicidade da estirpe bacteriana em confronto direto com os fungos fitopatogênicos. A: o isolado bacteriano apresentou 0% de toxicidade ao fungo. B: o isolado bacteriano apresentou 50% de toxicidade ao fungo. C: o isolado bacteriano apresentou 75% de toxicidade ao fungo.35
- Figura 8.** Porcentagem de estirpes de *Bacillus* isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais na etapa 1 de isolamento.36
- Figura 9.** Porcentagem de estirpes de *Bacillus* isoladas da rizosfera diferentes espécies vegetais na etapa 2 de isolamento.37
- Figura 10.** Porcentagem de semelhança das estirpes de *Bacillus* prospectadas da rizosfera que foram enviadas para o sequenciamento na empresa GoGenetic e foram identificadas com genoma de referência.44
- Figura 11.** Árvore filogenética da identificação da estirpe S2961 isolado da rizosfera da espécie botânica *Paspalum notatum*. A identificação ocorreu por meio da comparação do

sequenciamento da estirpe com as demais espécies do banco de dados da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies coletadas nas Etapa 1 e Etapa 2 e seus respectivos nomes comuns, famílias botânicas, datas de coleta e data de isolamento.	21
Tabela 2: Ingredientes autoclaváveis e não autoclaváveis utilizados para dieta de <i>A. grandis</i>	28
Tabela 3: Ingredientes da dieta 1 das lagartas <i>C. includens</i> e <i>S. frugiperda</i>	30
Tabela 4: Ingredientes da dieta 2 das lagartas <i>C. includens</i> e <i>S. frugiperda</i>	31
Tabela 5: Ingredientes da dieta de <i>E. heros</i> para alimentação do inseto.	33
Tabela 6. Número de estirpe de <i>Bacillus</i> isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais na etapa 1 de isolamentos.....	36
Tabela 7. Número de estirpe de <i>Bacillus</i> isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais na etapa 2 de isolamentos.....	37
Tabela 8. Identificação dos isolados de <i>Bacillus</i> prospectados na etapa 1 de isolamento e sua respectiva toxicidade às pragas agrícolas selecionadas. Estão identificados por Na* os valores não avaliados.....	39
Tabela 9. Identificação dos isolados de <i>Bacillus</i> prospectados na etapa 2 de isolamento e sua respectiva toxicidade às pragas agrícolas selecionadas.	40
Tabela 10. Identificação das estirpes de <i>Bacillus</i> prospectadas em ambas as etapas de isolamento e submetidas a testes de toxicidade com diferentes pragas agrícolas que foram enviadas para sequenciamento na empresa GoGenetic.	43
Tabela 11. Identificação das espécies de <i>Bacillus</i> isoladas da rizosferas das espécies botânicas escolhidas ao acaso que foram coletas da etapa 1 de isolamento.....	45
Tabela 12. Identificação das espécies de <i>Bacillus</i> isoladas da rizosferas das espécies botânicas de gramíneas que foram coletas na etapa 2 de isolamento.....	46

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
JUSTIFICATIVA.....	13
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
Características gerais do gênero <i>Bacillus</i>	13
Isolamento de <i>Bacillus</i>	14
Multiplicação de <i>Bacillus</i>	15
Identificação de <i>Bacillus</i>	15
Potencial Inseticida e Fungicida	15
Pragas agrícolas	18
OBJETIVO	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
HIPÓTESE.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
Coleta e isolamento	21
Preservação em papel filtro	23
Bioensaio seletivos dos isolados de <i>Bacillus</i>	26
Preparo das estirpes para realização dos ensaios seletivos de toxicidade.	27
Procedência dos insetos e fungos	28
Bicudo do algodoeiro: <i>Anthonomus grandis</i>	28
Lagartas: <i>Chrysodeixis includens</i> e <i>Spodoptera frugiperda</i>	30
Percevejo: <i>Euschistus heros</i>	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
Coleta e isolamento	35
Toxicidade dos isolados às pragas agrícolas	38
Avaliação da Patogenicidade dos demais isolados de <i>Bacillus</i>	41
Identificação das espécies de <i>Bacillus</i>	42

CONCLUSÕES.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMO

As bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por seu potencial inseticida e fungicida e são utilizadas como pesticidas microbiológicos para o controle de pragas agrícolas. Esses microrganismos apresentam grande diversidade e estão presentes em diversos locais, inclusive na rizosfera das plantas. O objetivo deste trabalho foi prospectar novas cepas do gênero *Bacillus* provenientes da rizosfera de plantas e avaliar sua toxicidade a pragas de importância agrícola, a fim de selecionar novas estirpes com potencial uso no controle biológico. As espécies vegetais das quais as cepas foram obtidas foram selecionadas aleatoriamente em áreas urbanas de Brasília, Distrito Federal sendo pertencentes às espécies *Melinis repens*, *Paspalum notatum*, *Eugenia uniflora*, *Tradescantia pallida purpúrea*, *Mangifera indica*, *Zoysia japonica* e *Axonopus compressus*. No total, 63 estirpes bacterianas foram isoladas a partir da rizosfera das plantas selecionadas e identificadas a nível de espécie utilizando a técnica de rt-PCR e sequenciamento. Dentre as estirpes isoladas, foram identificadas mais de 11 espécies distintas. Essas estirpes foram avaliadas quanto a toxicidade às seguintes pragas de interesse agrícola: *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae), *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), *Fusarium oxysporum* (Hypocreales: Nectriaceae) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Helotiales: Sclerotiniaceae). Vinte e oito estirpes apresentaram toxicidade superior a 70% às pragas testadas. Destacou-se a toxicidade das espécies *Bacillus cereus sensu lato*, (S2961) à *Anthonomus grandis* e *Euschistus heros*; *Bacillus amyloliquefaciens* (S2915) à *Chrysodeixis includens* e aos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum* e *Bacillus thuringiensis* (S2954) à *Spodoptera frugiperda*. Esses microrganismos apresentam potencial para serem utilizados como base de bioinsumos para controle de pragas de interesse agrícola.

Palavras-chave: Controle biológico; estirpes infectivas; inseticida microbiológico; insetos fitófagos; fungos fitopatogênicos.

ABSTRACT

Bacteria of the *Bacillus* genus is known for their insecticidal and fungicidal potential and are used as microbiological pesticides to control agricultural pests. These microorganisms have great diversity and are present in various places, including the rhizosphere of plants. The aim of this study was to prospect for new strains of the genus *Bacillus* from the rhizosphere of plants and to evaluate their toxicity to agriculturally important pests, to select new strains with potential use in biological control. The plant species from which the strains were obtained were randomly selected in urban areas of Brasília, Federal District, and belonged to the species *Melinis repens*, *Paspalum notatum*, *Eugenia uniflora*, *Tradescantia pallida purpúrea*, *Mangifera indica*, *Zoysia japonica* and *Axonopus compressus*. A total of 63 bacterial strains were isolated from the rhizosphere of the selected plants and their species identified using rt-PCR and sequencing. Among the isolated strains, more than 11 distinct species were identified. These strains were evaluated for toxicity to the following pests of agricultural interest: *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), *Fusarium oxysporum* (Hypocreales: Nectriaceae) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Helotiales: Sclerotiniaceae). Twenty-eight strains were more than 70% toxic to the pests tested. The toxicity of *Bacillus cereus sensu lato* (S2961) to *Anthonomus grandis* and *Euschistus heros*, *Bacillus amyloliquefaciens* (S2915) to *Chrysodeixis includens* and the phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and *Bacillus thuringiensis* (S2954) to *Spodoptera frugiperda* stood out. These microorganisms have the potential to be used as a basis for bio-inputs to control pests of agricultural interest.

Keywords: Biological control; infective strains; microbiological insecticide; phytophagous insects; phytopathogenic fungi.

INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos pilares da economia brasileira (CEPEA; CNA, 2023; IPEA, 2023). Nos sistemas de produção extensiva, o controle de insetos-praga é essencial para garantir a produtividade das lavouras. Levantamentos recentes demonstram que as pragas agrícolas ocasionam cerca de 20% a 40% de perdas nas principais culturas exploradas mundialmente, entre elas trigo, arroz, batata, milho e soja (Savary et al., 2019). Em alguns casos, a introdução de novas pragas pode até dizimar completamente as plantas, inviabilizando a produção.

Devido a necessidade de novas estratégias no controle de pragas, preconizadas pela adoção de sistemas de produção sustentáveis, os métodos de controle têm sido reavaliados na última década. Tem-se enfatizado a importância da aplicação de estratégias ecologicamente menos agressivas, que deixem pouco resíduo nos alimentos e preservem a biodiversidade local.

Nesse contexto, o controle biológico surge como uma alternativa eficaz para reduzir as chances de ocorrência de surtos populacionais de pragas (EMBRAPA, 2020). Além da especificidade dos inseticidas microbiológicos, estes produtos também são pouco tóxicos ao ambiente, aos seres humanos e às plantas (MAPA; IBAMA, 2006). O Brasil é referência mundial na utilização de defensivos biológicos, com um total de 552 produtos registrados (AGROFIT, 2023). O uso de inseticidas microbiológicos auxilia na mitigação dos impactos ambientais, reduz a utilização de inseticidas sintéticos e permite controle eficaz de algumas pragas.

Muitas espécies bacterianas são utilizadas no controle biológico, dentre elas as bactérias do gênero *Bacillus* são caracterizadas pelo potencial fungicida e pela produção de toxinas inseticidas. Atualmente, existe uma variedade de produtos comerciais registrados que possuem como princípio ativo *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus pumilus*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus amyloliquefasciens* dentre outros (AGROFIT, 2023)

A fim de encontrar novas estirpes de *Bacillus* com potencial uso para controle biológico, o propósito do presente trabalho foi isolar estirpes de *Bacillus* da rizosfera de plantas pertencentes a diferentes espécies vegetais e avaliar a toxicidade desses isolados às pragas agrícolas de importância econômica.

JUSTIFICATIVA

Dentre as bactérias mais utilizadas no controle biológico, encontram-se bactérias do gênero *Bacillus* que podem ser encontradas em variados ambientes, dentre eles na rizosfera das plantas. A rizosfera das plantas dispõe de uma enorme diversidade de microrganismos pouco explorada, que auxilia na sua sobrevivência, ciclagem de nutrientes e no controle de patógenos. Sabendo desse potencial, o presente trabalho buscou isolar novas cepas bacterianas da rizosfera de diferentes espécies de plantas a fim de prospectar novas estirpes bacterianas e posteriormente avaliar seu potencial para o controle biológico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Características gerais do gênero *Bacillus*

As bactérias desse gênero pertencem à família Bacillaceae, são gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, apresentam formato de bastonetes e são caracterizadas pela formação de esporos, estrutura de resistência responsável pela facilidade de perpetuação das espécies do gênero. Algumas espécies, como o *B. thuringiensis*, produzem inclusões cristalinas que possuem atividade inseticida (Bobrowski et al., 2003; Hofte; Whiteley, 1989).

Demais espécies do gênero foram descritas pelo seu potencial inseticida e fungicida (Khan, 2021) por meio da produção de metabólitos secundários e colonização das raízes das plantas auxiliando seu crescimento e proteção a pragas. Dentre essas espécies de *Bacillus*, podemos citar *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* que apresentam toxicidade a fungos fitopatogênicos (Monnerat et al., 2021).

Pouco se sabe sobre a distribuição de *Bacillus* no ambiente. As espécies do gênero apresentam habilidades fisiológicas que permitem a sobrevivência em uma variedade de ambientes, devido à resistência do esporo ao calor, frio, radiação, dessecação e desinfecção (Turnbull; Kramer; Melling, 1996). Logo, apresentam distribuição cosmopolita (Norris, 1964), podendo ser isoladas de insetos mortos, água, solo, rizosfera de plantas, grãos armazenados dentre outros (Monnerat et al., 2020). São comumente encontradas no solo e podem estar associadas à rizosfera das plantas, onde são denominadas rizobactérias ou bactérias promotoras de crescimento da planta pois auxiliam no crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais, assim como no controle de patógenos (Hashem et al., 2019).

A raiz das plantas libera exsudados e atrai uma enorme variedade de microrganismos que colonizam essa região formando a rizosfera das plantas (Rudrappa et al., 2008). Por meio de mecanismos diretos e indiretos, os microrganismos presentes na rizosfera das plantas auxiliam no desenvolvimento vegetal (Cardoso; Andreote, 2016) e promovem a solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e patogenicidade a insetos e fitopatógenos (Bowen; Rovira, 1999).

Dessa forma, o isolamento de *Bacillus* dessa região é uma alternativa viável para prospectar estirpes com potencial controle de patógenos (Földes et al., 2000; Islam et al., 2016; Kumar; Dubey; Maheshwari, 2012; Sindhu et al. 2016). Não existem muitos registros na literatura de uma associação específica entre espécies botânicas ou manejo do solo e a distribuição de *Bacillus* em sua respectiva rizosfera, em número ou espécie (Coelho et al., 2007). Logo, independente das espécies botânicas ou do manejo do solo do ambiente escolhido para isolamento, pode-se encontrar espécies de *Bacillus* com potencial para controle biológico na rizosfera das plantas.

Existe uma diversidade de trabalhos de isolamento que explora a rizosfera de grandes culturas comerciais como feijão (Kumar; Durbey; Maheshwari, 2012), soja (Prajakta et al., 2019; Wahyudi et al., 2011), trigo (Azaroual et al., 2020; Montoya; Cota; Villalobos, 2019) arroz (Xie; Su; Cui, 1998), milho (Abiala et al., 2015; Bjelić et al., 2018; Gomes et al., 2014), algodão (Chen, et al., 2021; Gajbhiye et al., 2010), cacau (Koua et al., 2020) e tomate (Agrawal; Agrawal, 2013; Ayantola; Fagbohun, 2020; Ayantola; Fagbohun, 2020; Kalam; Basu; Podile, 2020; Karthika; Midhun; Jisha, 2020; Yan et al., 2022; Zhou; Song; Kuipers, 2021). Entretanto, em levantamentos realizados nas plataformas de busca de trabalhos acadêmicos, não detectaram publicações que abordassem o isolamento desse grupo de bactérias da rizosfera de espécies botânicas não comerciais, tais como gramíneas, arbustos e espécies frutíferas.

