



**Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

**Bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas
agrícolas**

Dissertação de mestrado em Agronomia

Wolney Gomes Pessoa Júnior

**Brasília-DF
2023**



**Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

Bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas agrícolas

Wolney Gomes Pessoa Júnior

Dissertação de mestrado em Agronomia

Orientador(a): Rose Monnerat

**Brasília-DF
2023**



**Universidade de Brasília
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

Wolney Gomes Pessoa Júnior

Bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas agrícolas

Dissertação de mestrado

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Agronomia

Aprovado por:

Dra. Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes (orientadora)/Universidade de Brasília.
CPF: 512.803.701-06; e-mail: rosemonnerat@gmail.com

Dr. Jean Kleber de Abreu Mattos/ FAV-Universidade de Brasília
CPF: 002.288.181-68, e-mail: kleber@unb.br

Dr. Sandro Coelho Linhares Montalvão/SoluBio Tecnologias Agrícolas
CPF: 937726965-20; e-mail: sandro.linhares@solubio.agr.br

**Brasília-DF
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

Wolney Gomes Pessoa Júnior
Bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas agrícolas.
Orientação: Rose Monnerat Solon da Pontes. – Brasília, 2023. 37 p.: il.
Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2023.
1. *Bacillus* 2. Controle biológico. Pragas agrícolas

CDD ou CDU
Agris / FAO

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

PESSOA JÚNIOR, W.G.OLIVEIRA, A.P.de. Bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas agrícolas. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2023, 37p. il. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Wolney Gomes Pessoa Júnior

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Bactérias do gênero *Bacillus* para controle biológico de pragas agrícolas.

GRAU: MESTRADO ANO: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias dessa 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 à fonte.

Assinatura

Nome: Wolney Gomes Pessoa Júnior
CPF: 02800619198
Endereço: quadra 3 conjunto c casa 40 sobradinho DF
Telefone: 985869040
Email:wolneyunb@gmail.com9

Sumário:

	Página
Justificativas	4
Resumo	5
Abstract	5
Introdução	7
Revisão bibliográfica (<i>Bacillus subtilis</i>)	8
<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	15
<i>Bacillus pumilus</i>	18
<i>Bacillus thuringiensis</i>	21
Produção “on farm”	24
Referências	25

Lista de figuras e tabelas:

Figura 1 – Esporos e células vegetativas de <i>Bacillus subtilis</i>	14
Tabela 1: produtos registrados a base de <i>Bacillus subtilis</i>	14
Figura 2 : Esporos do <i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	17
Figura 3: Esporos e células vegetativas de <i>Bacillus pumilus</i>	19
Esporos e inclusões proteicas cristalinas bipiramidais de <i>Bacillus thuringiensis</i>	23

Justificativas

1. Há uma grande necessidade de substituição e redução do uso de pesticidas químicos.
2. O uso de bactérias no controle de pragas e promotoras de crescimento têm se mostrado cada vez mais eficientes.
3. Porém há uma grande necessidade de aprofundamento nas pesquisas sobre essas bactérias, com isso essa revisão tem a finalidade de reunir informações sobre essas bactérias do gênero ***Bacillus***, que apesar de serem muito estudadas, não existem muitos trabalhos que reúnam um compilado de informações sobre o tema.

RESUMO

Tendo em vista o grande avanço tecnológico da agricultura e ao crescente consumo de produtos agrícolas, existe uma enorme necessidade de novos métodos de controle de pragas e doenças. O uso e produção de defensivos biológicos, é hoje uma grande alternativa para a redução de defensivos químicos. As bactérias formadoras de esporos, podem ser utilizadas como promotoras do crescimento vegetal e também para o controle de pragas agrícolas e têm sido de grande valia no agronegócio. Vale mencionar que com o aumento de pesquisas e registros de novos defensivos, o mercado de biológicos tem se mostrado eficaz e crescente. Com isso, os produtores têm buscado utilizar tecnologias de produção diferenciadas com a intenção de otimizar produção de qualidade superior aliada com boa produtividade e com a redução do uso de defensivos químicos. As bactérias do gênero *Bacillus* são as mais utilizadas no controle de pragas e doenças de plantas. São microrganismos encontrados facilmente nos solos e plantas, e formam esporos tolerantes ao calor e à dessecação, o que facilita seu estoque e comercialização. Essas bactérias sintetizam diversas substâncias que atuam em diferentes modos de ação. No caso das bactérias que controlam doenças e promovem crescimento das plantas, podem ser citados a produção de metabólitos com propriedades antimicrobianas, a competição por nutrientes e o parasitismo direto. No caso das bactérias que controlam insetos-praga, existe a produção de diversas toxinas inseticidas, as mais importantes conhecidas como Cry e Vip. As grandes vantagens do uso de *Bacillus* spp. são a especificidade, a eficácia, a facilidade em produção e aplicação.

Abstract

There are noticeable technological advances in agriculture and its products. It is all combined with the increase of the agricultural products consumption along with growth in the necessity of novel methods to control diseases and parasites. The production and use of biological pesticides combined with the actual need to reduce chemical pesticides turns the biologics market into a great alternative. Along these lines the use of spore-forming bacteria, which improves plant growth by highly effective controlling agricultural diseases. It has been up to now of great value in agribusiness. Moreover, the biological market data has proven to be effective and expanding along with the

increase in research and registration of new pesticides. As a result, producers are thriving in order to use differentiated technologies in plant production with the goal of enhancing their products' quality, as well as combining excellent productivity with reduced usage of chemical pesticides. The *Bacillus* genus is one of the most used in order to control plants' pests and diseases. They are microorganisms easily found in soils and plants, and it forms spores that are tolerant to heat and desiccation, which facilitates their storage and commercialization. The main mechanism of action of these organisms stay in the guidance of phytopathogens in the production of antimicrobial substances. However, the success of biocontrol, as well as the increase in yield depends on the antagonistic properties and mechanisms of action of the organism used, which can vary greatly. For instance: nutrient competition, direct parasitism and production of secondary metabolites, within the genus *bacillus* being of such importance that there is a need to expand the studies and research about these bacteria. Soil bacteria, specifically rhizospheric bacteria, can be efficient in controlling diseases caused by phytopathogenic fungi clearly.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de clima tropical, cuja economia está intimamente ligada à agricultura. Esta condição climática é extremamente favorável ao plantio de diversas culturas durante todo o ano. Contudo, a produtividade agrícola é constantemente ameaçada por inúmeros fatores abióticos e bióticos, dentre os quais estão as pragas e doenças. A ausência de invernos rigorosos, a abundância de água e luz (incidência solar) condicionam a ocorrência massiva de pragas e doenças, faz com que o país seja um dos líderes mundiais em consumo de agrotóxicos, fato este que é duramente criticado por muitos mercados internos e externos (Monnerat et al., 2020).

A ausência de especificidade e os riscos para com a saúde humana e o ambiente apresentados pelos defensivos agrícolas sintéticos acentuam a necessidade de ferramentas como o controle biológico e da otimização dos sistemas de agricultura sustentável (Batista Junior et al., 2002). O controle microbiológico de insetos vem ganhando mercado em diversos territórios nos últimos anos.

O controle biológico de pragas é uma prática utilizada desde meados do século XX e seu uso crescente é consequência de vários fatores, tais como: a crescente seleção de populações de insetos-praga resistentes aos inseticidas, o custo dos produtos químicos, os impactos negativos que esses produtos têm sobre o meio ambiente e os trabalhadores rurais, a pressão da sociedade pelo uso de produtos saudáveis, dentre outros (EMBRAPA. <https://www.embrapa.br/en/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>). (Acesso em 2022).

A Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia trabalha com bactérias do gênero *Bacillus* para controle de pragas e doenças há mais de 30 anos. Nesse período montou uma Coleção de Bactérias Patogênicas a Invertebrados que conta com cerca de 3.000 isolados, desenvolveu estudos que motivaram o avanço do conhecimento em relação às próprias bactérias e às interações para com as pragas agrícolas e insetos vetores de doenças, que afetam seres humanos e animais de interesse zootécnico. Efetuou além disso, o depósito de diferentes patentes de invenção; desenvolveu, em conjunto de empresas privadas, diversos bioprodutos, os quais já se encontram no mercado. Do mesmo modo que contribuiu para a formação de muitos mestres e doutores alunos de iniciação científica (Montalvão et al., 2020). O controle de insetos-praga na agricultura e de insetos vetores de importantes doenças humanas ocorre principalmente com inseticidas químicos. No entanto, o uso desses pesticidas

químicos tem provocado vários problemas, incluindo poluição ambiental e aumento dos efeitos na saúde humana; como o câncer e diversos distúrbios do sistema imunológico. A seleção de populações de insetos resistentes também causou surtos significativos e importantes de pragas secundárias (Devine et al., 2007).

