



PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

LARISSA DE CARVALHO

**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE SÃO
PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR
E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO**

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE *Spodoptera
frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

LARISSA DE CARVALHO

Dissertação apresentada para a obtenção do
título de Mestre em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de concentração: Segurança Alimentar
e Sanidade no Agroecossistema

CAMPINAS

2024

LARISSA DE CARVALHO

**PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE DE *Spodoptera*
frugiperda (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada para a obtenção do
título de Mestre em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar
e Sanidade no Agroecossistema

Orientador: Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

CAMPINAS

2024

Eu **Larissa de Carvalho**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: _____ Data ___/___/___

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Carvalho, Larissa de.

Prospecção de bactérias para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). / Larissa de Carvalho. - São Paulo, 2024.

75 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024D.LC03

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Luis Garrigós Leite

Versão do título para o inglês: Prospecting bacteria for the control of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

1. Controle biológico 2. Biologia molecular 3. Avaliação de mortalidade
4. *Serratia marcescens* 5. *Bacillus cereus* I. Carvalho, Larissa de II. Leite, Luis Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo) IV. Título.

IB/Bibl./2024/03

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Larissa de Carvalho

Título: Prospecção de bactérias para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)
(Lepidoptera: Noctuidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, que me mostrou seu milagre na manifestação da natureza e me deu o propósito de ajudar a preservá-la.

À minha filha Alice, para quem eu quero deixar um mundo melhor.

À minha mãe, que sempre sonhou que eu estudasse e me apoiou na jornada.

Ao meu noivo Daniel, que sempre me deu forças e me ajudou a sempre continuar lutando pelos meus ideais.

À Nataly, que foi uma amiga maravilhosa e a melhor professora que já tive na vida.

A meus amigos do laboratório, que sempre me ajudaram e deixaram meus dias mais felizes.

Aos professores, superiores e colegas dos diversos laboratórios do Instituto Biológico e da UNICAMP que me ajudaram no desenvolvimento e conclusão do meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O Homem é parte da natureza e a sua guerra contra a natureza é, inevitavelmente, uma guerra contra si mesmo.”

(Rachel Carson)

RESUMO

CARVALHO, Larissa. **Prospecção de bactérias para o controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:Noctuidae)**. 2024. 75 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2013.

No Brasil, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é a principal praga da cultura do milho provocando perdas entre 34% a 38,7% na produção, atacando também diversas outras culturas de importância comercial devido sua característica polífaga. As principais formas de controle de *S. frugiperda* são realizadas por meio do uso de inseticidas químicos e cultivares geneticamente modificadas, porém, o uso destas tecnologias sem o rigor de boas práticas agrônômicas pode gerar seleção de populações de insetos resistentes e contaminação do meio ambiente. Há também a pressão de políticas públicas para o desenvolvimento de tecnologias mais sustentáveis, se destacando os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, que incluem fome zero e agricultura sustentável. Um dos pilares do Manejo Integrado de Pragas é o controle biológico, uma importante área de pesquisa e desenvolvimento sustentável para maximizar a produtividade. O objetivo deste estudo foi selecionar cepas bacterianas com potencial para controle biológico de *S. frugiperda* utilizando oitenta isolados de diferentes ambientes pertencentes a uma coleção de microrganismos do Instituto Biológico. Discos de dieta artificial foram submersos no fermentado bacteriano em concentração à 10% e oferecidos às larvas de *S. frugiperda* nas fases L1/L2 para avaliação de patogenicidade dos isolados por meio da contagem diária de lagartas mortas durante sete dias de observação. Onze isolados causaram mortalidade das lagartas acima de 90%, se diferenciando estatisticamente dos demais grupos e tendo sucesso no sequenciamento do gene ribossomal rRNA 16s, rpoB e gyrB, resultando nas espécies *Serratia marcescens* e *Bacillus cereus*.

PALAVRAS-CHAVE: Controle Biológico, Biologia Molecular, Avaliação de mortalidade, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*

ABSTRACT

CARVALHO, Larissa. **Prospecting bacteria for the control of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera:Noctuidae)**. 2024. 75 f. Dissertação (Master's Degree in Health, Food and Environmental Safety in Agribusiness) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2013.