Isolamento de *Bacillus*

Uma das técnicas utilizadas para o isolamento das espécies do gênero *Bacillus* é por meio de choque térmico, em que a temperatura de 80°C por 12 minutos e em seguida gelo por 5 minutos é capaz de eliminar vários microrganismos e selecionar apenas a estrutura de resistência da espécie, tais como o esporo (World Health Organization, 1985). Esta técnica tem sido amplamente utilizada por pesquisadores no mundo inteiro (Koua et al., 2020; Sharma et al., 2019; Travers; Martin; Reichelderfer, 1987), sendo, portanto, validada cientificamente.

Multiplicação de *Bacillus*

O processo de multiplicação das bactérias do gênero *Bacillus* é dividido em duas etapas. A primeira etapa é denominada crescimento vegetativo e ocorre quando as condições do ambiente estão favoráveis para a germinação do esporo e desenvolvimento de células vegetativas, proporcionando a multiplicação da espécie. Em seguida, diante de um cenário de estresse, ocorre a produção do endósporo dentro da célula, formando o esporângio e dando início à esporulação. Por fim, os esporângios se rompem e os esporos são liberados no meio completando a esporulação. Em algumas espécies e em condições ideais de desenvolvimento, além dos endósporos também são formados cristais dentro do esporângio (Higgins; Dworkin, 2012). Quando inoculadas em meios de cultivo apropriados, específicos para seu desenvolvimento, as espécies de *Bacillus* necessitam normalmente de até 72 horas para atingir seu completo desenvolvimento (Monnerat et al., 2020). É muito importante que as condições nutricionais e processos fermentativos específicos sejam otimizados para que a multiplicação de cada estirpe seja potencializada.

Identificação de *Bacillus*

Existe uma variedade de técnicas de identificação das espécies de *Bacillus*, e estas incluem caracterização morfológica por meio de microscopia óptica e eletrônica, o crescimento em meios seletivos, rt-PCR utilizando primers de espécies conhecidas e sequenciamento. Dentre elas, a técnica mais confiável se baseia na análise molecular por rt-PCR seguida de sequenciamento gênico (Bravo et al., 1998). Isso ocorre, porque a microscopia eletrônica e os meios seletivos direcionam a identificação da espécie, mas não apresentam precisão na identificação. Por outro lado, o rt-PCR e o sequenciamento identificam as espécies por meio da sequência de nucleotídeos de seu material genético e apresentam maior precisão na identificação.

Potencial Inseticida e Fungicida

A primeira estirpe de *B. thuringiensis* que se tem relato foi isolada pelo cientista japonês Shigetane Ishiwata em 1901 a partir de uma larva do bicho da seda (Kim, 1993). Posteriormente, em 1908 foram identificadas ações inseticidas da espécie e em 1915 o isolado

foi denominado *B. thuringiensis* pelo alemão Ernst Berliner (Berliner, 1915). O primeiro bioinseticida comercial chamado Sporeine foi formulado na França em 1938 e apenas em meados de 1950 a comercialização de produtos microbiológicos para o controle de insetos se popularizou (Jacobs, 1950). Mais tarde, em 1957, os Estados Unidos lançaram seu primeiro produto a base de *B. thuringiensis* denominado Thuricide. Por fim, em 1967, *B. thuringiensis* foi reconhecido como o entomopatógeno mais explorado pela indústria no controle biológico (Beegle; Yamamoto, 1992).

O potencial inseticida de *B. thuringiensis* ocorre devido aos cristais liberados durante a esporulação, que contêm toxinas letais a uma diversidade de insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera (Cavaleiro et al., 2005; Ibarra et al., 2003; Monnerat et al., 2005; Praça et al., 2004). Os *Bacillus* apresentam vários mecanismos de controle de patógenos, dentre eles podemos citar a solubilização do cristal de *B. thuringiensis* no pH alcalino do intestino do inseto, promovendo a ativação de protoxinas que se ligam aos receptores das microvilosidades intestinais e causam desequilíbrio osmótico, o que leva o inseto a um quadro semelhante a intoxicação alimentar e posterior morte (Monnerat; Bravo, 2000). As principais toxinas inseticidas produzidas por Bt são as δ -endotoxinas, também conhecidas como toxinas Cry e Cyt (Bravo et al., 1998).

As bactérias do gênero *Bacillus* também são conhecidas pela síntese de metabólitos secundários, com capacidade para produzir diversos compostos antimicrobianos que podem ser aplicados na produção agrícola (Stein, 2005; Monnerat et al., 2020). Os *Bacillus* apresentam de 5 a 8% de seu genoma dedicados à síntese de metabólitos secundários, envolvendo a produção de compostos fungicidas, bactericidas e nematicidas (Stein, 2005; Chen et al., 2009)

A aplicação de inseticidas biológicos no Brasil ocorre há mais de 50 anos e o potencial inseticida das espécies do gênero *Bacillus* se popularizou com a aplicação de inseticidas microbiológicos e com a chegada, regulamentação e liberação das plantas transgênicas no país. Em 2009, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de plantas geneticamente modificadas no mundo com cerca de 21 milhões de hectares plantados e em 2020 a área representava 30 milhões de hectares (SNA, 2020).

Atualmente, encontra-se cultivares geneticamente modificadas de milho, soja, algodão, eucalipto, feijão, trigo e cana de açúcar disponíveis no mercado (EMBRAPA, 2023). A cultura do algodão, por exemplo, apresenta cultivar transgênica desenvolvida a partir da inserção de um gene de *B. thuringiensis* que confere resistência aos insetos (EMBRAPA, 2023). Entretanto,

apesar da eficácia de controle, o uso inadequado dessas tecnologias confere uma pressão de seleção de resistência às pragas e pode vir a selecionar populações resistentes à tecnologia (Waquil; Villela; Foster, 2002). Isso ocorre, pois muitas das pragas alvos dessa tecnologia são polífitas e estão constantemente expostas ao mesmo princípio ativo em variadas culturas, intensificando a pressão de seleção para surgimento de populações resistentes da praga.

Posteriormente, demais espécies do gênero *Bacillus* começaram a apresentar toxicidade a pragas agrícolas, demonstrando não apenas efeito inseticida, como também ação fungicida e nematocida. Vale ressaltar a toxicidades das espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. subtilis* a diversas espécies de fungo (Monnerat et al., 2020). Atualmente, existem fungicidas microbiológicos à base de *Bacillus* registrados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) tais como: Ecoshot®, Quartzo SC® e Serifel/Duravel® com o princípio ativo *B. amyloliquefaciens*; Sonata® com o princípio ativo *B. pumilus*; Bio-Imune® e Biobac® com princípio ativo *B. subtilis* (AGROFIT, 2023).

Os *B. amyloliquefaciens* produzem compostos voláteis que podem auxiliar na inibição do crescimento de fungos, permitindo à planta proteção contra doenças (Yan et al. 2012). Algumas estirpes dessa espécie também podem auxiliar a planta a tolerar o estresse causado por fatores abióticos (Tiwari et al., 2017).

A espécie *B. pumilus* é vastamente aplicada em processos industriais que envolvem a fabricação de alimentos fermentados e tratamento de água ou locais contaminados (Monnerat et al., 2021). Além disso, *B. amyloliquefaciens*, também apresenta atividade fungicida (Dobrzyński et al., 2023)

Os *B. subtilis* são encontrados em diversos ambientes e estão presentes no solo associados a rizosfera das plantas, onde auxiliam no controle de fitopatógenos (Monnerat et al., 2020). A espécie é conhecida pela síntese de metabólitos secundários com capacidade para produzir variados compostos antimicrobianos que podem ser utilizados na produção agrícola (Stein, 2005). Os *B. subtilis* também apresentam produção de biofilme, que permite a colonização das raízes fornecendo inúmeros benefícios para as plantas (Bais; Fall; Vivanco, 2004).

A fim de diversificar as espécies de *Bacillus* com potencial uso para controle biológico, é de suma importância prospectar novas estirpes de *Bacillus* e avaliar seu potencial inseticida e fungicida. O uso de uma maior diversidade de espécies bacterianas no controle biológico

diminui a pressão de seleção de resistência nas pragas e auxilia na preservação das tecnologias existentes.

Vale ressaltar que os inseticidas microbiológicos formulados à base de *Bacillus* são inofensivos aos seres humanos e animais, apresentam especificidade sobre os alvos, preservam a biodiversidade e os inimigos naturais, viabilizam o controle ecológico sem deixar resíduos nos alimentos, promovendo a segurança alimentar (EMBRAPA, 2021).

Pragas agrícolas

As pragas agrícolas de maneira geral comprometem a produção por meio da redução de volume produtivo, deteriorização da qualidade do produto e podem até dizimar completamente um cultivo. Dentre as principais culturas produzidas no Brasil, destaca-se soja, milho, cana-de-açúcar, café e algodão (IBGE, 2022). Uma pesquisa conduzida pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) da ESALQ/USP constatou que o controle inadequado das pragas agrícolas nessas culturas pode causar perdas de 9,5% a 40% da produtividade ou até dizimar a produção das lavouras (CROPLIFE, 2019).

Dentre as inúmeras pragas de importância econômica podemos destacar como as mais relevantes, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), *Fusarium oxysporum* (Hypocreales: Nectriaceae) e *Sclerotinia sclerotiorum* (Helotiales: Sclerotiniaceae)

Nas Américas, *A. grandis*, popularmente conhecido como bicudo-do-algodoeiro, é praga chave da cultura do algodão, podendo causar perdas de até 100% da produção quando não controlado adequadamente (Gabriel, 2016; Cabi, 2020). As injúrias severas se dão ao hábito críptico da fase imatura da praga, que se aloja no interior dos botões florais, flores e maçãs (Azambuja; Degrande, 2014; Bastos et al., 2005). O inseto chegou ao Brasil em 1983 (Barbosa et al., 1983) e desde então é motivo de preocupação aos produtores de algodão. O controle biológico pode ser uma das alternativas para o controle efetivo da praga no país, desde que seja utilizado de maneira sinérgica com outras medidas de controle do manejo integrado de pragas (Bastos; Torres, 2003).

Outra praga importante no Brasil é *C. includens*, conhecida por falsa medideira da soja. As lagartas causam desfolha severa, que apresenta aparência rendilhada, raspam as folhas

quando ainda pequenas e quando adultas destroem completamente as folhas, podendo se alimentar também das hastes (Moscardi et al., 2012). Por ser um inseto polífago, notou-se severa disseminação da espécie e aumento dos prejuízos causados às culturas, principalmente à soja, ao longo de todo o território brasileiro (Specht; De Paula-Moraes; Sosa-Gómez, 2015).

Pode-se destacar também *S. frugiperda*, conhecida por lagarta do cartucho do milho. O inseto é praga chave do milho e atacando também várias outras culturas, tais como algodão, sorgo, soja, alface, tomate, arroz, trigo, entre outros (Montezano et al., 2018). A praga apresenta notável capacidade de dispersão e adaptabilidade podendo reduzir a produção em 34 a 52% (Valicente, 2015)

E. heros, conhecido por percevejo marrom, é uma praga chave da soja (Nunes; Corrêa-Ferreira, 2002). A praga se alimenta da seiva da planta e compromete a formação de grãos e sementes. Além disso, provoca distúrbios fisiológicos na planta, retardando sua maturação e afetando diretamente a produtividade das lavouras (Panizzi; Bueno; Silva, 2012).

F. oxysporum é um fungo presente no solo que penetra pelo sistema radicular e causa murchas e podridões em muitas culturas, podendo levar a planta à morte (Stover; Waite, 1960). O patógeno se popularizou por causar a doença denominada fusariose em bananeira (Gasparotto et al., 2020).

Outro fungo importante é *S. sclerotiorum* que é vulgarmente conhecido por mofo-branco e acomete várias culturas de importância econômica como feijão, tomate e soja (Meyer et al., 2020). O fitopatógeno causa podridões e compromete o cultivo, podendo ocasionar perdas de até 70% da produção quando o manejo é inadequado (Lehner et al., 2017; Meyer et al., 2020).

Diante do considerável número de pragas de importância econômica é indiscutível a necessidade de se desenvolver novas tecnologias que aprimorem seu controle para garantir a produção de alimentos e seus derivados. Tendo em vista o cenário mundial de tentativa de conscientização ambiental é de suma importância o desenvolvimento de produtos de pouco impacto ao meio ambiente e aos seres humanos.

OBJETIVO

Objetivo geral

Prospectar novas cepas do gênero *Bacillus* provenientes da rizosfera das espécies *Melinis repens*, *Paspalum notatum*; *Eugenia uniflora*; *Tradescantia pallida purpúrea*; *Mangifera indica*; *Zoysia japonica*; *Axonopus compressus* e avaliar seu potencial uso no controle biológico das pragas agrícolas *Anthonomus grandis*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda*, *Euschistus heros*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

Objetivos específicos

- Isolar e identificar novas cepas do gênero *Bacillus*.
- Selecionar ao menos uma estirpe tóxica a um dos insetos praga: *Anthonomus grandis*, *Chrysodeixis includens*, *Spodoptera frugiperda* e *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae).
- Selecionar pelo menos uma estirpe tóxica a um dos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

HIPÓTESE

Levanta-se a hipótese de que mesmo em ecossistemas urbanos caracterizados pelo baixo manejo e controle de fertilidade do solo habitam rizobactérias do gênero *Bacillus* com potencial uso no controle biológico de importantes pragas agrícolas. Dessa forma, pode-se isolar uma variedade de espécies bacterianas da rizosfera de espécies botânicas escolhidas ao acaso e em espécies de grama.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em duas etapas de isolamento, denominadas “Etapa 1” e “Etapa 2”. Em seguida, as estirpes isoladas foram armazenadas em papel filtro para posterior realização de ensaios seletivos de toxicidade e identificação das espécies de *Bacillus* isoladas por meio de rt-PCR e sequenciamento.