Um outro fato muito importante, e de certa forma decisivo para a expansão do mercado de bio defensivos, foi a mudança de comportamento do agricultor. Esses agricultores começaram a aprofundar os conhecimentos e trocar informações por meio de grupos organizados em redes sociais, formando verdadeiras redes de pesquisa e informação.

Segundo a ABCBio (Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico), instituição criada em 2007 para congregar as empresas produtoras e comerciantes de produtos biológicos no controle de pragas, atualmente Crop Life, o mercado de bio defensivos no Brasil está estimado em US\$ 95,6 milhões (1% do mercado de agrotóxicos) e a taxa de crescimento anual prevista é de 20%. Em função dessa alta demanda e devido à falta de produtos disponíveis no mercado, alguns microrganismos têm sido produzidos nas propriedades, muitas vezes em condições inadequadas, o que pode acarretar um produto final de baixa qualidade, bem como proporcionar a proliferação de patógenos (contaminantes) indesejáveis ao meio ambiente, seres humanos e animais (Monnerat et al., 2020).

Nos últimos cinco anos, está acontecendo no Brasil a chamada produção “on farm”, onde os produtores rurais produzem, em suas próprias fazendas, caldos fermentados contendo microrganismos e os aplicam, sem formulação, nas lavouras. A aplicação é feita em, no máximo, 2 a 3 dias após o término do processo fermentativo. A produção “on farm” apresenta algumas vantagens sobre o uso de produtos comerciais. A maior delas é a diminuição dos custos para o fazendeiro, devido à fabricação própria e à inexistência dos custos de transporte e armazenagem. Entretanto, essa fabricação contém alguns riscos, sendo o maior deles, o da contaminação do caldo fermentado com microrganismos patogênicos ao ser humano. Também pode acontecer que, devido às condições inapropriadas de produção, os microrganismos estejam em baixa concentração, o que diminuiria a eficácia dos produtos (Monnerat et al., 2020).

A utilização de bactérias do gênero *Bacillus* como bio insumos é altamente promissora e este trabalho teve como objetivo relatar o grande potencial das espécies deste gênero.

2.Revisão bibliográfica

2.1 *Bacillus subtilis*

Classificação taxonômica:

Reino – Bactéria

Filo – *Firmicutes*

Classe – *Bacilli*

Ordem – *Bacillales*

Família – *Bacillaceae*

Gênero – *Bacillus*

Espécie - *Bacillus subtilis* (Cohn, 1972).

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram-positiva não patogênica, capaz de produzir esporos e é amplamente utilizada na produção de enzimas extracelulares em escala mundial (Alves et al., 2018) (Figura 1). Esta bactéria tem sido usada comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas. O efeito *in situ* pela exposição de células vivas de *B. subtilis* pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole. Esse último pode ser de natureza direta ou indireta. O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis. O mecanismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR) (Alves et al., 2018). O risco individual e para a comunidade é ausente ou muito baixo, ou seja, são agentes biológicos que possuem baixa probabilidade de provocar infecções no homem ou em animais (Fiocruz, 2022).

Atualmente, as práticas agrícolas vêm passando por intensas transformações, de maneira que grandes desafios como a manutenção da produtividade por menores custos de produção e impactos ambientais são impostos. Diferentes estirpes podem expressar diferentes aspectos e níveis de promoção do crescimento da planta (Santos, 2021). *B. subtilis* tem se mostrado excelente agente de biocontrole, podendo ser encontrado no solo e fazendo parte da população de microrganismos que vivem

dentro de plantas (endofíticas) e/ ou na superfície delas (epifíticas) (Gupta et al., 2000; Ongena et al., 2005). São mundialmente reconhecidas como eficientes contra fungos e outras bactérias causadoras de doenças em plantas (Mariano et al., 2000) assim como proteção contra insetos herbívoros quando residentes no interior das plantas (Azevedo et al., 2000).

B. subtilis. além de fazer parte da população microbiana do solo, rizoplano e filoplano, apresentam características atrativas para os estudos de controle biológico de doenças de plantas (Noronha et al., 1995). O potencial antagônico de bactérias foi estudado em diversos trabalhos de controle biológico de doenças em plantas (Bettiol & Kimati, 1990; Krebs et al., 1993). Essa bactéria tem sido usada comercialmente para o biocontrole de enfermidades de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas. O efeito “in situ” pela exposição de células vivas de *B. subtilis* pode ocasionar a promoção de crescimento e/ou o biocontrole. O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos tem o envolvimento dos conhecidos mecanismos de antibiose, bem como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis.

O mecanismo indireto é exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (ISR). *B. subtilis* é um dos mais eficientes agentes de biocontrole, apresentando atividade biológica contra diversas bactérias e fungos fitopatogênicos (Shoda, 2000). As recomendações de uso são 2 a 4 L/ha em 1000 L com meios de aplicação: Barra Costal Estacionário Turbo atomizador de calda. As aplicações preventivas podem ser repetidas com intervalo de 7 dias. Deve-se iniciar as aplicações preventivamente quando as condições para o desenvolvimento da doença forem favoráveis ou notórias. O intervalo de segurança não é determinado em função da não necessidade de estipular o limite máximo de resíduo (LMR) para este ingrediente ativo. O intervalo de reentrada deve ser estipulado de acordo com o tempo de secagem da calda, conforme a formulação. Caso seja necessário entrar na área tratada antes desse período, devem ser utilizados os equipamentos de proteção individual (EPIs) recomendados para a aplicação do produto.

A classificação toxicológica de produtos microbiológicos é determinada para cada produto comercial, conforme formulação, uma vez que não há registro de produto técnico. *B. subtilis* não é considerado um patógeno agente causador de doenças em humanos. É uma bactéria Gram-positiva aeróbia, comumente encontrada no solo,

fontes de água e em associação com plantas. Por possuir uma capacidade de secretar enzimas de forma eficiente, ela apresenta um grande interesse comercial (Kunst et al., 1997). Seu formato é em bastonete de aproximadamente 3-5 µm de comprimento e 1 µm de largura. Durante o crescimento vegetativo essa bactéria se alonga e ao atingir o dobro do tamanho, um septo é formado na posição mediana, dividindo-se em duas células do mesmo tamanho (Bonato, 2000).

Várias linhagens de *B. subtilis* produzem lipopeptídeos, que são compostos anfifílicos com atividades antimicrobianas e surfactantes. A produção de lipopeptídeos, esporulação e competência em *B. subtilis* estão interligadas através de um arranjo complexo de elementos de controle.

B. subtilis utiliza uma série de sistemas de transporte para assimilação de açúcares (Deutscher et al., 2002). Em particular, o transporte de glicose é realizado através do sistema fosfotransferase (pts), onde é simultaneamente transportada e fosforilada através de um sistema de fosforilação em cadeia, composto por proteínas gerais e proteínas específicas para a glicose (Deutscher et al., 2002).

B. subtilis cataboliza a glicose através de vias glicolíticas e pentose fosfato. Foi considerado por muito tempo como estritamente aeróbio, mas estudos mostraram que este microrganismo cresce também em anaerobiose, utilizando nitrato e nitrito como aceptores finais de elétrons, ou por fermentação na ausência deceptor de elétrons. Na fermentação os produtos identificados in vivo como os meios de cultivo, são: etanol, lactato, acetoína, 2-3 butanodiol e acetato. *B. subtilis* não esporula facilmente em condições de anaerobiose.

A diferenciação de esporos pelas células vegetativas de *B. subtilis*, constitui um exemplo dramático de adaptação às condições nutricionais adversas. Os esporos, metabolicamente inertes, exibem propriedades notáveis de resistência às condições que resultam na destruição rápida das células indiferenciadas (Carvalho, 2005).

Os esporos são importantes para o estabelecimento das suas propriedades de resistência. Ao longo dos anos, esse microrganismo se destacou como sendo uma grande biofábrica industrial para a produção de proteínas recombinantes, se beneficiando de sistemas de expressão eficientes, desenvolvidos nas últimas décadas. Além disso, apresenta alta taxa de crescimento, facilidade de cultivo em fontes de carbono baratas, e um sistema de secreção superior a outros microrganismos (Gu et al., 2018). Tendo um rápido crescimento celular e fácil manipulação genética em laboratório, assim apresentando um alto rendimento de

produto, esse microrganismo vem sendo utilizado em vários sistemas para a expressão heteróloga (Cai et al., 2019).