In Brazil, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) is the main pest of the corn crop, causing losses of between 34% and 38.7% in production and also attacking several other crops of commercial importance due to its polyphagous characteristics. The main ways of controlling *S. frugiperda* are through the use of chemical insecticides and genetically modified cultivars, but the use of these technologies without the rigor of good agronomic practices can lead to the selection of resistant insect populations and contamination of the environment. There is also pressure from public policies to develop more sustainable technologies, in particular the UN Sustainable Development Goals (SDGs), which include zero hunger and sustainable agriculture. One of the pillars of Integrated Pest Management is biological control, an important area of research and sustainable development to maximize productivity. The aim of this study was to select bacterial strains with potential for biological control of *S. frugiperda* using eighty isolates from different environments belonging to a collection of microorganisms at the Biological Institute. Artificial diet discs were submerged in the bacterial ferment at a concentration of 10% and offered to *S. frugiperda* larvae at the L1/L2 stages to assess the pathogenicity of the isolates by counting the number of dead caterpillars each day during seven days of observation. Eleven isolates caused caterpillar mortality above 90%, differing statistically from the other groups and succeeding in sequencing the 16s rRNA ribosomal gene, *rpoB* and *gyrB*, resulting in the *Serratia marcescens* and *Bacillus cereus* species.

KEYWORDS: Biological control. Molecular Biology. Mortality assessment. *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número de produtos químicos registrados para <i>S. frugiperda</i> no Brasil em 2024..	17
Figura 2 - Número de produtos registrados para controle biológico de <i>S. frugiperda</i>	22
Figura 3- Meio Nutrient Broth sendo pesado para diluição	27
Figura 4 - Inoculação do meio de cultura Nutrient Broth.....	27
Figura 5 - Caldo inoculado sob agitação 160 rpm.....	28
Figura 6 - Corte prévio da dieta artificial.	29
Figura 7 - Bioensaio montado em câmara Fitotron	30
Figura 8- Avaliação do produto de PCR obtidos com a utilização de primers específicos através de eletroforese em gel de agarose a 1% TBE 1X.	34
Figura 9 - Tratamento com 100% de mortalidade (A), e controle negativo meio de cultura puro (B).....	37
Figura 10 - Árvore filogenética de sequências concatenadas dos genes RNA ribossomal 16s e gyrB obtida pelo método de Neighbor-Joining	45
Figura 11 - Árvore filogenética de sequências concatenadas dos genes RNA ribossomal 16s e rpoB obtida pelo método de Neighbor-Joining	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados na reação de amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S.....	33
Tabela 2 - Sequência dos primers específicos utilizados na reação de amplificação e sequenciamento dos isolados selecionados	34
Tabela 3 - Mortalidade (%) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas a diferentes tratamentos bacterianos sem diluição.....	36
Tabela 4 - Mortalidade (%) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas a diferentes tratamentos bacterianos diluídos à 10%.....	38
Tabela 5 - Mortalidade (%) de lagartas de <i>S. frugiperda</i> submetidas a diferentes tratamentos bacterianos purificados diluídos à 10%.....	40
Tabela 6 - Identificação dos isolados que foram efetivos mediante amplificação de genes específicos e sua similaridade com espécies depositadas na base de dados biológicos do National Center for Biotechnology Information (GenBank-NCBI).....	42
Tabela 7 - Avaliação do antibiograma	47

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>S. frugiperda</i>	15
3.2	CONTROLE QUÍMICO	16
3.3	ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS	18
3.3.1	Custo adaptativo relacionado a Organismos Geneticamente Modificados	19
3.4	MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS	19
3.5	MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS	20
3.6	CONTROLE BIOLÓGICO	21
3.6.1	Fungos.....	22
3.6.2	Nematóides.....	22
3.6.3	Vírus.....	23
3.6.4	Parasitoides.....	23
3.6.5	Bactérias.....	23
4.	JUSTIFICATIVA.....	25
5.	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	ISOLADOS BACTERIANOS	26
5.2	REATIVAÇÃO, CULTIVO E FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS.....	26
5.3	PRÉ-SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS (SCREENING 1).....	28
5.4	PRÉ-SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS (SCREENING 2).....	30
5.5	CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS.....	30
5.6	TESTE DE MORTALIDADE	31
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
5.8	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	31
5.8.1	Extração de DNA.....	32
5.8.2	Amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s.....	32
5.8.3	Análise das Sequências Nucleotídicas do gene RNA ribossomal 16s	33
5.8.4	Amplificação e sequenciamento com a utilização de primers específicos	33
5.8.5	Análise das Sequências Nucleotídicas com a utilização de primers específicos..	35
5.9	TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	35
6.	RESULTADOS	36