Coleta e isolamento

Inicialmente foram coletadas raízes de plantas presentes em ambiente urbano do Distrito Federal. As espécies de planta foram escolhidas ao acaso devido à ocorrência cosmopolita do gênero *Bacillus* na rizosfera das plantas. Foram realizadas duas etapas de coleta, primeiramente foram coletadas raízes de espécies botânicas não comerciais escolhidas ao acaso, denominada “Etapa 1” e posteriormente foram coletadas espécies de grama comum em área urbana, denominada “Etapa 2”. A **Tabela 1** apresenta as espécies vegetais, suas respectivas famílias botânicas e as datas de coleta e isolamento de ambas as etapas.

Tabela 1. Espécies coletadas nas Etapa 1 e Etapa 2 e seus respectivos nomes comuns, famílias botânicas, datas de coleta e data de isolamento.

Etapa 1				
Espécie vegetal	Nome comum	Família Botânica	Data de coleta	Data de isolamento
<i>Melinis repens</i>	Capim Natal	Poaceae	21/03/2022	22/03/2022
<i>Paspalum notatum</i>	Grama Batatais	Poaceae	21/03/2022	22/03/2022
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	Myrtaceae	21/03/2022	22/03/2022
<i>Tradescantia pallida purpúrea</i>	Trapoeraba-roxa	Commelinaceae	21/03/2022	22/03/2022
<i>Mangifera indica</i>	Mangueira	Anacardiaceae	21/03/2022	22/03/2022
Etapa 2				
Espécie vegetal	Nome Comum	Família Botânica	Data de coleta	Data de isolamento
<i>Paspalum notatum</i>	Grama batatais	Poaceae	05/07/2022	06/07/2022
<i>Zoysia japonica</i>	Grama esmeralda	Poaceae	05/07/2022	06/07/2022
<i>Axonopus compressus</i>	Grama São Carlos	Poaceae	05/07/2022	06/07/2022

As raízes foram coletadas contendo resto de solo significativo, armazenadas em tubo plástico de 50 mL e levadas ao Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para isolamento das espécies de *Bacillus*.

No laboratório, em câmara de fluxo laminar, Bioseg do Grupo Veco, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada por radiação ultravioleta durante 20 minutos, foram adicionadas 10 mL de solução salina na concentração de 8,5g L⁻¹ no tubo plástico utilizado na coleta e o

material foi agitado utilizando vórtex Mixer, Labnet em velocidade máxima, 2800 rpm, durante 30 segundos permitindo o desprendimento do solo e dos microrganismos presentes na rizosfera das plantas. Uma alíquota de 1 mL da solução salina contendo os microrganismos e o solo foi submetida a choque térmico de 80°C durante 12 minutos e gelo por 5 minutos para eliminar demais espécies e selecionar apenas os esporos de *Bacillus* (World Health Organization, 1985). Desta alíquota de 1 mL que sofreu choque térmico, uma alíquota de 100µL foi inoculada em placas de Petri contendo Meio Embrapa – ME (Monnerat et al., 2007) sólido com o auxílio de uma alça de Drigalski descartável estéril, a fim de espalhar o material e facilitar a obtenção de colônias isoladas (**Figura 1**).



Figura 1. Etapas iniciais do isolamento. A- Diluição do solo presente na raiz da planta em solução salina; B- Choque térmico; C- Plaqueamento do material em meio Embrapa sólido.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 30 °C por 24h para crescimento das espécies de *Bacillus* no meio de cultura. Após esse período, as colônias foram caracterizadas morfológicamente e as que se encontravam isoladas e apresentaram características distintas entre si foram inoculadas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50mL de ME líquido e foram mantidas em incubador rotativo a 200 rpm e 28±2 °C até sua completa esporulação, que ocorreu em aproximadamente 72h. O crescimento das estirpes em meio de cultura líquido foi acompanhado por meio da visualização em microscópio óptico Zeiss modelo Scope.A1 Axio de contraste de fases sob aumento de 1000X permitindo a observação de esporos e inclusões cristalinas, caracterização morfológica das espécies e identificação de possível contaminações.

Para a confirmação da pureza e do isolamento efetivo, as amostras passaram por uma diluição seriada a fim de se obter unidades formadoras de colônia de mesma característica morfológica, confirmando o isolamento completo. As amostras que porventura apresentaram

contaminação, foram isoladas novamente. Posteriormente, as estirpes isoladas foram preservadas em papel filtro.

Preservação em papel filtro

Após a purificação das estirpes isoladas, por meio de microscopia óptica, plaquamento e diluição, foi realizado o armazenamento. O método utilizado foi a armazenagem em papel filtro (Monnerat et al., 2020). Essa técnica baseia-se na imersão de pequenas tiras de papel filtro autoclavadas em suspensão bacteriana completamente esporulada. Após a secagem, as tiras de papel mantêm os esporos conservados, são armazenadas em tubos plásticos criogênicos e podem ser conservadas a temperatura ambiente por muitos anos.

Inicialmente, em câmara de fluxo laminar Bioseg do Grupo Veco, previamente limpa e esterelizada por radiação ultravioleta durante 20 minutos, com auxílio de alça de plástico estéril calibrada (1 μ L) as estirpes isoladas foram inseridas em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio Embrapa líquido e mantidas em incubador rotativo a 200 rpm e $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ até sua completa esporulação, por cerca de 72h. Após esse período, uma alíquota da suspensão bacteriana foi analisada sob microscópio óptico Zeiss modelo Scope.A1 Axio e aumento de 1000X a fim de observar o desenvolvimento da estirpe. Para identificar a pureza da estirpe, as amostras foram estriadas em meio Embrapa sólido e as colônias crescidas foram observadas (Monnerat et al., 2020)

Em câmara de fluxo laminar Bioseg do Grupo Veco, previamente limpa com álcool a 70% e esterilizada por radiação ultravioleta durante 20 minutos, 40 tiras de papel de aproximadamente 2cm x 0,5cm, previamente autoclavadas em placa de Petri, foram inseridas em Erlenmeyer de 125 mL contendo a 50 mL da suspensão bacteriana completamente esporulada. As tiras de papel permaneceram imersas na suspensão bacteriana por 30 minutos. Após esse período, com auxílio de uma pinça estéril os papéis foram retirados do Erlenmeyer e distribuídos em placas de Petri previamente autoclavadas. A pinça foi flambada sempre que necessário e utilizou-se apenas uma para cada estirpe. As placas de Petri contendo as pequenas tiras foram deixadas na mesma câmara de fluxo laminar em temperatura ambiente até a completa secagem das tiras, que demandou aproximadamente cinco horas. Posteriormente, com auxílio das pinças autoclavadas e flambadas, as pequenas tiras foram armazenadas em tubos plásticos criogênicos estéreis. Para cada estirpe isolada foram armazenados dez tubos

criogênicos, contendo quatro tiras de papel filtro cada (**Figura 2**). Os tubos foram devidamente identificados por etiquetas impressas contendo o nome e a data de armazenamento (Monnerat et al., 2020).



Figura 2. Armazenamento das estirpes inoculadas em papel filtro

Identificação dos isolados de *Bacillus*

As estirpes isoladas foram primeiramente caracterizadas morfológicamente por meio de microscopia de contraste de fases e ao final de seu isolamento foram identificadas em nível de espécie por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (rt-PCR). Um dos isolados, que melhor controlou as pragas agrícolas foi encaminhado para sequenciamento.

Para a realização da rt-PCR, inicialmente cada estirpe isolada foi cultivada durante 12h. Para isso, em câmara de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada em radiação ultravioleta durante 20 minutos, o papel filtro de cada estirpe isolada foi inoculada em meio Embrapa sólido e as placas foram vedadas com filme de PVC e incubadas em estufa a 30 °C por 12h.

No dia seguinte, em câmara de fluxo laminar Bioseg do Grupo Veco, as colônias foram coletadas com auxílio de alça de plástico estéril calibrada (10 µL) e o material de cada placa foi dividido em dois tubos de polipropileno de 1,5 mL e adicionados à 200 µL de tampão de extração 1x e 4 µL de lisozima (25mg mL⁻¹) que ajuda na quebra das membranas da bactéria. Os tubos foram agitados em placa agitadora Labnet modelo GyroMini Nutating Mixer por aproximadamente três horas e em seguida colocados em banho maria digital da SolidSteel a 60°C durante 10 minutos. Após esfriar, foram adicionados 500 µL de etanol 100% em cada tubo e o DNA precipitado em álcool foi coletado com o auxílio de pipeta Pasteur e adicionado em novo tubo plástico (**Figura 3**).

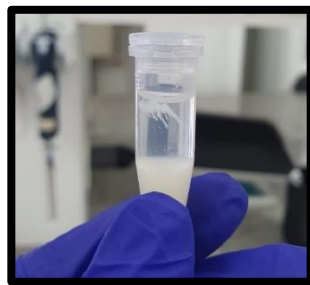


Figura 3. Precipitação de DNA em etanol.

O material genético coletado passou por outras duas lavagens, por meio da adição de 500 μL de etanol 70% e centrifugação (centrífuga de modelo Rotanta 460R da Hettich Zentrifugen) por 5 minutos a 11.500 rpm em temperatura abaixo de 10°C. Por fim, o pellet decantado foi colocado para secar durante 1 hora sobre a bancada previamente limpa com álcool 70% e forrada com papel toalha. Posteriormente, foram adicionados 2 μL de RNase e 100 μL de tampão TE 0,1x em cada tubo e as amostras foram armazenadas em geladeira em temperatura abaixo de 5°C até a realização da rt-PCR.

Para finalizar essa etapa, ocorreu a quantificação do DNA, utilizando-se 200 μL de Quantifluor e 2 μL de cada amostra de DNA extraída, esse material foi quantificado pelo aparelho Quantus™ Fluorometer. Após a quantificação, a amostra de DNA extraída foi diluída com auxílio de água destilada autoclavada a uma concentração de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em um volume de 20 μL . O DNA diluído na concentração de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi posteriormente utilizado na realização do rt-PCR.

Em cabine exclusiva para preparo das reações de PCR da Hoefer™, modelo PCR Workstation 1000, previamente esterilizada em radiação ultravioleta durante 20 minutos, foram adicionados a placa contendo 96 poços os seguintes componentes: 1 μL do DNA extraído de cada estirpe, 1 μL do controle positivo da espécie testada e os demais reagentes do kit GoTaq qPCR Master Mix, conforme as concentrações indicadas no manual do fabricante.

O rt-PCR ocorreu no equipamento Step OnePlus™ System da Applied Biosystems (PLUS; MANUAL, 2006) por meio de ciclos alternados de temperatura. Inicialmente, o sistema foi programado para ciclo inicial de 95°C por 20 segundos, em seguida foram 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60+₋₂°C por 30 segundos, conforme os *primers* utilizados. Seguidamente, uma rampa de temperatura, em modo *step and hold*, de 60+₋₂°C a 95°C por 15 segundos. Por fim, para a formação da curva de *melting* programou-se um gradiente de temperatura de 60°C

por um minuto e em seguida 95°C por 15 segundos (Rocha, 2022). A identificação das espécies ocorreu por meio da comparação da curva de *melting* do controle positivo com a estirpe que buscava ser identificada.

É importante ressaltar que a metodologia para desenho, padronização, confecção e validação dos iniciadores, assim como a sequência de cada um deles estão descritas em Rocha (2022). Para a identificação das espécies por meio de rt-PCR os iniciadores, ou *primers*, utilizados na reação visavam identificar as seguintes espécies: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus luti*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus*.

Alguns dos isolados que apresentaram toxicidade superior a 70% às pragas agrícolas foram encaminhados para sequenciamento. Para isso, o material genético desses isolados foi extraído e enviado pelo correio para a empresa GoGenetic (Paraná, Brasil) e, apenas um dos isolados, para a Macrogen (Coreia do Sul).

Bioensaio seletivos dos isolados de *Bacillus*

A avaliação da toxicidade de cada estirpe isolada se deu por meio da realização de ensaios de toxicidade que permitiram o contato da espécie bacteriana com as pragas agrícolas. De maneira geral, os ensaios ocorrem por meio da imersão, contato direto ou confronto da praga com a estirpe isolada. Para isso, nos ensaios com insetos foi formulada uma dieta para alimentação do inseto, conforme suas preferências. Para a realização dos ensaios de toxicidade com fungos fitopatogênicos, a estirpe bacteriana isolada entrou em confronto direto com o fungo em placa de Petri contendo meio Embrapa sólido adicionado a meio Luria Bertani – LB (Sezonov; Joseleau-Petit; D'ari, 2007). A toxicidade deste microrganismo foi estimada a partir da porcentagem de mortalidade dos insetos ou a partir da análise visual do confronto direto entre as estirpes bacterianas isoladas e os fungos fitopatogênicos atingidas até o momento avaliação do ensaio, que varia conforme cada espécie de praga.

Preparo das estirpes para realização dos ensaios seletivos de toxicidade.

Os ensaios seletivos foram realizados com uma alíquota da suspensão bacteriana. Para isso foi preciso inocular os isolados, previamente armazenados no papel filtro, em meio Embrapa líquido em incubador rotativo a 28 ± 2 °C sob agitação contínua de 200rpm por 72h. para seu completo desenvolvimento (Monnerat et al., 2020).

Em câmara de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada em radiação ultravioleta por 20 minutos, os tubos criogênicos foram abertos e as pequenas tiras de papel filtro foram inseridas em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio Embrapa líquido, previamente autoclavado. O frasco de vidro foi tampado com rolha, vedado com plástico filme e levado ao incubador rotativo a 28 ± 2 °C sob agitação contínua de 200rpm por 72h. Após esse período, foi realizada microscopia das amostras para a identificação de pureza ou possíveis contaminações e, então, a suspensão bacteriana estava pronta para ser dividida em alíquotas e encaminhada para a realização dos ensaios de toxicidade.

Novamente, sob câmara de fluxo laminar Bioseg do Grupo Veco, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada em radiação ultravioleta por 20 minutos, a suspensão bacteriana de cada estirpe isolada foi dividida em alíquotas conforme o volume demandado para realização de cada ensaio. Por exemplo, os ensaios de lagartas demandaram apenas 1 mL de suspensão bacteriana, entretanto, os ensaios de bicudo demandaram 10 mL de suspensão bacteriana para ser realizado, conforme detalhamento apresentado para cada praga avaliada. Após a divisão da suspensão bacteriana em alíquotas, as alíquotas foram armazenadas em congelador até a realização do ensaio.