Além disso, por ter grande parte do metabolismo e suas conversões metabólicas bem descritas, e ser considerada uma bactéria GRAS (Generally Reconized As Safe), *B. subtilis* tornou-se um chassi altamente relevante na biologia sintética (Park et al., 2021; Zhang et al., 2021). A versatilidade de *B. subtilis*, estando presente em raízes e/ou no interior das plantas, quando aplicado em tratamento de sementes, raízes ou na parte aérea, sua capacidade de formar endósporo e desta forma resistir às adversidades ambientais são características que fazem dele uma peça importante em estratégias de manejo integrado. *B. subtilis* é uma das principais RPCPs de importância para a promoção do crescimento vegetal.

A promoção de crescimento das plantas mediada por essa bactéria é realizada por meio de vários mecanismos, como a produção de fitohormônios estimuladores do crescimento (Datta et al., 1982), produção de sideróforos e antibióticos (Harman et al., 2004) e indução de resistência das plantas contra fitopatógenos (Ramamoorthy et al., 2001). *B. subtilis* é um agente eficiente de controle biológico sendo utilizado frequentemente no controle de fitopatógenos de solo, sendo esse efeito devido, principalmente, à produção de antibióticos (Matsuno et al., 1992).

Esse mecanismo desenvolvido na rizosfera influencia outros habitantes de solo de forma positiva ou negativa (Araújo, 1995). A habilidade de bactérias formadoras de endósporos permanecerem metabolicamente dormentes por longos períodos, aumenta sua sobrevivência na superfície foliar, possibilitando sua permanência em períodos secos, temperaturas extremas e na deficiência temporária de nutrientes (Knudsen et al., 1986). Tal fato, possivelmente colabora para a eficiência de *B. subtilis* fora do solo, o que provavelmente ocorreu no controle da pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely) quando *B. subtilis* (10^8 UFC/mL) foi pulverizado mensalmente na cultura de laranja Pêra na safra 2004/2005 conforme relatado por Bernardo & Bettiol (2010). Como fungicida, *B. subtilis*, atua de forma preventiva, interferindo na aderência do patógeno nas folhas e no seu desenvolvimento posterior, bem como inibindo a germinação dos conídios e destruindo o crescimento dos patógenos, perfurando as membranas do tubo germinativo e micélio (Bettiol et al., 2008).

Considerando todas as vantagens apresentadas e em decorrência do desenvolvimento de tecnologias de engenharia metabólica, o portfólio de produtos utilizando *B. subtilis* como plataforma de expressão está cada vez mais se expandindo

ao adicionar bioprodutos como: acetoína, ácido láctico, isobutanol, etanol, riboflavina, N-acetilglucosamina, ácido poli- γ -glutâmico, ácido hialurônico, entre outros (Gu et al., 2018; Park et al., 2021; Zhang et al., 2022).

Araújo et al., (2009) constataram que a aplicação de *B. subtilis* aumentou a biomassa da parte aérea e reduziu a reprodução de nematoides formadores de galhas em tomate. Esses estudos de Araújo et al. (2002) constataram que a presença de *B. subtilis* afetou a orientação do nematoide *Heterodera glycines* reduzindo a sua migração em direção à raiz da soja. Sendo assim, os autores constataram que a utilização de *B. subtilis* afeta a orientação do nematoide, reduzindo a migração para a raiz, já que interfere na produção de exsudados das raízes que servem como orientação para nematóides, alterando assim a reprodução e orientação do parasita em direção às raízes. Também foi constatado que *B. subtilis* promoveu o crescimento e a redução da reprodução dos nematóides em cana-de-açúcar.

Alguns autores buscam explicar o mecanismo de ação de *B. subtilis* frente a fungos patogênicos por meio da produção de substâncias tóxicas (Kupper et al., 2003; Bais et al. 2004) e/ou substâncias voláteis (Kai et al., 2007; Chen et al., 2007). *B. subtilis* também foi eficiente contra o míldio, causado pelo fungo *Plasmopara vitícola*, o qual compromete principalmente a produção de uvas, atacando todas as partes verdes, principalmente as folhas, iniciando com a chamada "mancha branca" ou "mancha mofo". A atividade resultou do efeito direto contra o patógeno e estimulação das defesas da planta (indução da expressão genética de defesa e produção de calose), a presença dos lipopeptídeos cíclicos fengicina e surfactina no sobrenadante podem ter contribuído para a atividade antifúngica (Li et al., 2019). Em trabalhos de laboratório, verificou-se, em câmara de eclosão, que a presença de *B. subtilis* reduz a eclosão de ovos de *Heterodera glycines* estimulados com exsudatos de sementes de soja. Foi observado também que o tratamento de raiz de soja com a bactéria inibiu a migração de larvas juvenis de *H. glycines* para a planta em comparação à raiz não tratada com a bactéria. *B. subtilis* é uma rizobactéria que possui vários mecanismos de ação no controle de doenças de plantas, como a indução de resistência, o aumento na absorção de nutrientes, a antibiose (produção de iturina que ocasiona a ruptura da parede celular de patógenos), a competição e a promoção de crescimento (Embrapa, 2012; Monnerat et al., 2020).

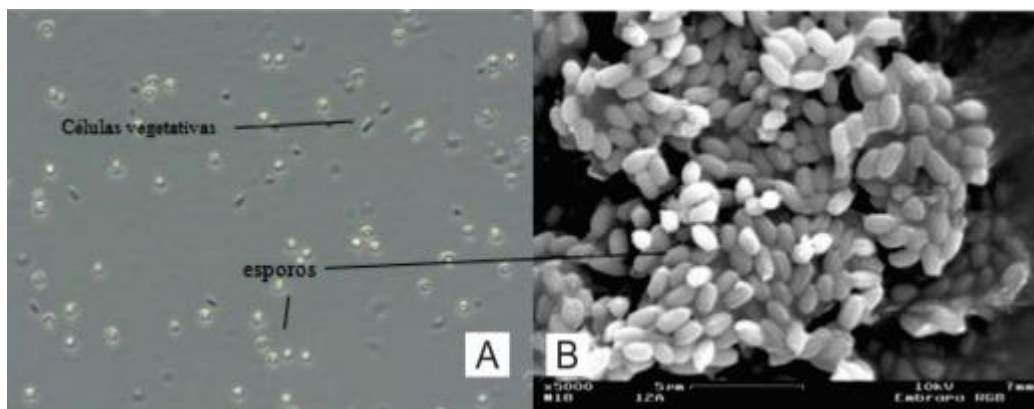


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 1 – Esporos e células vegetativas de *B. subtilis*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura (Monnerat et al., 2020)

Tabela 1: produtos registrados a base de *Bacillus subtilis*

PRODUTO	REGISTRO
Biosubtilin	Biotech International
Cease®	BioWorks
Companion®/Kodiak®	Growth Products
Ecoshot	Kumiai Chemical Industry
FZB24®	ABiTEP GmbH
HiStick N/T®/ Subtilex®/Pro-Mix®	HiStick N/T® e Subtilex®
Rhapsody®	AgraQuest Inc
Rhizo Plus®	ABiTEP GmbH
Serenade®	AgraQuest Inc
Avogreen®	avocadosource

Fonte: Infoteca.cnptia.embrapa.br

2.2- *Bacillus amyloliquefaciens*

Classificação da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*

Reino – Bacteria
Filo- *Firmicutes*
Classe - *Bacilli*
Ordem – *Bacillales*
Família - *Bacillaceae*
Gênero - *Bacillus*
Espécie - *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens (Figura 2) é uma espécie bacteriana de vida livre no solo, conhecida por ser promotora do crescimento de diversas espécies de plantas. Sua nomenclatura foi dada pelo japonês J. Fukumoto, devido a sua capacidade de realizar a liquefação do amido (amylo + lique + faciens). São bactérias aeróbias, Gram-positivas em forma de bastonete, móveis por flagelos peritricos e esporogênicos (Welker & Campbell, 1967) o que as permite sobreviver por um longo período (Fan et al., 2012; Torres et al., 2016; Wu et al., 2019) A espécie foi originalmente isolada de solos e obteve essa classificação por sua habilidade de secretar grande quantidade de amilases. Devido a sua semelhança com a espécie *B. subtilis*, outra espécie grande produtora de amilases, durante muito tempo essas duas espécies foram consideradas uma só, no entanto, esses dois microrganismos são distintos genética e fisiologicamente, principalmente pelas diferenças moleculares e sorológicas nas α -amilases (Milner et al., 1997). Essas espécies de bactérias também colonizam a rizosfera e tem grande capacidade de estímulos de produção de proteínas, aminoácidos, enzimas e de metabólitos capazes de suprimir os patógenos da planta no solo e essas características favorecem o seu uso como biofertilizante agrícola (Chen et al., 2007).