6.1	SCREENING 1.....	36
6.2	SCREENING 2.....	38
6.3	CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS	39
6.4	TESTE DE MORTALIDADE	39
6.5	DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS SELECIONADOS	41
6.6	DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS QUE NÃO FORAM SELECIONADOS	41
6.7	DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE GENES ESPECÍFICOS AO GÊNERO PARA OS ISOLADOS SELECIONADOS.....	42
6.8	FILOGENIA.....	44
6.9	SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	46
7.	DISCUSSÃO	48
8.	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A - TABELA DE INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO SEQUENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS SELECIONADOS.....	64
	APÊNDICE B - TABELA DE INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO SEQUENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS NÃO SELECIONADOS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O cereal mais produzidos no mundo é o milho (*Zea mays* L.), sendo uma cultura de expressiva importância econômica no Brasil, que produziu 131,8 milhões de toneladas do grão na safra de 2022/2023 e exportou 50 milhões de toneladas (CONAB, 2023), tendo previsões de 48,7% de crescimento até 2031/32 (USDA, 2022). Há diversos fatores que interferem no bom desenvolvimento do milho, um destes fatores é o ataque do inseto-praga *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

A principal forma de controle de *S. frugiperda* é a aplicação de defensivos químicos e a utilização de culturas transgênicas com genes inseticidas. Entretanto, essa espécie tem apresentado casos de desenvolvimento de resistência a essas tecnologias, por esse motivo é necessária a adoção ou combinação de outras formas de controle que sejam efetivas e que sejam mais sustentáveis, se alinhando com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU. Um dos pilares do Manejo integrado de pragas (MIP) é o controle biológico, uma tecnologia com demanda crescente que movimentou um valor estimado em R\$ 3,3 bilhões na última safra, sendo adotada em 28% da área plantada com grandes culturas no Brasil (CROPLIFE, 2023).

A eficiência da aplicação de bactérias e vírus para o controle e mortalidade de larvas de Lepidópteros e outros insetos já é conhecida, sendo *Bacillus thuringiensis* e Baculovírus a base dos inseticidas microbiológicos mais utilizados contra *S. frugiperda*. Porém, outros microrganismos também podem demonstrar patogenicidade contra insetos-pragas, sendo necessário o desenvolvimento de pesquisas para prospecção de isolados entomopatogênicos que possam constituir a base de novos produtos comerciais.

O laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico em Campinas contém uma coleção de microrganismos com uma ampla gama de isolados bacterianos provenientes de diferentes locais de coleta no Brasil, isolados estes que podem ser investigados para aplicação na biotecnologia.

2. OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar a ação de isolados bacterianos com potencial ação entomopatogênica para o controle de *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797).

Específicos:

- Avaliar a patogenicidade de bactérias sobre a mortalidade de lagartas de *S. frugiperda*;
- Testar os isolados bacterianos eficientes em diluição 1:10;
- Identificar taxonomicamente em nível de gênero os isolados promissores por meio do gene rRNA 16s;
- Utilizar primers específicos para seus respectivos gêneros para se aproximar do nível de espécie.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O milho (*Zea mays* L.) apresenta grande importância na agricultura devido seu papel como alimento humano, animal e de sua utilização na produção de biocombustíveis (SOLOGUREN, 2015). Dentre as limitações que afetam a produção do milho se destaca o inseto *S. frugiperda* considerada a principal praga desta cultura, levando a perdas que variam entre 17% a 38,7% na produção (CRESPO et al., 2021).

A *S. frugiperda* é uma espécie de mariposa que durante a fase larval de desenvolvimento ataca o milho. As larvas deste inseto possuem hábito generalista, apresentando preferência alimentar por gramíneas como o milho, trigo, sorgo, arroz, milheto, grama bermuda e cana de açúcar. Porém, *S. frugiperda* se hospeda e se alimenta de diferentes plantas, como alfafa, feijão, amendoim, batata, batata-doce, repolho, espinafre, tomate, couve, abóbora, soja, algodão, acelga, alcachofra, alface, almeirão, berinjela, cebola, chicória, maracujá, melão, pêsego, pimentão e quiabo, entre outras, (BOREGAS et al., 2013; BOTTON et al., 1998; MONTEZANO et al., 2018).