As alíquotas de suspensão bacteriana não apresentam uma concentração específica e as quantidades utilizadas nos ensaios de toxicidade seguiram metodologias já registradas na literatura para os insetos praga *A. grandis* (Martins et al., 2005) *C. Includens*, *S. frugiperda* (Monnerat et al., 2020) e *E. heros* (Stefanello, 2021) e aos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum* (Montalvão et al., 2021). É importante ressaltar que as quantidades definidas são padronizadas para ensaios de seleção qualitativa, como um primeiro parâmetro de seleção. Caso o isolado não apresente toxicidade significativa nesse primeiro ensaio, provavelmente não apresentará viabilidade para desenvolvimento de produto inseticida.

Procedência dos insetos e fungos

Todos os insetos usados nos ensaios foram provenientes do setor de criação da própria Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Plataforma de Criação de Plantas e Insetos (PCIP). Os indivíduos foram criados em condições controladas e sob alimentação em dietas artificiais descritas por Shmidt et al. (2001), salvo os percevejos que são criados sob alimentação em dieta natural a base de vagens, sementes e folhas de boldo (Silva et al.,2008). Os fungos fitopatogênicos foram fornecidos pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Bicudo do algodoeiro: *Anthonomus grandis*

O ensaio com o bicudo do algodoeiro seguiu o protocolo descrito em Martins et al. (2005) e consistiu na alocação da larva neonata do inseto em dieta artificial que contém em sua composição a estirpe bacteriana e posterior avaliação da mortalidade. A toxicidade da estirpe é diretamente proporcional à mortalidade do inseto praga ao final do ensaio.

Inicialmente foi feito o preparo da dieta. Para isso, os ingredientes autoclaváveis da dieta (**Tabela 2**) foram pesados dentro dos béckeres e adicionados à água destilada. No tratamento controle foram adicionados 40 mL de água destilada e nos demais tratamentos foram adicionados 30 mL de água. Cada bécker de plástico armazenou o material de uma única dieta. Os béckeres foram tampados com papel alumínio, vedados com plástico filme e levados para autoclavagem com os demais utensílios utilizados na realização do ensaio, como placas de Petri, espátulas, ponteiros e pincéis.

Tabela 2: Ingredientes autoclaváveis e não autoclaváveis utilizados para dieta de *A. grandis*.

DIETA <i>Anthonomus grandis</i>	
Ingredientes	Quantidade
Ágar	0,8g
Levedo de cerveja	1,2g
Proteína da soja	2,0g
Gérmem de trigo	1,2g
Pharmamédia	0,8g
Ingredientes não autoclaváveis	
Ácido ascórbico	0,05g
Ácido sórbico	0,4g

Açúcar	1,2g
Nipagin	0,04g
Sais minerais	0,2g

Em câmara de fluxo laminar, Bioseg - Grupo Veco, anteriormente higienizada com álcool 70% e esterelizada com radiação ultravioleta durante 20 minutos, foram adicionados a dieta recém autoclavada os demais componentes: 200 µL de solução vitamínica, os ingredientes não autoclaváveis (**Tabela 2**) e uma alíquota de 10 mL da suspensão bacteriana. Com auxílio de uma espátula previamente autoclavada, os ingredientes foram homogenizados e a dieta foi vertida em placas de Petri previamente esterelizadas.

Após a secagem da dieta nas placas, as dietas foram divididas em quatro quadrantes e foram feitos 15 orifícios em cada um deles. Com auxílio de um pincel e sob aumento de microscópio estereoscópico (lupa) foi alocada uma larva neonata da praga próxima ao segundo ínstar em cada orifício (**Figura 4**). A mortalidade larval foi avaliada após sete dias a partir da contagem dos insetos mortos (Monnerat et al., 2000; Praça et al., 2004). Salvo a pesagem dos ingredientes e a autoclavagem do material, o ensaio foi inteiramente realizado em câmara de fluxo laminar.



Figura 4. Etapas do ensaio de bicudo do algodoeiro. A: Inseto praga imaturo. B: Dieta vertida e separada em quadrantes com orifícios para a alocação das larvas. C: Leitura do ensaio após 7 dias.

Lagartas: *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera frugiperda*

A metodologia de ensaios seletivos para lagartas está descrita em Monnerat et al. (2020) e consiste na interação direta da larva, próxima ao segundo instar, com a estirpe isolada. Os ensaios foram feitos da mesma forma para as diferentes espécies, divergindo apenas quanto aos ingredientes da dieta de cada uma delas. Foram feitas duas dietas diferentes, para cada espécie. A primeira, denominada dieta 1, foi vertida em placas com 24 células, onde as lagartas permanecem nas primeiras 48h até a primeira avaliação. A segunda, denominada dieta 2, é cortada em cubos e distribuída em copos de plástico, onde as lagartas que sobreviveram à primeira avaliação permanecem até a segunda avaliação de mortalidade. Os ingredientes de cada dieta artificial variam conforme a espécie de lagarta e estão descritos na **Tabela 3** e **4**.

Tabela 3: Ingredientes da dieta 1 das lagartas *C. includens* e *S. frugiperda*.

DIETA 1			
<i>Spodoptera frugiperda</i>		<i>Chrysodeixis includens</i>	
Ingredientes	Quantidade	Ingredientes	Quantidade
Feijão cru triturado	34,23g	Feijão branco cru triturado	18,75g
Levedo de cerveja	10,32g	Gérmen de trigo	15g
Gérmen de trigo	16,5g	Farelo de soja	7,5g
Ágar	4,14g	Leite integral em pó	7,5g
Água destilada	375 ml	Levedura de cerveja	9,4g
Ingredientes não autoclaváveis		Ágar	7,5g
Ácido ascórbico	1,04g	Água destilada	350g
		Ingredientes não autoclaváveis	
		Ácido ascórbico	0,9g
		Solução vitamínica	2,8 ml

Tabela 4: Ingredientes da dieta 2 das lagartas *C. includens* e *S. frugiperda*.

DIETA 2			
<i>Spodoptera frugiperda</i>		<i>Chrysodeixis includens</i>	
Ingredientes	Quantidade	Ingredientes	Quantidade
Feijão cru triturado	165g	Feijão branco cru triturado	75g
Levedo de cerveja	50,5g	Gérmen de trigo	60g
Gérmen de trigo	79,2g	Farelo de soja	30g
Ágar	30g	Leite integral em pó	30g
Água destilada	1200ml	Levedura de cerveja	37,5g
Ingredientes não autoclaváveis		Ágar	30g
Ácido ascórbico	5,2g	Água destilada	1200ml
Ácido sórbico	1,2g	Ingredientes não autoclaváveis	
Nipagin	1,2g	Ácido ascórbico	3,5g
Formol 10%	10,5ml	Ácido sórbico	1,8g
		Nipagin	3g
		Formol 36,5 - 38%	3,6ml
		Solução vitamínica	9 ml

Para a realização do ensaio, inicialmente, os ingredientes secos das duas dietas foram pesados em béckeres de plástico, adicionados a 375 mL de água destilada cada e após devidamente tampados com papel alumínio e vedados com plástico filme foram levados para a autoclavagem (atingindo temperatura acima de 120°C durante 20 minutos) com os demais utensílios utilizados no ensaio.

Em câmara de fluxo laminar, Labconco modelo 3621, previamente limpa com álcool 70%, as placas de plástico contendo 24 células e suas respectivas tampas foram distribuídas e esterilizadas em radiação ultravioleta durante 20 minutos, enquanto as dietas e os demais materiais foram autoclavados. Ao finalizar a autoclavagem, os ingredientes não autoclaváveis foram adicionados nas dietas ainda quentes (aproximadamente 50 °C). Com auxílio de bécker estéril, a dieta 1 foi vertida nas placas de 24 células. Por outro lado, a “Dieta 2” foi vertida em recipiente de plástico e após resfriada foi armazenada em geladeira até o momento de sua utilização.

Após a secagem e endurecimento da dieta 1 foi adicionada uma alíquota de 35 μ L da suspensão bacteriana em cada uma das 24 células. As placas permaneceram no fluxo durante 30 minutos para secagem da suspensão bacteriana e em seguida foi colocada uma lagarta da espécie praga próxima ao segundo ínstar, em cada uma das células. Cada placa é referente ao ensaio de uma única estirpe para uma única espécie do inseto, contendo 24 repetições (**Figura 5**).

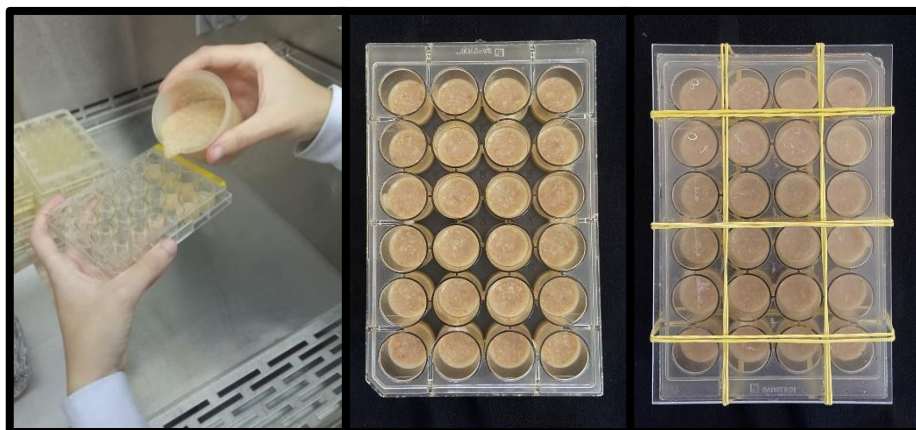


Figura 5. Dieta 1 sendo vertida para ensaio com lepidópteras e placas prontas que foram levadas para a sala de crescimento.

A primeira avaliação da mortalidade foi realizada 48h após o contato dos insetos com a suspensão bacteriana e os insetos ainda vivos foram transferidos para copos de poliestireno de 50 mL contendo cubos da dieta 2, sem adição de suspensão bacteriana, para avaliar o efeito crônico da estirpe isolada. Após 7 dias do início do ensaio foi feita a segunda avaliação de mortalidade por meio da contagem dos insetos ainda vivos (**Figura 6**).



Figura 6. Copos de poliestireno com dieta 2 em sala de crescimento.

Percevejo: *Euschistus heros*

A metodologia do ensaio seletivo de percevejo está descrita em Stefanello (2021). Para a realização do ensaio, dez insetos da espécie *E. heros*, próximos ao segundo instar, foram alocados em placa de cultivo celular contendo algodão umedecido com a suspensão bacteriana e a dieta do inseto. A avaliação e a contagem dos insetos foi realizada três vezes ao longo do ensaio, a cada 48h. A toxicidade das estirpes é diretamente proporcional à mortalidade do inseto.

O ensaio inicia-se com o preparo da dieta do inseto. Todos os ingredientes (**Tabela 5**) foram pesados, moídos separadamente e posteriormente misturados até formar uma massa homogênea. A massa da dieta foi cortada de forma padronizada em pedaços de 1 cm x 1,5 cm x 0,5 cm e levada para secagem em estufa a 60°C durante 4h. Em seguida, a dieta foi colocada em potes plástico e armazenada em geladeira.

Tabela 5: Ingredientes da dieta de *E. heros* para alimentação do inseto.

Ingredientes	Quantidade (g)
Amendoim	35
Sacarose	5
Vagens de feijão	30
Sementes de soja	10
Sementes de girassol	10
Gérmem de trigo	10
Nipagin	1
Ácido ascórbico	0,4

As placas de cultivo celular da marca TPP, contendo 9 cm de diâmetro e dois poços em seu interior, tiveram seu fundo revestido por papel filtro e foram levadas para esterilização em radiação ultravioleta por 20 minutos em câmara de fluxo laminar, Labconco modelo 36213, previamente limpa com álcool 70%. Após esse período, em um dos poços de cada placa foi alocado um disco de algodão previamente autoclavado e umedecido com água destilada

autoclavada para facilitar seu manuseio e no outro foi adicionado um pedaço da dieta do inseto. As placas ficaram mais 20 minutos em radiação ultravioleta em câmara de fluxo laminar.

O algodão foi umedecido com 1 mL de água no tratamento controle e 1 mL da suspensão bacteriana nos demais tratamentos. Dez percevejos, próximos ao segundo ínstar, foram adicionados em cada placa. As placas foram armazenadas em sala climatizada à temperatura de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 14 horas. Foram feitas três avaliações de mortalidade a cada 48h. Na primeira e na segunda avaliação o algodão de cada placa foi umedecido novamente com 1 mL de água autoclavada, no tratamento controle, e 1 mL da suspensão bacteriana nos demais tratamentos. O ensaio foi realizado em triplicata, ou seja, utilizou-se três repetições para cada estirpe.

Fungos *Fusarium oxysporum* e *Sclerotinia sclerotiorum*

O ensaio com espécies de fungos fitopatogênicos está descrito em Montalvão et al. (2021) e consiste no confronto direto entre a estirpe bacteriana e o fungo em meio Embrapa sólido adicionado a meio Luria Bertani – LB (Sezonov; Joseleau-Petit; D'ari, 2007). Para isso, iniciou-se o ensaio com o preparo do meio, que foi vertido em placas de Petri de plástico, vedadas com filme PVC e levadas à estufa por 72h a fim de evitar a utilização de placas contaminadas no ensaio.

Para serem utilizados nos bioensaios os fungos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum* foram inoculados em meio LB para crescimento por determinado tempo, de acordo com a espécie do patógeno, *F. oxysporum* pelo tempo médio de 7 dias para crescimento e *S. sclerotiorum* demandou em média 3 dias para crescimento. Após o crescimento, o meio sólido contendo o fungo foi cortado em discos de 1 cm de diâmetro com o auxílio de uma ponteira autoclavada de 1000 μL .