Além das amilases, *B. amyloliquefaciens* é capaz de produzir uma diversidade de outras enzimas, tais como: galactanase, isoamilase, mananase, xilanase, metal-protease, serina-protease, fosfatase alcalina e ribonuclease (Priest, 1977). *B. amyloliquefaciens* pode ser distinguida de *B. subtilis* por possuir uma porcentagem molecular G + C em seu DNA um pouco maior (Lisbôa, 2006). Este bastonete foi descrito como um promotor de crescimento de plantas e é usado em diversos processos industriais. Pereira et al. (2017) descrevem que ela é capaz de reproduzir o processo de deterioração gasosa. Atualmente a crescente preocupação com questões ambientais relacionadas ao uso de defensivos agrícolas químicos levou à

busca de novas tecnologias para atuar como substitutas no manejo de pragas e doenças. Neste cenário surgiram múltiplos estudos nos quais foram testadas diferentes cepas de *B. amyloliquefaciens* no controle de microrganismos fitopatogênicos, inclusive fungos. A bactéria apresentou bons resultados também na promoção do crescimento de algumas espécies de plantas (Abreu et al., 2022).

Na agricultura, a bactéria *B. amyloliquefaciens* vem apresentando resultados como promotora de crescimento em diversas culturas como: pepino (Silveira et al., 2004), alface (Matsumura et al., 2016) e tomate (Zecchin, 2016). A bactéria é colonizadora de raízes (BPCV). Sua habilidade de promover o crescimento vegetal está diretamente ligada a produção de substâncias de biocontrole gerando a resistência sistêmica induzida, e a produção de hormônios que favorecem o crescimento da planta (Fan et al., 2012). A concentração utilizada em experimentos foi de $6,0 \times 10^9$ células viáveis por mL. Aplicações de *B. amyloliquefaciens* na dose de 250 mL ha⁻¹ e 500 mL ha⁻¹, sendo adicionado 0,5% (v/v) de óleo mineral em 150 L ha⁻¹ de calda, de acordo com o estágio da planta.

B. amyloliquefaciens subsp. plantarum vem sendo intensamente estudada, teve seu genoma sequenciado e por sua constituição, revelou um potencial para produzir metabólitos secundários, sendo mais de 8,5% do genoma dedicado a síntese de antibióticos e sideróforos (Chen et al., 2007). *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* pode colonizar a rizosfera vegetal, estimular o crescimento das plantas, e suprimir os microrganismos fitopatogênicos concorrentes (Rocha et al., 2022).

Lopes (2022) descreveu o uso de *B. amyloliquefaciens* na biorremediação de ambientes aquosos contaminados com os metais Cobre e Ferro (Vieira., 2021) descreve a inoculação com *B. amyloliquefaciens* associada à aplicação do superfosfato triplo promove incrementos significativos nos componentes de produção e produtividade da cultura do feijão.

Rocha et al. (2022) descreveram que *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* pode colonizar a rizosfera das plantas, estimular o crescimento das plantas e suprimir os microrganismos fitopatogênicos concorrentes. Cappellaro et al., (2021) descreveram que não existem fungicidas registrados para o controle de mofo branco na zínia. Assim, o controle biológico e alternativo, entre eles o uso de *B. amyloliquefaciens* e própolis, são ferramentas em potencial para o manejo dessa doença. Brasileiro (2021) descreveu que *B. amyloliquefaciens* vem sendo utilizado com objetivo de promover melhorias no desempenho zootécnico atuando no sistema

imune, na manutenção da integridade intestinal de frangos de corte e tem sido considerado que a inclusão na dieta para frangos de corte reflete em efeitos positivos sobre bactérias de ordem patogênica. Luo et al., (2022) descreveram que *B. amyloliquefaciens* é uma das bactérias mais promissoras para a promoção do crescimento de plantas (PGP) sem efeitos colaterais prejudiciais. Como um excelente agente para biofertilizante e biocontrole na agricultura, os mecanismos de PGP da bactéria têm sido amplamente estudados.

Existem sete produtos registrados no MAPA à base de *B. amyloliquefaciens* para controle de fungos, oomicetos, bactérias e nematóides: Eficaz Nema®, PFC-Control®, Nemacontrol® e No-nema® (bionematicidas); Quartzo SC®, Serifel/Duravel® e Ecoshot® (biofungicidas) (Monnerat et al., 2020).

Existe uma cepa de *B. amyloliquefaciens* descrita na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de número 37) (Monnerat et al., 2020).

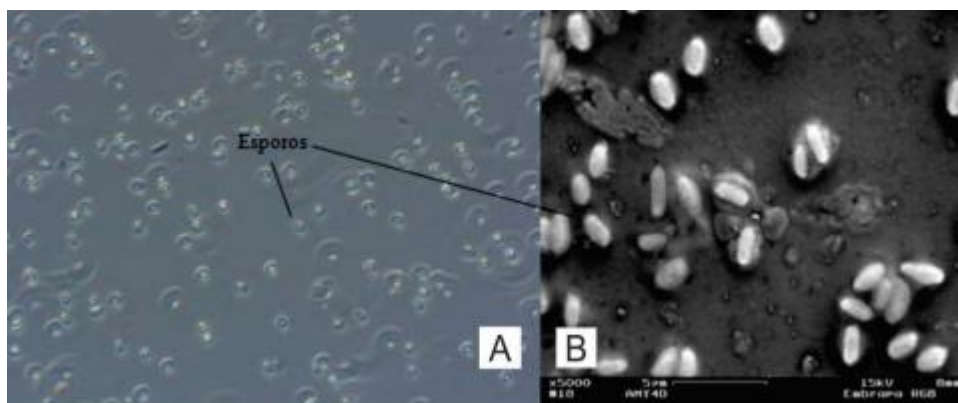


Figura: Ana Cristina Gomes

Figura 2 : Esporos do *B. amyloliquefaciens*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura. (MONNERAT et al., 2020)

2.3- *Bacillus pumilus*

Classificação Taxonômica

Reino – Bacteria

Filo- *Firmicutes*

Classe - *Bacilli*

Ordem – *Bacillales*

Família - *Bacillaceae*

Gênero - *Bacillus*

Espécie: *Bacillus pumilus*

Bacillus pumilus é uma bactéria formadora de esporos, encontrada em vários tipos de ambientes, como solo, água, ar e tecidos vegetais em decomposição (Figura 3). Essa bactéria é amplamente utilizada em processos industriais, fabricação de alimentos fermentados, tratamento de água e de ambientes contaminados. *B. pumilus* é uma rizobactéria promotora de crescimento de plantas com múltiplas funções de biocontrole (Zhu et al., 2020).

Lanna Filho et al. (2010) descreveram que *B. pumilus* se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos a fitopatógenos: inibição da germinação de esporos, paralisação no crescimento do tubo germinativo e interferência na fixação do patógeno na planta. É capaz de produzir pumilina, antibiótico efetivo contra bactérias Gram-positivas, no entanto essa produção depende do substrato de crescimento. O modo de ação de *B. pumilus* tem como base a inibição do desenvolvimento do patógeno na superfície foliar, além de ativar o sistema de defesa da planta. Esse antagonista age curativa e preventivamente, contra o desenvolvimento de oídios, míldios, ferrugens e outros patógenos em cereais, frutíferas, hortaliças e frutíferas (Coping et al., 2004).

B. pumillus é reportada como uma das mais abundantes bactérias cultivadas na filosfera de plantas de soja (Arias et al., 1999), o que pode indicar o potencial da utilização desse microrganismo para o controle de outras doenças da parte aérea da cultura. Os agentes de controle biológico (BCAs) à base de *Bacillus* têm grande potencial em sistemas de manejo integrado de pragas (MIP); entretanto, relativamente pouco trabalho foi publicado sobre integração com outras ferramentas de gerenciamento de MIP. Em teoria, a integração de várias ferramentas traz estabilidade aos programas de gerenciamento de doenças. Possui baixo risco individual e para a comunidade e se inclui nos agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças no homem ou nos animais adultos sadios (Ministério da Saúde, 2017).

Hayat et al. (2020) relatou também o uso de *B. pumilus*, na absorção de cádmio em *Zea mays* com contaminação industrial. As plantas foram expostas a dois níveis de contaminação por Cd por 45 dias.