Os métodos de combate a este inseto-praga mais utilizados são linhagens de milho geneticamente modificadas e o controle químico. O uso do controle químico sem orientação técnica e conhecimentos sobre dinâmica populacional, monitoramento e planos de amostragens pode ocasionar malefícios como: impacto à saúde dos agricultores; resíduos de agrotóxicos acima do permitido em alimentos consumidos in natura; seleção de populações de insetos resistentes às substâncias dos produtos; acúmulo de compostos no ambiente; prejuízos organismos não-alvo como predadores e parasitoides; desequilíbrio do ecossistema; contaminações do solo e corpos hídricos, entre outros (BARROS et al., 2006; BOMBARDI, 2017; BRAVO et al., 2011; CAMPANINI et al., 2012; LU et al., 2020; STORER et al., 2010). Devido a esses fatos, se faz necessária a adoção ou combinação de outras formas de controlar pragas que auxiliem no manejo de resistência, gerem menor impacto ambiental e se mostrem economicamente viáveis (PESSOA et al., 2014).

O manejo integrado de pragas (MIP) é a combinação de estratégias de controle que assegurem que o inseto-praga se mantenha em níveis que não causem danos econômicos à cultura, para isso são considerados fatores econômicos, ecológicos e sociais (KOGAN, 1998). Um dos pilares do MIP é o controle biológico, que consiste no emprego de inimigos naturais para controlar uma praga. Dentre os inimigos naturais de *S. frugiperda*, se enquadram bactérias, vírus, fungos, parasitoides e nematoides (VALICENTE, 2015), gerando viabilidade ecológica no ecossistema (PARRA, 2019).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Programa Nacional de Bioinsumos em 2020, com o intuito de desenvolver novas soluções biotecnológicas sustentáveis a partir da biodiversidade brasileira, diminuindo a dependência de insumos importados. O programa levanta a crescente priorização do tema em importantes organizações como a Embrapa, universidades e outras instituições de pesquisa brasileiras, gerando estímulo e novas diretrizes para expansão desse mercado no Brasil, além da oferta de crédito e outros benefícios econômicos para implementação (MAPA, 2020).

3.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *S. frugiperda*

O hábito generalista deste inseto-praga é uma causa da sua alta ocorrência, havendo uma ampla oferta de hospedeiros durante todo o ano. Diversos ecossistemas podem servir de nicho ecológico para *S. frugiperda*, como culturas plantadas próximas, sucessão de culturas, plantas de cobertura, plantas invasoras e voluntárias. Essa grande disponibilidade de alimento favorece a permanência da praga entre os cultivos, possibilitando que haja várias gerações desse inseto por ano. Devido a esses fatores, essa praga se demonstra frequente, inclusive em culturas que foi descrita como secundária (NAGOSHI, 2009), resultando em dificuldade de controle (MELO et al., 2014). Devido seu hábito polífago, alta capacidade reprodutiva, facilidade de dispersão dos insetos adultos e alto número de gerações anuais, a praga consegue alcançar elevadas taxas de infestação nas culturas (HORIKOSHI et al., 2016).

Na cultura do milho, os ataques são relatados desde a emergência da planta até o aparecimento das espigas, no primeiro instar de desenvolvimento as lagartas raspam as folhas, a medida que se desenvolvem começam a fazer buracos, diminuindo a área foliar até se alojarem no cartucho para se alimentarem dos grãos em crescimento, podendo vir a destruir a espiga por completo. Também podem causar danos em diversas outras partes da planta, como pendões e raízes adventícias, o que compromete a produção (VALICENTE, 2015). Se tratando de outras culturas, causa danos atacando botões florais, vagens, plantas recém emergidas e causam desfolha, o que diminui a capacidade fotossintética e se torna uma forma de entrada para microrganismos.