Em câmara de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70% e esterilizada com radiação ultravioleta durante 20 minutos, um disco de 1 cm de diâmetro colonizado com o fungo foi alocado no centro da placa e uma alíquota de 80 μL da suspensão bacteriana foi dividida em quatro pontos nas extremidades da placa (20 μL em cada ponto). Para *S. sclerotiorum* a leitura foi feita após 3 dias e para *F. oxysporum* após 7 dias. A toxicidade foi analisada a partir da comparação entre o crescimento da praga e da estirpe (**Figura 7**), observando se um deles foi capaz de inibir o crescimento do outro. A toxicidade da estirpe ao fungo foi definida por meio

de análise visual entre o crescimento do fungo e da estirpe bacteriana utilizando o trabalho de Montalvão et al. (2021) como referência.

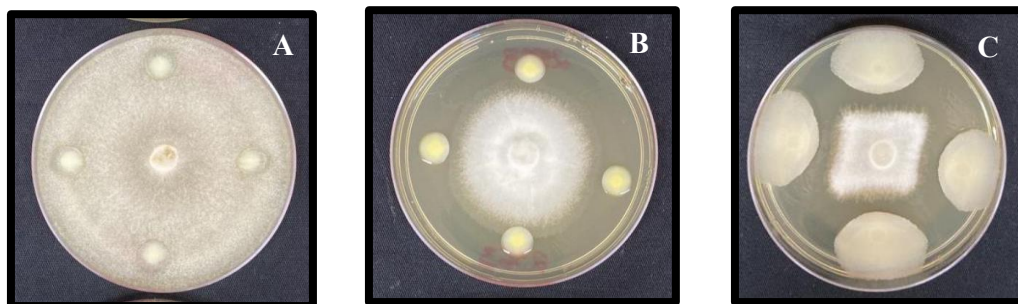


Figura 7: Exemplo de análise visual da toxicidade da estirpe bacteriana em confronto direto com os fungos fitopatogênicos. A: o isolado bacteriano apresentou 0% de toxicidade ao fungo. B: o isolado bacteriano apresentou 50% de toxicidade ao fungo. C: o isolado bacteriano apresentou 75% de toxicidade ao fungo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Coleta e isolamento

Foram realizadas duas etapas de coleta e isolamento. Na Etapa 1, das cinco espécies vegetais coletadas em que o solo da rizosfera foi coletado, foram isoladas um total de 40 estirpes, sendo 7 isoladas de *Melinis repens*; 10 de *Paspalum notatum*; 7 de *Eugenia uniflora*; 7 de *Tradescantia pallida purpure* e 9 de *Mangifera indica*. As espécies apresentaram aproximadamente o mesmo número de isolados (**Tabela 6**) e porcentagem semelhante (**Figura 8**) de estirpes de *Bacillus* isoladas.

Tabela 6. Número de estirpe de *Bacillus* isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais na etapa 1 de isolamentos

Número de isolados por espécie	
Espécie	Quant.
<i>Melininis repens</i>	7
<i>Paspalum notatum</i>	10
<i>Eugenia uniflora</i>	7
<i>Tradescantia pallida purpúre</i>	7
<i>Mangifera indica</i>	9
TOTAL	40

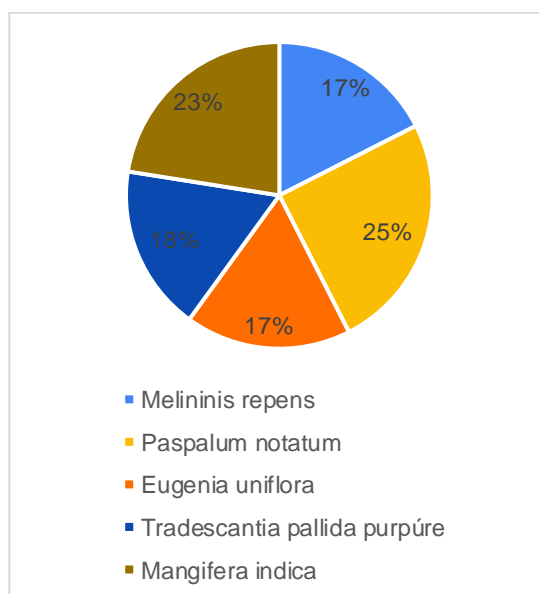


Figura 8. Porcentagem de estirpes de *Bacillus* isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais na etapa 1 de isolamento.

Na Etapa 2, dentre as espécies de gramíneas coletadas foram isoladas um total de 23 estirpes distintas, sendo 9 provenientes de *P. notatum*; 9 de *Z. japonica* e 5 de *A. compressus* (**Tabela 7**). Como demonstrado na **Figura 9**, obteve-se 39% do total de isolados provenientes da espécie *P. notatum*, 39% de *Z. japonica* e 22% de *A. compressus*.

Tabela 7. Número de estirpe de *Bacillus* isoladas da rizosfera de diferentes espécies vegetais na etapa 2 de isolamentos.

Número de isolados por espécie	
Espécie	Quant.
<i>Paspalum notatum</i>	9
<i>Zoysia japonica</i>	9
<i>Axonopus compressus</i>	5
TOTAL	23

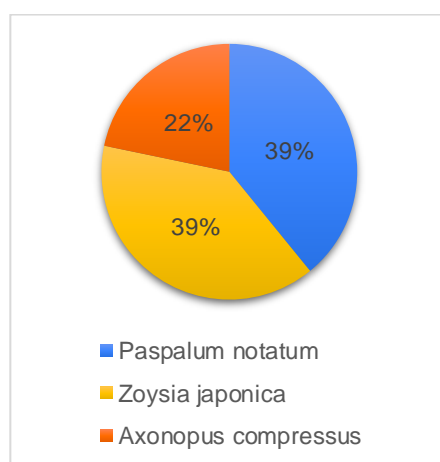


Figura 9. Porcentagem de estirpes de *Bacillus* isoladas da rizosfera diferentes espécies vegetais na etapa 2 de isolamento.

A presença de *Bacillus* na rizosfera das plantas é influenciada por uma série de fatores ambientais como variação de temperatura, pH, luz e composição nutricional fornecida pelos exsudados da planta (Santoyo et al., 2017).

Muitos trabalhos recentes abordam o isolamento de espécies do gênero *Bacillus* provenientes da rizosfera de diversas espécies botânicas. Contudo, é mais frequente o isolamento de *Bacillus* primordialmente da rizosfera de espécies comerciais como trigo, algodão, soja, cacau e principalmente tomate (Azaroual et al., 2020; Chen et al., 2021; Kalam; Basu; Podile, 2020; Karthika; Midhun; Jisha, 2020; Koua et al., 2020; Prajakta et al., 2019; Zhou; Song; Kuipers, 2021). A grande maioria destas pesquisas teve por objetivo avaliar o potencial das espécies bacterianas na promoção do crescimento de plantas, por meio da avaliação da produção de ácido indolacético, solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio (Azaroual et al., 2020; Huang et al., 2019; Kalam; Basu; Podile, 2020; Koua et al., 2020; Montoya Cota; Villalobos, 2019; Zhao

et al., 2014;) e controle de fungos fitopatogênicos (Cheng et al., 2019; Han et al., 2019; Lu et al., 2021; Sharma et al., 2019).

Ademais, muitos trabalhos publicados relatam o isolamento de microrganismos da rizosfera de espécies botânicas que sobrevivem em condições de estresse hídrico, a fim de entender a microbiota que auxilia na sobrevivência da planta. Nesses trabalhos descreve-se o isolamento de espécies tais como *Priestia megaterium*, *Bacillus tequilensis*, *Priestia aryabhatai* e *Bacillus xiamenensis* (Abdelmoteleb; Gonzalez-Mendoza, 2020; Haroon, et al., 2021; Lu et al., 2021).

Diante disso, o presente trabalho apresenta uma perspectiva inovadora ao prospectar estirpes de *Bacillus* isoladas da região rizosférica de espécies pouco exploradas comercialmente. Além disso, o estudo da toxicidade desses isolados a pragas agrícolas também pode ser considerado inovador, dado que a grande maioria dos estudos anteriores visavam prospectar estirpes dessa região para aplicar na promoção do crescimento de plantas e no controle de fitopatógenos.

Toxicidade dos isolados às pragas agrícolas

A identificação das estirpes referente às Etapa 1 e 2 de isolamento e porcentagem de mortalidade para cada um dos alvos testados estão compilados nas tabelas abaixo (**Tabela 8 e Tabela 9**).

Tabela 8. Identificação dos isolados de *Bacillus* prospectados na etapa 1 de isolamento e sua respectiva toxicidade às pragas agrícolas selecionadas. Estão identificados por Na* os valores não avaliados.

Isolado	Identificação da Espécie	Toxicidade Etapa 1					
		Porcentagem de Mortalidade de cada praga (%)					
		<i>A. grandis grandis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. includens</i>	<i>E. heros</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
S2914	<i>Bacillus sp.</i>	33	17	29	3	0	0
S2915	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	67	79	92	40	75	75
S2916	<i>Bacillus sp.</i>	52	38	58	60	0	0
S2917	<i>Bacillus pumilus</i>	43	63	67	63	50	0
S2918	<i>Bacillus sp.</i>	45	25	38	53	0	0
S2919	<i>Bacillus pumilus</i>	72	67	17	53	0	0
S2920	<i>Bacillus sp.</i>	60	71	46	33	0	0
S2921	<i>Bacillus sp.</i>	35	33	17	30	0	0
S2922	<i>Bacillus mycoides</i>	67	29	33	7	0	0
S2923	<i>Bacillus sp.</i>	Na*	88	33	7	0	0
S2924	<i>Bacillus sp.</i>	55	25	42	35	0	0
S2925	<i>Bacillus sp.</i>	53	42	33	37	0	0
S2926	<i>Bacillus sp.</i>	Na*	21	4	43	0	0
S2927	<i>Bacillus sp.</i>	70	17	4	53	0	0
S2928	<i>Bacillus sp.</i>	65	29	21	50	0	0
S2929	<i>Bacillus toyonensis</i>	72	29	54	33	0	0
S2930	<i>Bacillus toyonensis</i>	70	40	29	63	0	0
S2931	<i>Bacillus sp.</i>	43	38	33	77	0	50
S2932	<i>Bacillus toyonensis</i>	57	54	17	50	0	25
S2933	<i>Bacillus nitratireducens</i>	50	58	25	53	0	25
S2934	<i>Bacillus toyonensis</i>	48	42	42	83	0	50
S2935	<i>Bacillus sp.</i>	28	42	17	77	0	25
S2936	<i>Prestia megaterium</i>	37	25	42	50	0	0
S2937	<i>Priestia megaterium</i>	37	58	38	93	50	25
S2938	<i>Bacillus thuringiensis</i>	42	50	33	83	25	25
S2939	<i>Bacillus thuringiensis</i>	42	58	38	93	75	25
S2940	<i>Bacillus thuringiensis</i>	50	83	29	87	0	50
S2941	<i>Bacillus sp.</i>	40	67	46	47	0	0
S2942	<i>Bacillus pumilus</i>	67	50	54	80	0	50
S2943	<i>Bacillus sp.</i>	43	25	25	53	0	50
S2944	<i>Bacillus subtilis</i>	50	88	46	77	0	25
S2945	<i>Bacillus cereus</i>	62	33	29	17	0	0
S2946	<i>Bacillus cereus</i>	40	25	46	60	0	0
S2947	<i>Bacillus cereus</i>	53	75	25	10	0	25
S2948	<i>Bacillus cereus</i>	52	17	38	7	0	0
S2949	<i>Bacillus sp.</i>	57	33	50	10	0	25
S2950	<i>Bacillus cereus</i>	42	33	38	7	0	25
S2951	<i>Bacillus cereus</i>	52	17	50	13	0	0
S2952	<i>Bacillus sp.</i>	Na*	29	54	57	0	25
S2953	<i>Bacillus sp.</i>	Na*	29	50	3	0	25

Tabela 9. Identificação dos isolados de *Bacillus* prospectados na etapa 2 de isolamento e sua respectiva toxicidade às pragas agrícolas selecionadas.

Isolado	Identificação da Espécie	Toxicidade Etapa 2					
		Porcentagem de Mortalidade de cada praga (%)					
		<i>A. grandis grandis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. includens</i>	<i>E. heros</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
S2954	<i>Bacillus thuringiensis</i>	70	100	83	40	0	0
S2955	<i>Bacillus thuringiensis</i>	67	96	46	30	0	0
S2956	<i>Bacillus toyonensis</i>	55	33	29	43	0	0
S2957	<i>Bacillus sp.</i>	53	54	79	43	0	0
S2958	<i>Bacillus toyonensis</i>	57	33	38	13	0	0
S2959	<i>Bacillus thuringiensis</i>	72	88	58	87	0	0
S2960	<i>Bacillus sp.</i>	62	75	42	87	0	0
S2961	<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	100	96	50	93	0	0
S2962	<i>Bacillus sp.</i>	70	79	29	53	0	0
S2963	<i>Bacillus sp.</i>	73	42	63	50	0	0
S2964	<i>Bacillus sp.</i>	53	25	33	43	0	0
S2965	<i>Bacillus luti</i>	82	63	63	50	0	0
S2966	<i>Bacillus thuringiensis</i>	55	14	21	87	0	0
S2967	<i>Bacillus sp.</i>	48	12	75	30	0	0
S2968	<i>Bacillus sp.</i>	62	14	46	10	0	75
S2969	<i>Bacillus sp.</i>	50	20	63	3	0	25
S2970	<i>Bacillus sp.</i>	37	17	71	10	0	25
S2971	<i>Bacillus sp.</i>	67	18	29	3	0	25
S2972	<i>Bacillus sp.</i>	45	19	50	50	0	25
S2973	<i>Bacillus sp.</i>	57	20	38	23	0	0
S2974	<i>Bacillus sp.</i>	67	20	83	7	0	25
S2975	<i>Bacillus sp.</i>	48	23	79	27	0	50
S2976	<i>Bacillus sp.</i>	65	19	33	10	0	25

Conforme as **Tabelas 8 e 9**, destaca-se o potencial das espécies: *B. cereus sensu lato* (S2961) com toxicidade de 100% a *A. grandis*; *B. amyloliquefaciens* (S2915) com toxicidade de 92% a *C. includens*; *B. thuringiensis* (S2954) com toxicidade de 100% a *S. frugiperda*; *B. cereus sensu lato* (S2961) com toxicidade de 93% a *E. heros* e *B. amyloliquefaciens* (S2915) com toxicidade de 75% aos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

A toxicidade das estirpes de *B. thuringiensis* (S2954) a diferentes pragas já foi descrita na literatura. Uma diversidade de trabalhos evidenciam a toxicidade de *Bacillus thuringiensis* a insetos da ordem Lepdoptera, especialmente *S. frugiperda* (Monnerat et al., 2007; Polanczyk; Silva; Fiuza, 2000).