Segundo Jacobsen (2007) e Masood et al. (2020), a inoculação de *B. pumilus*, aumentou o fornecimento de nitrogênio e melhorou o crescimento de tomate, *Solanum lycopersicum*, e concentração e absorção de N pelas plantas, além de aumentar

a população de rizobactérias no solo. Masood et al.(2020) observaram também que a maioria dos componentes polissacarídeos de exsudatos de raízes de plantas promoveu a formação de biofilme por *B. pumilus* sendo a glicose o maior efeito promotor. Baixas concentrações de Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} favoreceram a formação de biofilme, glicose o maior efeito promotor. Baixas concentrações de Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} e Na^{+} favoreceram a formação de biofilme.

Além destes estudos, no Brasil, há na literatura uma grande quantidade de relatos da eficiência de *B. pumilus* contra diversos patógenos, especialmente fungos. No controle de bactérias fitopatogênicas, os principais relatos são contra a podridão negra em crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris pv. campestris* (Wulff et al., 2002; Massomo et al., 2004; Monteiro et al., 2005). As xilanases de *B. pumilus* mostram potencial favorável para aplicação no branqueamento no processo de fabricação de papel *Kraft* (Duarte et al. 2000). Além disso, *B. pumilus* produz um lipopeptídeo da família da surfactina, chamado de pumilacidina. Surfactantes são moléculas que por apresentarem porções hidrofílicas e hidrofóbicas são capazes de reduzir a tensão superficial de um meio fluido, *B. pumilus* reduz significativamente a tensão superficial, e aumenta a emulsificação e também apresenta efeito fungicida impedindo a germinação dos esporos de certos fungos, constituindo uma barreira física entre a planta e os esporos fúngicos (Oliveira, 2010).

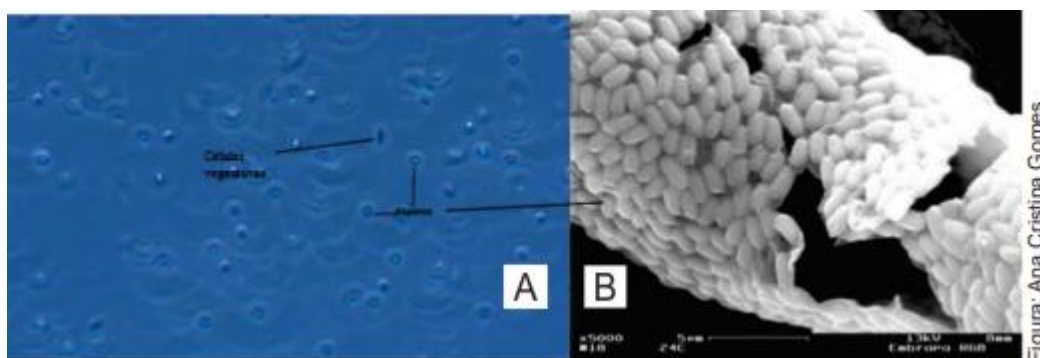


Figura 3: Esporos e células vegetativas de *B. pumilus*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura. (Monnerat et al., 2020).

O consumo cada vez crescente dos combustíveis fósseis coloca o petróleo como um dos mais importantes produtos do consumo humano. Porém, esse consumo desenfreado tem gerado graves danos ambientais aos ecossistemas aquáticos e também terrestres. Alternativas viáveis capazes de promover a recuperação de áreas afetadas por esses compostos são sem dúvida de extrema importância diante do

cenário atual. A biorremediação tem se mostrado bastante promissora nessa área. A espécie *B. pumilus*, tem capacidade de crescer em petróleo e diesel, sendo forte candidato a ser usado como biorremediador, pois possui capacidade de degradar hidrocarbonetos (Santos, 2014).

Na agricultura, *B. pumilus*, leva à redução da incidência e severidade de vários patógenos em plantas, e efetividade no tratamento de sementes contra patógenos e atua como indutor de resistência, provocando alterações citoquímicas durante o ataque de patógenos (Kloepper et al., 2004). *B. pumilus* promove aumento na atividade das enzimas peroxidase, citinase e de duas isoenzimas β -1,3-glucanase. Plantas inoculadas com *B. pumilus* apresentaram aumentos dos níveis de ácido salicílico (Zhang et al., 2002). *B. pumilus* está sendo empregado para o controle de diversos fungos, além de promover o crescimento de plantas (Monnerat et al., 2020), produz açúcares aminados de ação antifúngica, sendo indicado para controle de *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans*, além de míldios e oídios incidentes em inúmeras culturas (Bettiol et al., 2012). O modo de ação dessa espécie é baseado em competição por nutrientes e espaço, também podendo estimular o sistema de defesa da planta. *B. pumilus* age de forma preventiva e busca impedir o progresso da doença, principalmente contra o desenvolvimento de oídios, míldios, ferrugens e outros patógenos em cereais, frutíferas, hortaliças e uva (Bargabus et al., 2004). Kandasamy et al. (2018) concluíram que a inoculação de *B. pumilus* promove aumento de matéria seca das raízes de cana-de-açúcar, maiores número e diâmetro de perfilhos produzidos. A fertilização mineral com *B. pumilus*, proporciona aumento de fertilidade do solo, além de promoção do crescimento da planta e alto rendimento e produtividade na produção de cana-de-açúcar. Reduz a incidência de *Alternaria dauci* no tratamento de sementes, apesar de não apresentar efeito inibitório satisfatório em testes in vitro (Riceto, 2021). Na pecuária, *B. pumilus* é resistente aos desinfetantes a base de iodo comumente utilizados para desinfecção dos tetos. Bezerra et al., (2013) descrevem também que *B. pumilus* apresenta o maior índice percentual de controle de fitopatógenos em sementes de soja, tratadas com microbiolização de sementes.

Wang et al. (2020) descreveram que *B. pumilus* pode inibir o crescimento de *Phytophthora infestans*. Khin et al., (2020) descreveram que os estágios de crescimento do arroz foram melhorados com o uso de *B. pumilus*.

Existe um produto no MAPA à base de *B. pumilus* para controle de fungos: Sonata® (*Colletotrichum lindemuthianum*, *Alternaria porri*, *Botrytis cinerea*,

Sphaerotheca fuliginea, *Sphaerotheca macularis*, *Uncinula necator*, *Alternaria solani* e *Cryptosporiopsis perennans*) (Monnerat et al., 2020).

2.4. *Bacillus thuringiensis*

Classificação Taxonômica

Reino – Bacteria

Filo- *Firmicutes*

Classe - *Bacilli*

Ordem – *Bacillales*

Família - *Bacillaceae*

Gênero - *Bacillus*

Espécie: *B. thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma bactéria Gram-positiva, ubíqua, que pode ser caracterizada pela capacidade de formar cristais proteicos durante a fase estacionária e/ou de esporulação (Figura 4). Bt é encontrado naturalmente em diversos habitats, incluindo solo, filoplano, resíduos de grãos, poeira de silos, água, matéria vegetal e insetos, sintetiza toxinas na forma de cristais (Cry) e proteínas citolíticas (Cyt), também conhecidas como delta endotoxinas, que possuem propriedades inseticidas específicas (Valicente et al., 2018). Entre os produtos biológicos registrados para o controle de insetos no Brasil, destacam-se formulações contendo a bactéria *B.thuringiensis*, caracterizada por produzir cristais proteicos com capacidade inseticida específica. Esta bactéria pode ser cultivada em meio sólido, líquido e semissólido, sendo possível sua produção em meios de cultura alternativos, utilizando resíduos da indústria e materiais de baixo custo (Lana et al., 2019). Pelo menos setenta e cinco diferentes famílias de proteínas não estruturalmente relacionadas formam o grupo de toxinas Cry. A expressão de certas toxinas Cry em culturas transgênicas tem contribuído para um controle eficiente de insetos-praga resultando em uma redução significativa no uso de inseticidas químicos.