O desenvolvimento de *S. frugiperda* é o holometabólico, passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Cada fêmea ovípara entre 200 a 300 ovos em média, podendo esse número chegar até 2000. Os ovos no início são rosa claros e com estrias radiais, se tornando cinzas de 3 a 7 dias antes da eclosão (MOREIRA e ARAGÃO, 2009). As larvas recém-eclodidas produzem um fio em seus primeiros estádios e os usam para distribuir-se entre as plantas,

podendo apresentar uma distribuição uniforme na lavoura. É denominado *silking* quando as larvas apenas se penduram, e *balloning* quando são levadas pelo vento, se disseminando facilmente (MOORE e HANKS, 2004).

A lagarta recém eclodida mede 1,5 mm e no último instar pode chegar a atingir 40 mm de comprimento, sua coloração varia de esverdeada a pardo-escura (GALLO et al., 2002). Após eclodirem, as larvas passam por seis a sete estágios até chegarem à vida adulta, em seu completo desenvolvimento. O ciclo larval varia de doze a trinta dias (SARMENTO et al., 2002), após esse período, as larvas entram no solo para empupar e as pupas se formam entre 8-10 dias. O ciclo de desenvolvimento desta espécie, desde ovo até a fase adulta dura entre 20 a 60 dias, variando de acordo com o clima e temperatura (GALLO et al., 2002). Os insetos adultos são mariposas de até 4cm de envergadura de coloração cinza, mais ativas em noites quentes, (MOREIRA e ARAGÃO, 2009).

3.2 CONTROLE QUÍMICO

O controle químico é um dos principais métodos de controle de pragas, existem diversos produtos comerciais que podem ser utilizados no controle de *S. frugiperda*, entretanto, a maioria deles possui modo de ação semelhante, o que desencadeia pressão de seleção e o surgimento de indivíduos resistentes. De acordo com a plataforma do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) com base no banco de dados do MAPA, existem 261 inseticidas químicos, divididos em 46 ingredientes ativos com 17 grupos químicos diferentes registrados para *S. frugiperda* para cultura do milho (Figura 1), sendo 33 deles uma combinação entre dois tipos de ingredientes ativos (MAPA, 2024).