A respeito da toxicidade de *B. amyloliquefaciens* (S2915) aos lepdopteros *S. frugiperda* e fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*, já foi relatado o potencial pesticida dessa espécie de *Bacillus* a essas pragas, corroborando o resultado apresentado no presente

trabalho (Hatem et al., 2017; Khedher et al., 2017; Rocha et al., 2023; Vitullo et al., 2012; Zhao et al., 2014).

Por fim, encontra-se na literatura relatos da toxicidade de espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* (S2961) e sua toxicidade às ordens Coleoptera e Hemiptera. Contudo, tem-se poucos registros na literatura da toxicidade de espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* às pragas *A. grandis* (Ferreira, 2020) e *E. heros*. Diante disso, o presente trabalho contribui com uma informação única e permite o posterior desenvolvimeto de tecnologias inseticidas com espécie *B. cereus sensu lato*. Para isso, é preciso, por meio de estudos posteriores, identificar os genes presentes na espécie que confere toxicidade.

Avaliação da Patogenicidade dos demais isolados de *Bacillus*

No **Gráfico 1** está representada a porcentagem de isolados prospectados que apresentaram toxicidade superior a 70% nos ensaios de toxicidade, totalizando 28 isolados que demonstram toxicidade às pragas. Muitos trabalhos de prospecção de estirpes consideram toxicidade igual ou superior a 50% de mortalidade (Martins et al., 2005; Praça et al., 2004).

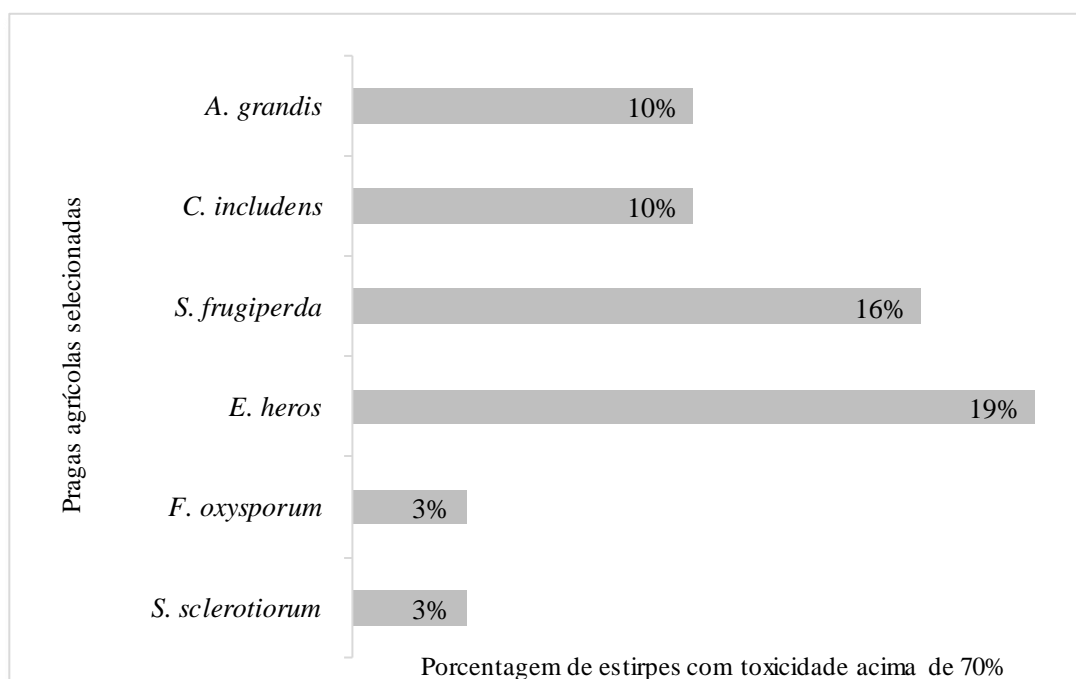


Gráfico 1. Porcentagem de estirpes prospectadas em ambas as etapas de isolamento que, após a realização dos ensaios de toxicidade, apresentaram toxicidade superior a 70% às pragas agrícolas selecionadas.

Dentre os demais isolados que se destacaram, as seguintes espécies apresentaram toxicidade superior a 70%: *B. lutti* (S2965), *B. pumilus* (S2942) e *Bacillus toyonensis* (S2929 e S2930) apresentaram toxicidade a *A. grandis*; *B. amyloliquefaciens* (S2915) apresentou toxicidade a *C. includens* e *S. frugiperda*; e a espécie pertencente ao grupo *B. cereus sensu lato* (S2961) apresentou toxicidade a *E. heros*.

Não se tem relatos na literatura a respeito das espécies *B. lutti* (S2965), *B. pumilus* (S2942) e *B. toyonensis* (S2929 e S2930) no controle de *A. grandis*. Apesar dos isolados não terem apresentado 100% de toxicidade ao bicudo do algodoeiro, 70% de mortalidade é um valor considerável e indica potencial do isolado no controle deste inseto praga. Pode ser que este isolado esteja expressando de forma pouco significativa o gene que lhe confere característica entomopatogênica.

Identificação das espécies de *Bacillus*

Os isolados foram inicialmente identificados por meio da técnica rt-PCR. Contudo, uma parcela significativa das estirpes isoladas não foi identificada (70% dos isolados) por nenhum dos primers de espécies de *Bacillus* utilizados na reação de rt-PCR. Esses isolados não identificados foram denominados por “*Bacillus* sp.”

Posteriormente, 13 (21% do total de isolados) dentre as 63 estirpes isoladas, que não foram identificadas por meio da técnica de rt-PCR, foram enviadas para sequenciamento pela empresa GoGenetic. As estirpes foram escolhidas devido a sua toxicidade superior às demais no controle de pragas agrícolas. A **Tabela 10** apresenta o resultado do sequenciamento das estirpes selecionadas.

Tabela 10. Identificação das estirpes de *Bacillus* prospectadas em ambas as etapas de isolamento e submetidas a testes de toxicidade com diferentes pragas agrícolas que foram enviadas para sequenciamento na empresa GoGenetic.

Sequenciamento GoGenetic			
Identificação da amostra	Isolado	Identificação da espécie	Espécie botânica
GO012938	S2940	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>
GO012939	S2933	<i>B. nitratireducens</i>	<i>M. indica</i>
GO012940	S2955	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Z. japonica</i>
GO012941	S2961	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>
GO012942	S2938	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>
GO012943	S2936	<i>P. megaterium</i>	<i>M. indica</i>
GO012944	S2966	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Z. japonica</i>
GO012945	S2944	<i>B. subtilis</i>	<i>M. indica</i>
GO012946	S2937	<i>P. megaterium</i>	<i>M. indica</i>
GO012947	S2942	<i>B. pumilus</i>	<i>T. p. purpúrea</i>
GO012948	S2939	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>
GO012949	S2959	<i>B. thuringiensis</i>	<i>A. compressus</i>
GO012950	S2954	<i>B. thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>

Dentre as estirpes sequenciadas oito foram identificadas como *B. thuringiensis*; duas como *Priestia megaterium*, uma como *B. subtilis* e uma como *B. pumilus*. Esse resultado demonstra a ocorrência primordialmente de *B. thuringiensis* dentre os isolados. Mesmo com a utilização de *primer* para identificação de *B. thuringiensis* no rt-PCR, muitas estirpes não foram identificadas como *B. thuringiensis* por meio da técnica, muito provavelmente isso ocorreu devido à ineficácia do *primer* utilizado na reação de rt-PCR ou devido à técnica de sequenciamento da empresa.

Para realizar a identificação das espécies, a empresa GoGenetic utilizou a técnica de identidade de nucleotídeo média (ANI) utilizando o programa Fast Ani. A técnica baseia-se na comparação de genomas completos ou parciais estabelecendo porcentagem de semelhança entre eles. São considerados pertencentes a mesma espécie genomas com ANI superior a 95%.

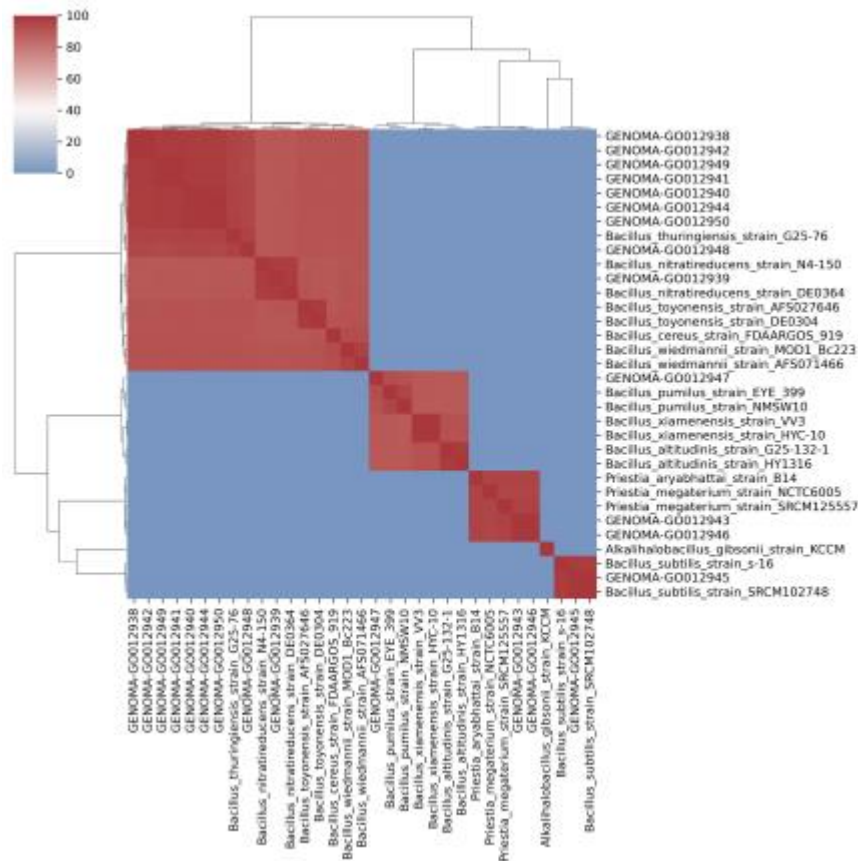


Figura 100. Porcentagem de semelhança das estirpes de *Bacillus* prospectadas da rizosfera que foram enviadas para o sequenciamento na empresa GoGenetic e foram identificadas com genoma de referência.

A **Figura 10** apresenta a porcentagem de semelhança das espécies identificadas com o genoma de referência. Todas as espécies apresentaram porcentagem de semelhança com os genomas de referência acima de 95% , exceto a espécie *B. Pumilus* que apresentou apenas 92,8% de semelhança (**Figura 10**).

Após a realização de rt-PCR com isolado S2961, descartou-se a possibilidade da estirpe ser pertencente à espécie *B. thuringiensis*. Contudo, o sequenciamento realizado pela GoGenetic surpreendeu ao identificar a estirpe S2961 por *B. thuringiensis*. Devido à essa divergência de identificação, a estirpe S2961 foi sequenciada novamente pela empresa Macrogen.

A **Figura 12** apresenta a árvore filogenética proveniente da identificação da estirpe S2961, após o sequenciamento pela empresa Macrogen, comparada às demais espécies do banco de bactérias entomopatogênicas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

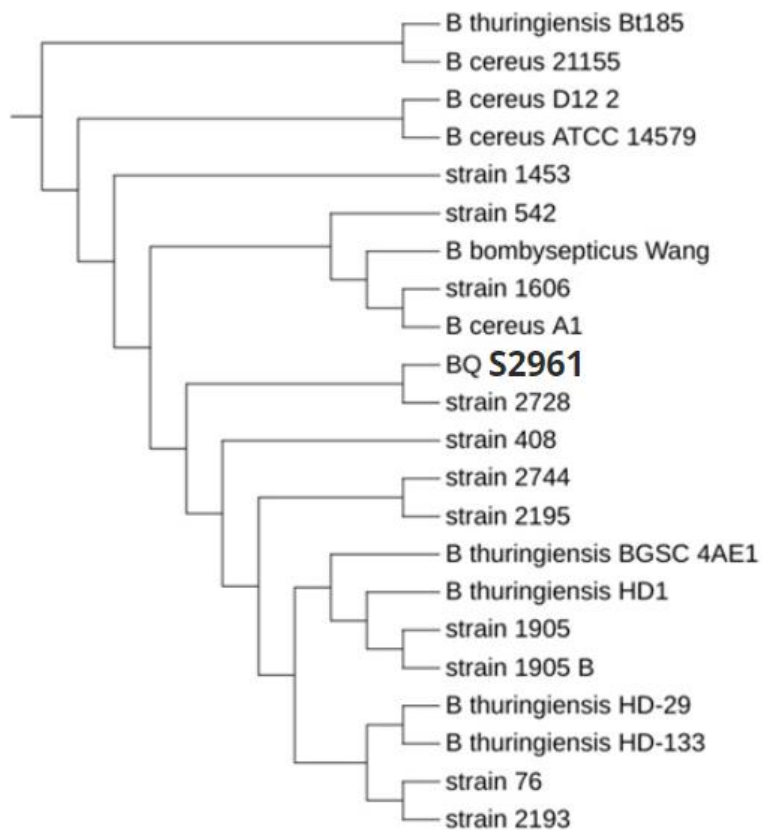


Figura 11. Árvore filogenética da identificação da estirpe S2961 isolado da rizosfera da espécie botânica *Paspalum notatum*. A identificação ocorreu por meio da comparação do sequenciamento da estirpe com as demais espécies do banco de dados da Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

Tendo por base o novo sequenciamento, a estirpe S2961 foi identificada como uma espécie pertencente ao grupo *B. cereus sensu lato* (Figura 12). Muito provavelmente a divergência na identificação anterior do isolado S2961 ocorreu devido às diferentes estratégias de sequenciamento utilizadas pelas duas empresas e às semelhanças taxonômicas entre os grupos *B. thuringiensis* e *B. cereus sensu lato* que dificultam a identificação.