O modo de ação da família de toxina Cry de três domínios envolve a interação sequencial dessas toxinas com várias proteínas do intestino médio de insetos, facilitando a formação de uma estrutura de oligômero pré-poro e subsequente inserção na membrana que leva à morte das células do intestino médio do inseto por

choque osmótico (Bravo et al., 2011). A ação das toxinas Cry se inicia após a sua ingestão pelos insetos. Os sintomas de intoxicação são a perda do apetite e o abandono do alimento, paralisia do intestino, vômito, diarreia, paralisia total e, finalmente, a morte. As larvas perdem sua agilidade e o tegumento adquire tonalidade de cor marrom-escuro. Após a morte, a larva apresenta cor negra, característica das infecções provocadas por este microrganismo (Monnerat et al., 2020). As vantagens da utilização de *B. thuringiensis* são a especificidade aos organismos susceptíveis, o efeito não poluente ao meio ambiente, a inocuidade aos mamíferos e invertebrados e ausência de toxicidade às plantas. (Monnerat et al., 2020). Os insetos constituem uma das principais causas de danos à produção agrícola no mundo. O controle de insetos tem sido realizado por meio de agroquímicos e, em muito menor escala, pelo emprego de inseticidas biológicos. As plantas transgênicas resistentes a insetos representam uma nova alternativa no combate aos insetos-praga das lavouras. A bactéria entomopatogênica *B. thuringiensis* (Bt) é a fonte dos genes de resistência nas chamadas plantas-Bt, produzidas comercialmente (Bobrowski et al., 2003). Bt, que já é amplamente utilizado no controle biológico de insetos, poderá ter sua importância agrônômica aumentada, já que há indícios bastantes fortes de que esta bactéria possui atividade antifúngica. Este potencial pode ser explorado utilizando-se a bactéria ou mesmo as plantas transgênicas (Batista Júnior et al., 2002).

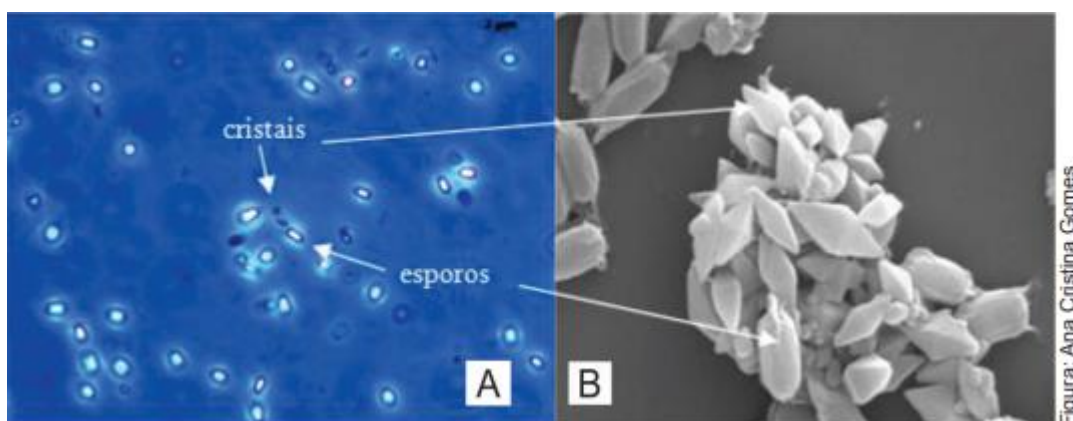


Figura 4 – Esporos e inclusões proteicas cristalinas bipiramidais de *B. thuringiensis*. (a) microscopia de contraste de fase, (b) microscopia eletrônica de varredura (Monnerat et al., 2020)

Existem duas cepas de *B. thuringiensis* descritas na Especificação de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), (Especificação de referência de números 28 e 34) (Monnerat et al., 2020).

Tabela 2: produtos registrados à base de *Bacillus thuringiensis*

Marca Comercial	Titular do Registro
BTFERT	Serquíbio Biotecnologia .Ltda
BACILLUS THURINGIENSIS BOM FUTURO	Bom Futuro Agrícola .Ltda
BACMIX BTKSC	Comdeagro - Cooperativa Mista de Desenvolvimento do Agronegócio
BETTUS ORG	Nooa Ciência e Tecnologia Agrícola .Ltda
BIOBAC-T	Vital Brasil Chemical Indústria e Comércio de Produtos Químicos .Ltda - ME
BT PROTECTION	Bioma Indústria Comércio e Distribuição - Eireli
BTKILL JCO	JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes. Ltda
ECOBACI T	Vital Brasil Chemical Indústria e Comércio de Produtos Químicos .Ltda - ME
TEC CATP PRO	Solubio Tecnologias Agrícolas.Ltda

Fonte: SEER/DIRPF/CGAA/DSV/SDA/MAPA.2022

Produção “on farm”

Os microrganismos vêm sendo empregados como excelentes biopesticidas de fitopatógenos e pragas nas principais culturas comerciais. Nos últimos anos, diversos produtores rurais têm fabricado em suas fazendas biopesticidas para aplicação direta nas lavouras, prática conhecida como produção “on farm” (Avila, et al., 2021). Esses microrganismos atuam na indução de resistência, parasitismo, antagonismo e a produção de enzimas que degradam a parede celular, assim como a produção de substâncias tóxicas, características essenciais para o controle alternativo de pragas e doenças. A produção caseira de biodenfosivos, conhecida como “on farm” vem

aumentando nos últimos anos, tendo como uma das principais vantagens a redução do custo dos produtores com defensivos, que pode chegar a 80% (Ávila et al., 2021). Para isso, o laboratório e o sistema de fermentação devem ser esterilizados, e o processo deve ser realizado sob condições controladas, permitindo a produção de bioinseticidas de qualidade que podem ser utilizados por diferentes estratos de produtores rurais (Lana et al., 2019).

O controle de qualidade dos bioprodutos é uma etapa fundamental do processo de produção, seja em laboratórios, biofábricas “on farm” ou nas empresas de grande porte. O controle de qualidade visa avaliar as características dos bioprodutos sob diferentes aspectos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia (Monnerat et al., 2020).

Para cultivar as bactérias do gênero *Bacillus*, é fundamental dispor de um meio de cultura adequado. Os meios de cultivo para essas bactérias geralmente possuem uma fonte de nitrogênio (extrato de caseína, caseína hidrolisada, peptona), outra de carbono (glicose, dextrose, amido) e sais minerais (micro e macro elementos). Algumas vezes se adicionam ao meio alguns tampões (fosfato) e antiespumantes a fim de facilitar o processo. A fonte de carbono, além de fornecer matéria prima para muitos compostos celulares, serve como fonte de energia. O nitrogênio é requerido principalmente para síntese de proteínas e ácidos nucleicos. Os sais minerais atuam como cofatores e são também importantes no controle da osmolaridade celular. Existem diversos meios de cultura disponíveis no mercado. É recomendável conhecer a procedência e qualidade dos mesmos, pois muitas empresas comercializam meios de cultura fabricados a partir de resíduos ou subprodutos que apresentam variação nos teores de carboidratos e proteínas entre diferentes lotes. Desta forma, o produto final resultante poderá apresentar diferentes rendimentos e conseqüentemente eficácia (Monnerat et al., 2020).

REFERÊNCIAS

ABREU LPS; MARTINAZZO AP; TEODORO CES; BERBERT PA. Alternativa sustentável de uso de *Bacillus amyloliquefaciens* no biocontrole de fungos fitopatogênicos. Uma revisão. Revista de Ciências Ambientais, Canoas, v. 16, n. 1, p. 01-15, 2022.

ALVES, K. C. S.; ALMEIDA, M. E. M.; GLÓRIA, J. C.; SANTOS, F. A.; PEREIRA, K. D.; CASTRO, D. P.; MARIÚBA, L. A. M. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. Scientia Amazônica, v.7, n.2, b15 a b23 2018. ACTINOVATE® SP. Houston: Natural Industries, 1998. Disponível em: . Acesso em: 25 mar. 2009.

ANDRADE, G.; DE LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. Letters in Applied Microbiology, Oxford, v. 26, p. 311-316, 1998.

ARAÚJO FF; SILVA JFV; ARAÚJO ASF. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja . Ciência Rural, v.32, n.2, p.197-203, 2002.

ARAÚJO, F.F. Efeito de *Bacillus spp* e seus metabólitos na competitividade e na nodulação da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) por *Bradyrhizobium spp*. Londrina, 1995. 117p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, 1995.

ARAÚJO, F.F.; & MARCHESI, G.V.P. Uso de *Bacillus subtilis* no controle da meloidoginose e na promoção do crescimento do tomateiro. Ciênc.rural 39(5): 1558-1561, ago. 2009.

ARIAS, R. S.; SAGARDOY MA; VUURDE JW. Spatio-temporal distribution of naturally occurring *Bacillus spp.* and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 39, 283–292. 1999.

AVILA, G.M.A.; GABARDO, G.; CLOCK, D.C.; LIMA JUNIOR, O.S. Use of efficient microorganisms in agriculture. Research, Society and Development, v.10, n.8, e4061081751, 2021.