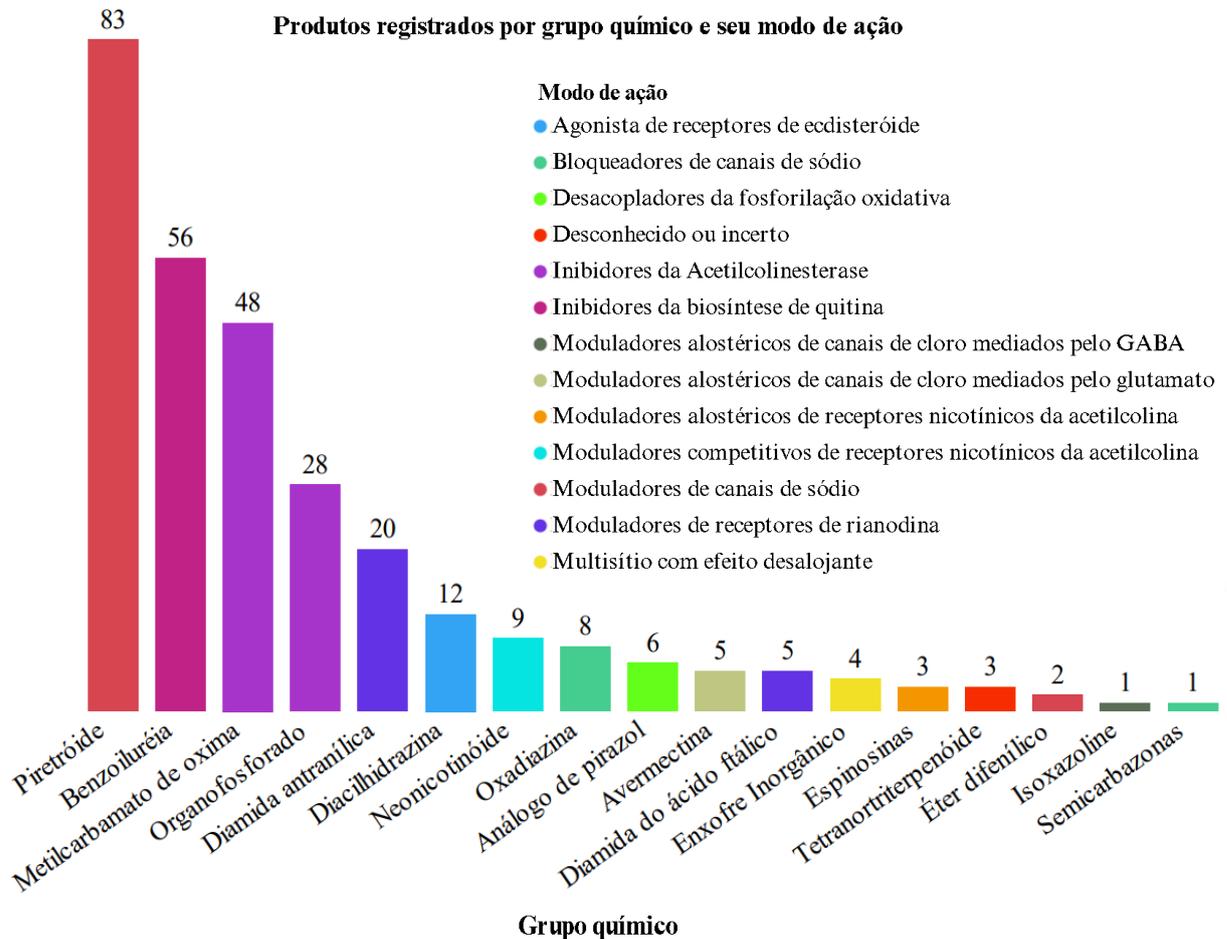


Figura 1 – Número de produtos químicos registrados para *S. frugiperda* no Brasil em 2024.
Fonte: Elaboração própria com base em banco de dados do MAPA.

Foram relatadas falhas no controle da *S. frugiperda* no Brasil desde 1993, com relato de casos de populações de *S. frugiperda* resistentes a 41 ingredientes ativos, incluindo moléculas frequentemente utilizadas em produtos comerciais como piretroides, espinosinas, avermectinas, organofosforados e diamidas (BOAVENTURA et al., 2020; HAFEEZ et al., 2021; QINQIN et al., 2019). Segundo o Comitê de ação à resistência a inseticidas (IRAC-BR), a definição de resistência é “Uma mudança hereditária na sensibilidade de uma população de pragas que se reflete na falha repetida de um produto em atingir o nível de controle esperado quando usado de acordo com a recomendação do rótulo para essa espécie de praga” (IRAC-BR, 2021).

De acordo com base de dados do Arthropod Pesticide Resistance Database (IRAC-MSU), há relatos de resistência de *S. frugiperda* no mundo todo (IRAC-MSU, 2023), regiões onde ocorre o cultivo anual de milho e/ou algodão tem maior índice de ocorrência de casos de populações resistentes (OMOTO, 2016). A resistência de insetos é um processo

evolutivo que resulta da pressão de seleção imposta pela aplicação de defensivos químicos utilizados por períodos prolongados de tempo, onde parte dos indivíduos de uma população de determinada espécie sobrevivem e passam essa característica para seus descendentes (HOY, 1995).

Outra dificuldade enfrentada no controle de *S. frugiperda* no milho é que a pulverização foliar desses inseticidas não chega até a lagarta em todos os seus estádios de desenvolvimento devido ao comportamento dessa espécie de se alojar dentro do cartucho do milho, impedindo que o inseticida alcance em seus últimos instares de desenvolvimento (CARVALHO et al., 2013).

3.3 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS

Plantas com a tecnologia de transgenia são organismos geneticamente modificados (OGM), que recebem genes de outro ser vivo em seu DNA por meio de técnicas biotecnológicas. No Brasil, um dos principais métodos de manejo de *S. frugiperda* é a utilização de plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas Cry (do inglês Crystal) e Vip (do inglês vegetative insecticidal protein) provenientes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, conhecidas popularmente como plantas Bt (MOSCARDINI et al., 2020). Desde 2007, quando ocorreu a liberação comercial do milho transgênico com atividades inseticidas à *S. frugiperda*, a taxa de adoção desta tecnologia foi ascendente, atingindo o marco de aproximadamente 93% de adoção no Brasil (ISAAA, 2018).