Por fim, a identificação da espécie das estirpes referente as duas etapas de isolamento estão compiladas nas tabelas abaixo (**Tabela 11** e **Tabela 12**).

Tabela 11. Identificação das espécies de *Bacillus* isoladas da rizosferas das espécies botânicas escolhidas ao acaso que foram coletas da etapa 1 de isolamento.

Toxicidade Etapa 1								
Porcentagem de Mortalidade de cada praga (%)								
Isolado	Identificação da Espécie	Espécie Botânica	<i>A. grandis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. includens</i>	<i>E. heros</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
S2914	<i>Bacillus sp.</i>	<i>M. repens</i>	33	17	29	3	0	0
S2915	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>M. repens</i>	67	79	92	40	75	75
S2916	<i>Bacillus sp.</i>	<i>M. repens</i>	52	38	58	60	0	0
S2917	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>M. repens</i>	43	63	67	63	50	0
S2918	<i>Bacillus sp.</i>	<i>M. repens</i>	45	25	38	53	0	0
S2919	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>M. repens</i>	72	67	17	53	0	0
S2920	<i>Bacillus sp.</i>	<i>M. repens</i>	60	71	46	33	0	0
S2921	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	35	33	17	30	0	0
S2922	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>P. notatum</i>	67	29	33	7	0	0
S2923	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	Na*	88	33	7	0	0
S2924	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	55	25	42	35	0	0
S2925	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	53	42	33	37	0	0
S2926	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	Na*	21	4	43	0	0
S2927	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. uniflora</i>	70	17	4	53	0	0
S2928	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. uniflora</i>	65	29	21	50	0	0
S2929	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>E. uniflora</i>	72	29	54	33	0	0
S2930	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	70	40	29	63	0	0
S2931	<i>Bacillus sp.</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	43	38	33	77	0	50
S2932	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	57	54	17	50	0	25

S2933	<i>Bacillus nitratireducens</i>	<i>M. indica</i>	50	58	25	53	0	25
S2934	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>M. indica</i>	48	42	42	83	0	50
S2935	<i>Bacillus sp.</i>	<i>M. indica</i>	28	42	17	77	0	25
S2936	<i>Prestia megaterium</i>	<i>M. indica</i>	37	25	42	50	0	0
S2937	<i>Priestia megaterium</i>	<i>M. indica</i>	37	58	38	93	50	25
S2938	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>	42	50	33	83	25	25
S2939	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>	42	58	38	93	75	25
S2940	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>	50	83	29	87	0	50
S2941	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. uniflora</i>	40	67	46	47	0	0
S2942	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	67	50	54	80	0	50
S2943	<i>Bacillus sp.</i>	<i>M. indica</i>	43	25	25	53	0	50
S2944	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>M. indica</i>	50	88	46	77	0	25
S2945	<i>Bacillus cereus</i>	<i>M. indica</i>	62	33	29	17	0	0
S2946	<i>Bacillus cereus</i>	<i>P. notatum</i>	40	25	46	60	0	0
S2947	<i>Bacillus cereus</i>	<i>E. uniflora</i>	53	75	25	10	0	25
S2948	<i>Bacillus cereus</i>	<i>E. uniflora</i>	52	17	38	7	0	0
S2949	<i>Bacillus sp.</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	57	33	50	10	0	25
S2950	<i>Bacillus cereus</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	42	33	38	7	0	25
S2951	<i>Bacillus cereus</i>	<i>M. indica</i>	52	17	50	13	0	0
S2952	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. uniflora</i>	Na*	29	54	57	0	25
S2953	<i>Bacillus sp.</i>	<i>T. p. purpúrea</i>	Na*	29	50	3	0	25

Tabela 12. Identificação das espécies de *Bacillus* isoladas da rizosferas das espécies botânicas de gramíneas que foram coletas na etapa 2 de isolamento.

Isolado	Identificação da Espécie	Espécie Botânica	Toxicidade Etapa 2					
			Porcentagem de Mortalidade de cada praga (%)					
			<i>A. grandis</i>	<i>S. frugiperda</i>	<i>C. includens</i>	<i>E. heros</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
S2954	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>P. notatum</i>	70	100	83	40	0	0
S2955	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Z. japonica</i>	67	96	46	30	0	0
S2956	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>P. notatum</i>	55	33	29	43	0	0
S2957	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	53	54	79	43	0	0
S2958	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>P. notatum</i>	57	33	38	13	0	0
S2959	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>A. compressus</i>	72	88	58	87	0	0
S2960	<i>Bacillus sp.</i>	<i>A. compressus</i>	62	75	42	87	0	0
S2961	<i>Bacillus cereus sensu lato</i>	<i>P. notatum</i>	100	96	50	93	0	0
S2962	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	70	79	29	53	0	0
S2963	<i>Bacillus sp.</i>	<i>A. compressus</i>	73	42	63	50	0	0
S2964	<i>Bacillus sp.</i>	<i>A. compressus</i>	53	25	33	43	0	0
S2965	<i>Bacillus luti</i>	<i>P. notatum</i>	82	63	63	50	0	0
S2966	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Z. japonica</i>	55	14	21	87	0	0
S2967	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	48	12	75	30	0	0
S2968	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	62	14	46	10	0	75
S2969	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	50	20	63	3	0	25
S2970	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	37	17	71	10	0	25
S2971	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	67	18	29	3	0	25
S2972	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Z. japonica</i>	45	19	50	50	0	25
S2973	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	57	20	38	23	0	0
S2974	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	67	20	83	7	0	25
S2975	<i>Bacillus sp.</i>	<i>P. notatum</i>	48	23	79	27	0	50
S2976	<i>Bacillus sp.</i>	<i>A. compressus</i>	65	19	33	10	0	25

As tabelas 11 e 12 apresentam o total de estirpes de cada espécie de *Bacillus* propeccadas, sendo: oito de *B. thuringiensis*; seis de *B. toyonensis*; seis de *B. cereus*; duas de *B. pumilus*; uma de *B. mycoides*; uma de *B. nitratreducens*; duas de *P. megaterium*; uma de *B. subtilis*; uma de *B. amyloliquefaciens*; um de *B. luti*; e uma espécie pertencente ao grupo *B. cereus sensu lato* totalizando 30 estirpes identificadas em 11 espécies distintas dentre os 63 isolados. Os demais 33 isolados não foram identificados. O resultado demonstram uma pluralidade de espécies de *Bacillus* presentes na rizosfera das plantas selecionadas.

CONCLUSÕES

- Foram isoladas 63 novas estirpes do gênero *Bacillus*, destas 30 estirpes foram identificadas em 11 espécies distintas por rt-PCR e/ou sequenciamento.

- A partir das estirpes prospectadas, por meio de ensaios de toxicidade, foi selecionada pelo menos uma estirpe que apresentou toxicidade para cada um dos insetos pragas, conforme o objetivo do trabalho. Foram prospectadas as espécies: *Bacillus* sp. (S2961) que apresentou toxicidade a *A. grandis*; *B. amyloliquefaciens* (S2915) que apresentou toxicidade a *C. includens*; *Bacillus* sp. (S2954) que apresentou toxicidade a *S. frugiperda* e *Bacillus* sp. (S2961) que apresentou toxicidade a *E. heros*.

- A partir das estirpes prospectadas, por meio de ensaios de toxicidade, foi selecionada a espécie *B. amyloliquefaciens* (S2915) que apresentou toxicidade aos fungos fitopatogênicos *F. oxysporum* e *S. sclerotiorum*.

Com base no que foi apresentado, podemos concluir que mesmo em ambiente urbano e em espécies botânicas variadas podemos encontrar uma diversidade de microrganismos do gênero *Bacillus* na rizosfera que apresentam potencial significativo (acima de 70% de toxicidade) no controle de pragas agrícolas. Por meio deste trabalho, podemos perceber que espécies pouco usadas comercialmente como *B. luzzi*, *B. pumilus*, *B. toyonensis* e *P. megaterium* apresentam potencial no controle de insetos praga. Dessa forma, a prospecção de estirpes do gênero *Bacillus* e, bem como o teste de seu potencial pesticida se apresenta como uma estratégia proeminente a fim de diversificar as tecnologias existentes no mercado que são primordialmente produzidas com *B. thuringiensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOTELEB, A., & GONZALEZ-MENDOZA, D. Isolation and identification of phosphate solubilizing *Bacillus* spp. from *Tamarix ramosissima* rhizosphere and their effect on growth of *Phaseolus vulgaris* under salinity stress. **Geomicrobiology Journal**, 37(10), 901-908, 2020.

ABIALA, M. A., ODEBODE, A. C., HSU, S. F., & BLACKWOOD, C. B. Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern Nigerian soils. **Applied and environmental microbiology**, 81(14), 4736-4743, 2015.

AGRAWAL, D. P. K.; AGRAWAL, S.. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 2, n. 10, p. 406-417, 2013.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxico Fitossanitários – Consulta aberta**, 2023. Disponível em: < agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons >. Acesso em: Nov. 2023.

ÁVILA, C. J. Ocorrência da lagarta *Rachiplusia nu* em soja Bt em Mato Grosso do Sul. **Embrapa Agropecuário Oeste**, 2023.

AYANTOLA, K. J., & FAGBOHUN, E. D. Enzymatic activity of *Rhizobacillus* isolated from tomato rhizosphere. **Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**, 4(3), 11-19, 2020.

AZAROUAL, S. E., HAZZOUMI, Z., MERNISSI, N. E., AASFAR, A., MEFTAH KADMIRI, I., & BOUIZGARNE, B. Role of inorganic phosphate solubilizing *bacilli* isolated from moroccan phosphate rock mine and rhizosphere soils in wheat (*Triticum aestivum* L) phosphorus uptake. **Current Microbiology**, 77, 2391-2404, 2020.

AZAMBUJA, R., & DEGRANDE, P. E. (2014). Trinta anos do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, 81, 377-410.

BAIS, H. P., FALL, R., & VIVANCO, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant physiology**, 134(1), 307-319.

BARBOSA, S.; BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M. J.; BENGOLA, O. G. Relatório sobre ocorrência do bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis* Boheman, “Boll Weevil” no Brasil e recomendações para sua erradicação. **Campina Grande: EMBRAPA – CNPA**, 12p. (EMBRAPA – CNPA. Documentos, 21), 1983.

BASTOS, C. S.; TORRES, J. B. Controle Biológico como Opção no Manejo de Pragas do Algodoeiro. **Circular técnica - Embrapa**, v. 72, p. 1–29, 2003.

BASTOS, C. S.; PEREIRA, M.J.B.; TAKIZAWA, E.K.; OHL, G.; AQUINO, V.R. Bicudo do algodoeiro: identificação, biologia, amostragem e táticas de controle. **Campina Grande: Embrapa Algodão**, 2005. 31p. (Embrapa Algodão. Circular técnica, 79).

BEEGLE, C.C. & T. YAMAMOTO. 1992. Invitation paper (c.p. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **Can. Entomol.** 124: 587-616.

BERLINER E. Über die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp, **Journal of applied entomology** 1915.

BJELIĆ, D., MARINKOVIĆ, J., TINTOR, B., & MRKOVAČKI, N. Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 49(1), 88-98, 2018.

BOBROWSKI, V. L. et al. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas *Bacillus thuringiensis* genes: an approach to confer insect resistance to plants. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 843–850, 2003.

BOWEN G. D., ROVIRA A. D. The Rhizosphere And Its Management To Improve Growth. **Advances in Agronomy**, v. 66, 1999.

BRAVO, A. et al. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4965–4972, 1998.

CABI. *Anthonomus grandis* (Mexican cotton boll weevil), 2020. Disponível em: < <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.5735> > Acesso em: Nov. 2023.

CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. Microbiologia do solo. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 225, 2016.

CAVALEIRO H.; PRAÇA L. B.; MARTINS E. S.; MEDEIROS P. T.; GOMES, A. C. M. M.; MONNERAT R. G. Novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* testadas contra larvas de insetos da ordem Lepidoptera e Diptera. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa recursos Genético e Biotecnologia** 87, v. 87, p. 1–22, 2005.

CEPEA e CNA. **Pib do agro cresce 8,36% em 2021; participação no pib brasileiro chega a 27,4%**, 2023. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/pib-agro-cepea-pib-do-agro-cresce-8-36-em-2021-participacao-no-pib-brasileiro-chega-a-27-4.aspx#:~:text=Diante%20do%20bom%20desempenho%20do,52%2C63%25%2C%20respectivamente>>. Acesso em: Nov. 2023.

Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süßmuth, R., ... & Borris, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of biotechnology**, 140(1-2), 27-37.

CHEN, Z. Y., ABUDUAINI, X., MAMAT, N., YANG, Q. L., WU, M. J., LIN, X. R., ... & ZHAO, H. X. Genome sequencing and functional annotation of *Bacillus* sp. strain BS-Z15 isolated from cotton rhizosphere soil having antagonistic activity against *Verticillium dahliae*. **Archives of Microbiology**, 203, 1565-1575, 2021.

CHENG, X., JI, X., GE, Y., LI, J., QI, W., & QIAO, K. Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol effects on maize stalk rot. **Phytopathology**, 109(4), 571-581, 2019

COELHO, L. F., FREITAS, S. D. S., MELO, A. M. T. D., & AMBROSANO, G. M. B. (2007). Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 31, 1413-1420.

CROPLIFE BRASIL, **Estudo mostra os impactos econômicos do não controle de pragas nas lavouras**, 2019. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/estudo-mostra-os-impactos-economicos-do-nao-controle-de-pragas-nas-lavouras/> > Acesso em: Jan. 2023

CTNBio. Comissão técnica nacional de biossegurança. **Parecer técnico - Liberação comercial**, 2015. Disponível em: <http://ctnbio.mctic.gov.br/documents/566529/2172308/Parecer+relatores+vegetal+ambiental+Jesus.pdf/c1c2fad8-0f2e-4648-9d3f-7afa70d95d8c;jsessionid=A8C48A8129A7745CB1468941CC4006BD.columba?version=1.0&previewFileIndex=>>. Acesso em: Mai. 2023.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Controle Biológico de Pragas da Agricultura**, 2020.