AVILA, G. M. de A. .; GABARDO, G.; CLOCK, D. C.; LIMA JUNIOR, O. S. de .Use of efficient microorganisms in agriculture. Research, Society and Development, v. 10, n.8. pp 1-12.2021.

BAIS HP, FALL R, VIVANCO JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, v.134, p.307–319, 2004.

BARGABUS RL; ZIDACK NK; SHERWOOD JE; JACOBSEN BJ. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*, Volume 30, Issue 2, , Pages 342-350. 2004.

BATISTA JÚNIOR, C. B. , ALBINO, U. B., MARTINES, A. M., SARIDAKIS, D. P., MATSUMOTO, L. S., AVANZI, M. A., & ANDRADE, G. Efeito fungistático de *Bacillus thuringiensis* e de outras bactérias sobre alguns fungos fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, p.1189-1194, 2002.

BERNARDES, I. P. Co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Bacillus amyloliquefaciens* na cultura da soja. Monografia apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Agronomia, pela Faculdade Evangélica de Goianésia. 26 fls(2019).

BERNARDO, E.R.A. & BETTIOL, W. Controle da pinta preta dos frutos cítricos em cultivo orgânico com agentes de biocontrole e produtos alternativos. *Tropical Plant Pathology*, 35: 1, 37-42, 2010.

BETTIOL, W. & KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal da brusone do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.25, n.8, p.1165-1174, ago. 1990.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B.; PINTO, Z.V.; PAULA JÚNIOR. T.J.; CORRÊA. E.B.; MOURA, A.B.; LUCON C.A.M.; COSTA, J.C.B.; BEZERRA, J.L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas/ Wagner Bettiol... [et. al.]. – Jaguariúna, SP : Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155 p. — (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 88).

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; KRAUSS, U.; STEFANOVA, M.; COTES PRADO, A. M. (2008). Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Ed.). Controle microbiano de pragas na América Latina. Piracicaba; FEALQ, 2008. p.303-331.

BEZERRA, G.A., MACEDO, D.A., NASCIMENTO, I.O., SOUSA, T.P., COSTA, N.B. & SOUSA, L.F.R.A. Uso de *Bacillus spp* no controle de fitopatógenos em sementes de soja variedade BRS Valiosa RR. Revista Agroecossistemas , v. 5, p. 68-73, 2013.

BOBROWSKI, VL; FIUZA, LM; PASQUALI, G; BODANESE-ZANETTINI, MH. Genes de *Bacillus thuringiensis*: uma estratégia para conferir resistência a insetos em plantas. Biologia • Cienc. Rural 33 (5) • Out 2003.

BONATO, M.C. Esporulação de *Bacillus subtilis*. 2000. Disponível em: Acesso em: 10desetembrede2003. <http://www.biologiaweb.com/livro1/subtl/html> .

BONES. U. A. Biotecnologia: avaliação da atividade amilolítica de *Bacillus amyloliquefaciens*. 2009 Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),45fls, 2009.

BRASILEIRO, J. C. L. Uso do probiótico *Bacillus amyloliquefaciens* na dieta para frangos. 2021. 41 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.

BRAVO A, LIKITVIVATANAVONG S, GILL SS, SOBERÓN M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. Insect Biochem Mol Biol. Jul;41(7):423-31. 2011.

CAI, D., RAO, Y., ZHAN, Y., WANG, Q. AND CHEN, S. Engineering *Bacillus* for efficient production of heterologous protein: current progress, challenge and prospect. J. App. Microbiology, v.126. n 6 june Pages 1632-1642. 2019.

CAPPELLARO, S. *Bacillus amyloliquefaciens* e Própolis como Medidas Eco-Amigáveis para o Manejo de Mofo Branco em Zínia; 2021; Iniciação Científica; (Graduando em Agronomia) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Universidade Federal da Fronteira Sul. 2021.

CARVALHO, A. L. U. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14 sob condições restrita e irrestrita de oxigênio: produção de compostos bioativos e esporulação/. Recife :, 2005. ix, 57 folhas : Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos Bioativos, 2005.

CARVALHO, P H. Controle biológico e alternativo de *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* em tomateiro. 2017. xvi, 82 f., il. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)— Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

CHEN XH, KOUMOUTSI A, SCHOLZ R, EISENREICH A, SCHNEIDER K, HEINEMEYER I, MORGENSTERN B, VOSS B, HESS WR, REVA O, JUNGE H, VOIGT B, JUNGBLUT PR, VATER J, SÜSSMUTH R, LIESEGANG H, STRITTMATTER A, GOTTSCHALK G, BORRISS R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature biotechnology*, 25(9):1007-14. 2007.

COPING, L.G. The Manual of Biocontrol Agents A World Compendium. 3. Ed. Croydon. BCPC. 2004.

D'AGOSTINO, F. & MORANDI, M.A.B.. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. In: Bettiol, W, et al. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 299-316. 2009.

DATTA M., BANIK S. and GUPTA R. K.. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. *Plant and Soil*, v.69, n.3, p.365-373, 1982.

DEUTSCHER J, GALINIER A, MARTIN-VERSTRAETE I. Carbohydrate uptake and metabolism; in Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds): *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*. Washington, American Society for Microbiology Press, 2002, pp 129–150.

DEVINE G. & FURLONG M. Insecticide use: Contexts and ecological consequences. *Agriculture and Human Values* 24(3):281–306. 2007.

DUARTE MCT; PELLEGRINO ACA; PORTUGAL EP; PONEZI NA; FRANCO TT. Caracterização de xilanases alcalinas de *Bacillus pumilus*. *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2000, vol.31, n.2, pp.90-94.

EMBRAPA. Biological Control. <https://www.embrapa.br/en/tema-controle-biologico/sobre-o-tema>. Acesso em 2022.

FAN, B., CARVALHAIS, L.C., BECKER, A. ET AL. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiol* 12, 116 (2012).

FERREIRA, D.A.S. Eficiência do *Bacillus amyloliquefaciens* na promoção de crescimento e produtividade no milho. 2018. 35fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Mato Grosso. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais. Sinop, 2018.

GU Y, XU X, WU Y, NIU T, LIU Y, LI J, DU G, LIU L. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: From rational design to industrial applications. *Metabolic Engineering*, Volume 50, 2018, Pages 109-121. 2018.

GUPTA, A.; GOPAL, M.; TILAK, K. V. Mechanism of plant growth promotion by rhizobacteria. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 38, n. 9, p. 856-862, 2000.

HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Natural Reviews. Microbiology*, v.2,(1) p.43-56, 2004.

HAYAT, K; MENHAS, S; BUNDSCHUH, J; ZHOU, P; NIAZI, N K; AMNA; HUSSAIN, A; HAYAT, S; ALI, H; WANG, J; ABDULLAH, A; ALI, K A; MUNIS, F H; CHAUDHARY, H J. *Plant growth promotion and enhanced uptake of Cd by combinatorial application of *Bacillus pumilus* and EDTA on *Zea mays L.** International Journal of Phytoremediation Volume 22, 2020 - Issue 13 Pages 1372-1384 2020.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ - Arquivo de notícias - De olho no prato 2022.

JACOBSEN BJ, ZIDACK NK, LARSON BJ. The role of bacillus-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology*. Nov;94(11):1272-5. 2004.

KAI M, EFFMERT U, BERG G, PIECHULLA B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology*, v.187, p.351–360, 2007.

KANDASAMY, S; DURAISAMY, S.; CHINNAPPAN, S., BALAKRISHNAN, S; THANGASAMY, S; MUTHUSAMY, G; ARUMUGAM, S; PALANISAMY, S. Molecular modeling and docking of protease from *Bacillus sp.* for the keratin degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. v. 13, 95-104.2018.

KLOEPPER JW, RYU CM, ZHANG S. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*. Nov;94(11):1259-66. 2004.

KNUDSEN GR; SPURR HW. Management of bacterial populations for foliar disease biocontrol. In: Mukerji KG, Garg KL (Eds.) *Biocontrol of Plant Diseases*. Boca Raton FL. CRC Press. pp. 83-92, 1986.

KREBS, B., JUNGE, H., OCKHARDT, A., *et al.* *Bacillus subtilis*: an effective biocontrol agent. *Pesticides Sciences*, v.37, p.427-429, 1993.

KUNST F. *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 1997 Nov 20;390(6657):249-56.

KUPPER KC; FERNANDES NG GOES A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. Fitopatol Bras 28:251–257. 2003.

LANA UGP, TAVARES ANG, AGUIAR FM, GOMES EA, VALICENTE FH. Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema “on farm” / Ubiraci Gomes de Paula Lana [et al.]. – Sete Lagoas - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo.: 2019. 21 p. : il.

LANNA FILHO R; FERRO HM, PINHO RSC. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LEIFERT C, LI H, CHIDBUREE S, HAMPSON S, WORKMAN S, SIGEE D, EPTON HA, HARBOUR A. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45(1995) J Appl Bacteriol . 1995 Feb;78(2):97-108. 1995.

LI, Y., HÉLOIR, M.-C., ZHANG, X., GEISSLER, M., TROUVELOT, S., JACQUENS, L., HENKEL, M., SU, X., FANG, X., WANG, Q. & ADRIAN, M. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1037–1050. 2019.

LISBÔA, M. P. Caracterização de um peptídeo antimicrobiano produzido por linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada de solo, 2006.

LOPES, P. S. Caracterização do uso do biossurfactante produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* MO13 na biorremediação de metais potencialmente tóxicos em meios aquosos. Trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2022. 35p.

LUO L, ZHAO C, WANG E, RAZA A, YIN C. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiol Res.* Jun;259:127016. 2022.

MASOOD, S, ZHAO, X Q, SHEN, R F. *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization. *Scientia Horticulturae* Volume 272, 15 October 2020.

MASSOMO, S.M.S., MORTENSEN, C.N., MABAGALA, R.B., NEWMAN, M.-A. & HOCKENHULL, J. Biological Control of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of Cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology*. v. 1, n.2 Pages 98-105, February 2004.

MATSUMURA, E., NAKAGAWA, A., TOMABECHI, Y. ET AL. Microbial production of novel sulphated alkaloids for drug discovery. *Sci. Rep.* 8:7980. 2018.

MATSUNO, Y.; ANO T., SHODA, M. High-efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporation, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73 (4), 261-264, 1992.

MERTZ LM; HENNING FA; ZIMMER PD. Bioprotetores e fungicidas químicos no tratamento de sementes de soja. *Defesa Fitossanitária. Cienc. Rural* 39 (1) 2009.

MILNER, J.A.; MARTIN, D.J.; SMITH, A. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*. V. 18 (7) 507–512. 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE Classificação de Risco dos Agentes Biológicos 2017.

MONNERAT R; MONTALVÃO S C L MARTINS E S; QUEIROZ P R M; SILVA E Y Y; GARCIA A R M; CASTRO M T; ROCHA G T; FERREIRA A D C L; GOMES A C M M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. 46p.

MONTEIRO L; MARIANO RLR; SOUTO-MAIOR AM. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Braz. arch. biol. technol.* 48 (1) Jan 2005.

MURAS A, ROMERO M, MAYER C & OTERO A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis* Critical Reviews in Biotechnology Volume 41, Issue 4 Pages 609-627. 2021.

OEDJIJONO, M. A. L.; DRAGAR, C. Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 25, p. 247-250, 1993.

OLIVEIRA, J. G. Produção de biossurfactantes por *Bacillus pumilus* e avaliação da biorremediação de solo e água contaminados com óleo. UNESP-Microbiologia. Tese de doutorado. 70 fls. 2010.

ONGENA, M., JACQUES, P., TOURÉ, Y. ET AL. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 69, 29–38 (2005).

PARK SA, BHATIA SK, PARK HA, KIM SY, SUDHEER PDVN, YANG YH, CHOI KY. *Bacillus subtilis* as a robust host for biochemical production utilizing biomass, Critical Reviews in Biotechnology, 41:6, 827-848. 2021.

PEREIRA KS; CAYRES CA; CHAVES,JQ; BRITO JT; RABINOVITCH L; VIVONI AM. Deterioração em molhos para salada com formação de gás causada por *Bacillus amyloliquefaciens*. Braz. J. Food Technol.[online]. 2018, vol. 21, e2017025. Epub Nov 13, 2017.

PRIEST, F, G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev. 1977 Sep;41(3):711-53.

RAMAMOORTHY, V; VISWANATHAN, R; RAGUCHANDER, T; PRAKASAM, V; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection, Volume 20, Issue 1, Pages 1-11. 2001.

RICETO, M. P. Biological control of *Alternaria dauci* with *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* in carrot seeds 2021 UNESP Dissertação de mestrado Pós-graduação em Agronomia (Proteção de Plantas) - FCA.

ROCHA, G.; GRYNBERG, P; QUEIROZ, P.; TOGAWA, R.; PURCENA, T.; MARTINS, E.; MONNERAT, R. Draft genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain S2784, an isolate useful for microbial control. Brazilian Applied Science Review, Curitiba, v.6, n.3, p.908-919, may./jun., 2022.

SANTOS RM, KANDASAMY S, RIGOBELLO EC. Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. Microbiology Open. V.7, n.6, December 2018.

SANTOS, B M S. Estudo da variabilidade de bactérias promotoras de crescimento de plantas da espécie *Bacillus subtilis* UNESP 2021-02-01 Tese de doutorado: <<http://hdl.handle.net/11449/204170>>.

SANTOS, J. F. DOS. Proteínas de *Bacillus pumilus* envolvidas na degradação de petróleo e diesel. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SILVEIRA EB; GOMES AMA; MARIANO RLR; SILVA-NETO EB. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino Hort. Bras. 22 (2) Jun 2004.

TORRES, M.J. BRANDAN, C. PÉREZ PETROSELLI, G. ERRA-BALSELLS, R. AUDISIO, M.C. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefasciens* against *Macrophomina phaseolina*: sem study of fungal changes and uv-maldi-tof ms. analysis of their bioactive compounds. Microbiological Research.V.182,31-39.2016.

VALICENTE FH; LANA UGP; PEREIRA AC; MARTINS JLA; TAVARES ANG. Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 20 p. (Circular Técnica, 239).

VENTURINI G, FABIO BRANDI F, WAGNER BETTIOL W. Inibição do crescimento micelial e da germinação de esporos de *Thielaviopsis paradoxa* por *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* 8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo. 2014.

VIEIRA C, E. Meta-análise da co-inoculação de rizóbios e *Bacillus* promotores do crescimento vegetal em leguminosas graníferas. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. 88 fls. Curitiba. 2021.

WANG Y, ZHANG C, LIANG J, WANG L, GAO W, JIANG J, CHANG R. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms J Applied Microbiology and Biotechnology V.104(17):7467-7481. 2020.

WELKER NE; CAMPBELL LL. Induction and properties of a temperature bacteriophage from *Bacillus stearothermophilus*. J Bacteriol. Jan;89(1):175-84. 1965.
WELKER, N. E., & L. L. CAMPBELL. Biochemical changes in lysogenic after bacteriophage induction. J. Bacteriol. 90:1129-1137. 1965.

WIN, KT; OKAZAKI, K; OHKAMA-OHTSU, N; YOKOYAMA, T; OHWAKI Y. Short-term effects of biochar and *Bacillus pumilus* TUAT-1 on the growth of forage rice and its associated soil microbial community and soil properties. Biology and Fertility of Soils 56 (4) 2020.

WULFF, E.G., MGUNI, C.M., MANSFELD-GIESE, K., FELS, J., LÜBECK, M. & HOCKENHULL, J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Plant Pathology, 51: 574-584. 2002.

ZECCHIN, V. J. S. Uso da bactéria promotora do crescimento vegetal, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp., *plantarum* FZB-42, tomateiro em cultivo orgânico. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Defesa: Curitiba, 14/06/2016.

ZHANG S, ET AL. ZHANG, S; ZHONG, G; SHAO, D; WANG, Q; HU, Y; WU, T; JI, C; SHI, S. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis* promotes growth performance of broilers by altering the dominant microbial community, Poultry Science, Volume 100, Issue 3, 100935, 2021.

ZHANG, X; ZHAN, Y; ZHANG, H; WANG, R; TAO, X; ZHANG, L; ZUO, Y; ZHANG, L; WEI, Y; LI, J. Inoculation of phosphate-solubilizing bacteria (*Bacillus*) regulates microbial interaction to improve phosphorus fractions mobilization during kitchen waste composting. *Bioresource Technology*. V. 340, 125714.2021.

ZHANG,S, MOYNE,AL, REDDY,MS, & KLOEPPER,JW. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco, *Biological Control*, Volume 25, Issue 3, Pages 288-296, 2002.

ZHU, J.; TAN, T.; SHEN, A.; YANG, X.; YU, Y.; GAO, C.; LI, Z.; CHENG, Y.; CHEN, J.; GUO, L.; SUN, X.; YAN, Z.; LI, J.; ZENG, L. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology* 102,(2),433–441. 2020.