EMBRAPA, **Resistência de lagartas à soja Bt: pesquisadores alertam para o uso indiscriminado de inseticidas**, 2021 - Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/67219091/resistencia-de-lagartas-a-soja-bt-pesquisadores-alertam-para-o-uso-indiscriminado-de-inseticidas>>. Acesso em Mar.2023

EMBRAPA, **Transgenia: quebrando barreiras em prol da agropecuária brasileira**, 2023. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-transgenicos/sobre-o-tema>> Acesso em Mai.2023

FERREIRA A. D. C. D. L. **Isolamento e caracterização de Bacillus e Lysinibacillus com potencial para controle de pragas agrícolas e insetos vetores**. Tese (Doutorado e Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, 2020

FÖLDES, T., BANHEGYI, I., HERPAI, Z., VARGA, L., & SZIGETI, J. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms. **Journal of applied microbiology**, 89(5), 840-846, 2000.

GABRIEL, D. O bicudo do algodoeiro. **Documento Técnico**, v. 25, p. 1–20, 2016.

GAJBHIYE, A., RAI, A. R., MESHARAM, S. U., & DONGRE, A. B. Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 26, 1187-1194, 2010.

GASPAROTTO, L. et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 tropical. **Embrapa**, v. 1, p. 02–18, 2020.

GOMES, E. A., SILVA, U. D. C., MARRIEL, I. E., DE OLIVEIRA, C. A., & LANA, U. G. D. P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista brasileira de Milho e Sorgo**, 13(1), 69-81, 2014

GRANDE, C. Bicudo do Algodoeiro: Identificação, Biologia, Amostragem e Táticas de Controle. **Circular Técnica, Embrapa Algodão** p. 1–31, 2005.

HAN, L., WANG, Z., LI, N., WANG, Y., FENG, J., & ZHANG, X. *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 suppresses *Fusarium* wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**, 136, 55-66, 2019.

HASHEM, A. et al. Saudi Journal of Biological Sciences *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291–1297, 2019.

HAROON, U., LIAQUAT, F., KHIZAR, M., AKBAR, M., SALEEM, H., ARIF, S., ... & MUNIS, M. F. H. Isolation of halotolerant bacteria from rhizosphere of Khewra salt mine halophytes and their application to induce salt tolerance in wheat. **Geomicrobiology Journal**, 38(9), 768-775, 2021.

HATEM FOUAD, LI HONGJIE, DING YANMEI, YU BAOTING, AHMED EL-SHAKH, GHULAM ABBAS, MO JIANCHU. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* to control filarial vector *Culex pipiens pallens* and its antimicrobial activity. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology** 45:7, pages 1369-1378, 2017.

HIGGINS D., DWORKIN J., Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation, **FEMS Microbiology Reviews**, Volume 36, Issue 1, January 2012, Pages 131–148,

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 242–255, 1989.

HUANG, F. L., ZHANG, Y., ZHANG, L. P., WANG, S., FENG, Y., & RONG, N. H. Complete genome sequence of *Bacillus megaterium* JX285 isolated from *Camellia oleifera* rhizosphere. **Computational Biology and Chemistry**, 79, 1-5, 2019.

IBARRA, J. E. et al. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5269–5274, 2003.

IBGE - Instituto Brasileiro de Pesquisa e Estatística. **Produção Agropecuária**. Disponível em: < <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/> > Acesso em: Dez. 2023

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. **Agropecuária brasileira : evolução, resiliência e oportunidades**, 2023. Disponível em: <<https://www.ipea.gov.br/portal/publicacao-item?id=d623fb0c-1ed1-4c15-bcc6-b785180fc3d8>>. Acesso em: Nov. 2023.

ISLAM, S., AKANDA, A. M., PROVA, A., ISLAM, M. T., & HOSSAIN, M. M. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. **Frontiers in microbiology**, 6, 1360, 2016.

JACOBS, S. E. Bacteriological Control of the Flour Moth, *Ephesia kuehniella* Z. **Proceedings of the Society for Applied Bacteriology**, v. 13, n. 2, p. 83–91, 1950.

KALAM, S., BASU, A., & PODILE, A. R. Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. **Heliyon**, 6(8), e04734, 2020.

KARTHIKA, S., MIDHUN, S. J., & JISHA, M. S. A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. **Microbial pathogenesis**, 142, 104049, 2020.

KHAN, M., SALMAN, M., JAN, S. A., & SHINWARI, Z. K. (2021). Biological control of fungal phytopathogens: A comprehensive review based on *Bacillus* species. **MOJ Biol. Med**, 6, 90-92.

KHEDHER, S. B., BOUKEDI, H., DAMMAK, M., KILANI-FEKI, O., SELLAMI-BOUDAWARA, T., ABDELKEFI-MESRATI, L., & TOUNSI, S. Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae. **Journal of invertebrate pathology**, 144, 11-17, 2017.

KIM L. **Advanced engineered pesticide**, página 283, 1993. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=5dvZtLN1bfcC&oi=fnd&pg=PA283&dq=Shigetane+Ishiwata+em+1901+&ots=1SZfAqyYOK&sig=JVpIA2BPZyZS2jzk8uNs59ig8s#v=onepage&q=Shigetane%20Ishiwata%20em%201901&f=false>>. Acesso em: Set. 2022.

KOUA, S. H., N'GOLO, D. C., ALLOUE-BORAUD, W. M., KONAN, F., & DJE, K. M.. *Bacillus subtilis* strains isolated from cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) Rhizosphere for their use as potential plant growth promoting rhizobacteria in Côte d'Ivoire. **Current Microbiology**, 77, 2258-2264, 2020.

KUMAR, P.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, 2012.

LEHNER, M. S., PETHYBRIDGE, S. J., MEYER, M. C., & DEL PONTE, E. M. (2017). Meta-analytic modelling of the incidence–yield and incidence–sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. *Plant Pathology*, 66(3), 460-468.

LU, +C16P., JIANG, K., HAO, Y. Q., CHU, W. Y., XU, Y. D., YANG, J. Y., ... & ZHAO, H. X. Profiles of *Bacillus* spp. isolated from the rhizosphere of *Suaeda glauca* and their potential to promote plant growth and suppress fungal phytopathogens. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e IBAMA - **Instrução Normativa Conjunta nº 03/2006**. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/inc-03-2006-biologicos> > Acesso em: Set. 2022.

MARTINS, E. S., PRAÇA, L. B., DUMAS, V. F., SONE, E. H., WAGA, I. C., GOMES, A. C. M., ... & MONNERAT, R. G. Estudo da atividade e caracterização bioquímica e molecular de estirpes de *Bacillus thuringiensis* tóxicas ao bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman, 1983). **Boletim de pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia**, 2005.

MEYER, M. C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2019/2020 – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. **Embrapa soja**, n. 165, p. 1–10, 2020.

MONNERAT, R.G.; DIAS, S.C.; OLIVEIRA NETO, O.B. de; NOBRE, S.D.; SILVA-WERNECK, J.O.; SÁ, M.F.G. de. Criação massal do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* em laboratório. Brasília: **Embrapa-Cenargen**, 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 46).

MONNERAT, R. & A. BRAVO. Proteínas bioinseticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência, p. 163-200. In I.S. Melo & J.L. Azevedo (eds.), Controle biológico. **Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente**, 388p, 2000.

MONNERAT, R. G. et al. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains effective against mosquitoes. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 103–106, 2005.

MONNERAT, R. G., BATISTA, A. C., DE MEDEIROS, P. T., MARTINS, E. S., MELATTI, V. M., PRAÇA, L. B., ... & BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, 41(3), 291-295, 2007

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, v. 1, p. 46, 2020.

MONTALVÃO, S. C., DE CASTRO, M. T., BLUM, L. E., MONNERAT, R. G. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* with *Bacillus* spp strains. **Journal of Agric Science**, 13(9), 2021

MONTOYA, R. I. R., COTA, F. I., VILLALOBOS, S. S.. Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. **3 Biotech**, 9, 1-5, 2019.

MONTEZANO, D. G. et al. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, v. 26, n. 2, p. 286–300, 2018.

MOSCARDI, F. et al. Artrópodes que atacam as folhas da soja. **Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**, n. May 2014, p. 860, 2012.

NORRIS, J. R. The Classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 27, n. 3, p. 439–447, 1964.

NUNES, M. C.; CORRÊA-FERREIRA, B. S. Danos causados à soja por adultos de *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), sadios e parasitados por *Hexacladia smithii* Ashmead (Hymenoptera: Encyrtidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 1, p. 109–113, 2002.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; SILVA, F. A. C. da. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Ed.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 335-420.

PRAÇA, L. B. et al. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11–16, 2004.

POLANCZYK, R. A., SILVA, R. F. P. D., & FIUZA, L. M. (2000). Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Brazilian Journal of Microbiology**, 31, 164-166.

PRAJAKTA, B. M., SUVARNA, P. P., RAGHVENDRA, S. P., & ALOK, R. R. Potential biocontrol and superlative plant growth promoting activity of indigenous *Bacillus mojavensis* PB-35 (R11) of soybean (*Glycine max*) rhizosphere. **SN Applied Sciences**, 1(10), 1143, 2019.

ROCHA, G. T. **Caracterização fenotípica, bioquímica e molecular de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* com potencial atividade entomocida, fungicida e solubilizadora de fosfato.** 2022. xxvii, 375 f., il. Tese (Doutorado em Agronomia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2022

ROCHA, G. T., QUEIROZ, P. R. M., GRYNBERG, P., TOGAWA, R. C., DE LIMA FERREIRA, A. D. C., DO NASCIMENTO, I. N., ... & MONNERAT, R. (2023). Biocontrol potential of bacteria belonging to the *Bacillus subtilis* group against pests and diseases of agricultural interest through genome exploration. **Antonie van Leeuwenhoek**, 116(7), 599-614.

RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1547–1556, 2008.

SANTOYO, G., HERNÁNDEZ-PACHECO, C., HERNÁNDEZ-SALMERÓN, J., AND HERNÁNDEZ-LEÓN, R. The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. **Span. J. Agric. Res.** 15, 1–15, 2017.

SAVARY, S., WILLOCQUET, L., PETHYBRIDGE, S. J., ESKER, P., MCROBERTS, N., & NELSON, A. (2019). The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, 3(3), 430-439.

SEZONOV, G., JOSELEAU-PETIT, D., & D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, 189(23), 2007.

SHARMA, A., KASHYAP, P. L., SRIVASTAVA, A. K., BANSAL, Y. K., & KAUSHIK, R. (2019). Isolation and characterization of halotolerant bacilli from chickpea (*Cicer arietinum* L.) rhizosphere for plant growth promotion and biocontrol traits. **European Journal of Plant Pathology**, 153, 787-800, 2019

SHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R. G.; BORGES, M.; CARVALHO, R. da S. Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2001. 20 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).

SILVA, C.C.; LAUMANN, R.A.L.; BLASSIOLI, M.C.; PAREJA, M.; BORGES, M. *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 575-580, 2008.

SINDHU, S. S., SEHRAWAT, A., SHARMA, R., & DAHIYA, A. Biopesticides: use of rhizosphere bacteria for biological control of plant pathogens. **Defence Life Science Journal**, 1(2), 135-148, 2016.

SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. **EUA e Brasil continuam a liderar a produção de transgênicos no mundo**, 2020. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/eua-e-brasil-continuam-a-liderar-a-producao-de-transgenicos-no-mundo/>>. Acesso em: Set. 2022.

SPECHT, A.; DE PAULA-MORAES, S. V.; SOSA-GÓMEZ, D. R. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, 2015.

STEFANELLO, Amanda Michel. Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Euschistus heros* (Fabricius, 1798). 2021. 69 f., il. **Dissertação (Mestrado em Agronomia)** — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

STEIN, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular microbiology**, 56(4), 845-857.

STOVER R. H.; WAITE B. H. Studies on *Fusarium* wilt of bananas. **Can . J . Botany** . v. 38, 1960

TIWARI, S., PRASAD, V., CHAUHAN, P. S., & LATA, C. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens* confers tolerance to various abiotic stresses and modulates plant response to phytohormones through osmoprotection and gene expression regulation in rice. **Frontiers in Plant Science**, 8, 1510.

TRAVERS, R. S., MARTIN, P. A., & REICHELDERFER, C. F. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. **Applied and environmental microbiology**, 53(6), 1263-1266.

TURNBULL, P. C., KRAMER, J. M., & MELLING, J. *Bacillus*. **Medical microbiology**, 1996.

VALICENTE, F. H. Manejo integrado de pragas na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 13 p. Circular Técnica. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>. > Acesso em: Nov. 2023.

VITULLO, D., DI PIETRO, A., ROMANO, A., LANZOTTI, V., & LIMA, G. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. **Plant Pathology**, 61(4), 689-69, 2012

WAHYUDI, A. T., ASTUTI, R. P., WIDYAWATI, A., MERYANDINI, A., & NAWANGSIH, A. A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **Journal of Microbiol Antimicrob**, 3(2), 34-40, 2011.

WAQUIL, J. M., VILLELA, F. M. F., & FOSTER, J. E. Resistência do milho (*Zea mays* L.) transgênico (Bt) à lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith)(Lepidoptera: Noctuidae), **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification and ecology of bio control agents of disease vectors. [s.l.]: WHO, 1985. (Mimeograph Document, 87.3)

XIE, G.; SU, B.; CUI, Z. Isolation and identification of N₂-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica**, v. 38, n. 6, p. 480-483, 1998.

YAN, Y., XU, W., CHEN, W., HU, Y., & WANG, Z. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* YYC, a bacterium isolated from the tomato rhizosphere. **Archives of Microbiology**, 204, 1-5, 2022.

ZHAO, P., QUAN, C., WANG, Y., WANG, J., & FAN, S. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. **Journal of basic microbiology**, 54(5), 448-456, 2014.

ZHOU, L., SONG, C., LI, Z., & KUIPERS, O. P. Antimicrobial activity screening of rhizosphere soil bacteria from tomato and genome-based analysis of their antimicrobial biosynthetic potential. **BMC genomics**, 22, 1-14, 2021.