O sucesso dessa tecnologia para os fins de controle de *S. frugiperda* depende da implementação adequada das áreas de refúgio com milho não transgênico para estabelecimento de populações que não passem por pressão de seleção. Porém, estudos com produtores de milho de 7 estados do Brasil apontou que apenas 8% deles implementam as áreas de refúgio adequadamente (MACHADO e FIUZA, 2011), sendo esse um problema recorrente em diversas culturas, resultando em relatos de resistência a tecnologia Bt apenas 4 anos após a adoção da tecnologia no país. O desenvolvimento de populações de insetos resistentes ocorre devido à forte pressão de seleção exercida nessas culturas, com a expressão contínua das toxinas nas plantas Bt (FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016), que em muitos locais são produzidas continuamente durante o ano gerando o efeito de pontes verdes, onde plantações sucessivas e próximas formam um nicho ecológico constante ao longo do ano para o inseto-praga, que sofre pressão de seleção.

Somado a isso, foram relatadas populações de *S. frugiperda* com mecanismos de resistência múltipla a proteínas Bt e inseticidas (BOAVENTURA et al., 2021). O desenvolvimento de resistência em insetos é uma tendência evolutiva natural (BERNARDI et al., 2016), entretanto, nesses casos compromete a eficácia de outras espécies de plantas transgênicas com a tecnologia Bt, pois há possibilidade de resistência cruzada entre as proteínas expressas pelas plantas. Essa situação fez com que o uso de inseticidas químicos contra *S. frugiperda* crescesse novamente nos últimos anos (BURTET et al., 2017).

A resistência de populações de *S. frugiperda* tem sido observada em diversas regiões do Brasil (FARIAS et al., 2014) e Estados Unidos (HUANG et al., 2014), sendo a única praga que desenvolveu resistência às culturas com a tecnologia Bt em diversas áreas do mundo (DANGAL e HUANG, 2015).

3.3.1 Custo adaptativo relacionado a Organismos Geneticamente Modificados

Em diversos casos de pragas que desenvolvem resistência, o custo adaptativo associado com o genótipo de resistência pode dificultar o estabelecimento de populações resistentes (GOMES, 2020), isso por que a evolução da resistência pode ser influenciada, e “auto combatida” pela própria lagarta, pela intensidade dos custos adaptativos associados (TABASHNIK et al., 2005). Em populações resistentes de *S. frugiperda*, há relatos da herança da resistência ao Cry1F ter sido caracterizada como autossômica recessiva e monogênica na Argentina, Porto Rico e Brasil (CHANDRASENA et al., 2018), sendo esse custo adaptativo ausente ou não limitante (SANTOS-AMAYA et al., 2017; SOUSA et al., 2016), favorecendo o estabelecimento de populações de *S. frugiperda* resistentes nos cultivos de plantas Bt, comprometendo o potencial de controle que essas plantas deveriam exercer e consequentemente, diminuindo a produtividade e levando a necessidade de mais aplicações de inseticidas químicos para controlar a praga (FARIAS et al., 2014; HUANG, 2021).

3.4 MANEJO INTEGRADO DE PRAGAS

O Manejo Integrado de Pragas é o conjunto de táticas de controle aplicadas de forma inteligente, mantendo as pragas abaixo do nível de dano econômico (NDE). O manejo integrado de *S. frugiperda* em milho engloba controle cultural (aração do solo para exposição das pupas, rotação de cultura, plantas bem nutridas, eliminação de plantas e restos culturais que

possam abrigar a lagarta); controle biológico (uso de inimigos naturais); controle varietal (uso de variedades resistentes a praga) e controle químico (uso de inseticidas químicos) (GALLO, 1978).

O monitoramento deve ser realizado para definir a densidade populacional do inseto-praga, podendo ser realizado por meio de feromônio sexual em armadilhas, contagem direta da população de insetos e avaliação visual de desfolha. A tomada de ação para iniciar o controle é definida de acordo com a densidade populacional, quando o nível de controle (NC) atingido, isto é, quando o inseto-praga deve ser controlado para evitar prejuízos (VALICENTE, 2015).

3.5 MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS

aplicação menos frequente de inseticidas para que os insetos suscetíveis se reproduzam, diluindo a resistência; uso inseticidas químicos de curto período residual; realizar rotação de inseticidas com diferentes modos de ação para que nem todas as gerações sejam expostas ao mesmo produto; seguir a recomendação de dosagem da bula e evitar produtos que tenham relatos de resistência; realizar controle cultural; utilização de controle biológico; utilização de genótipos resistentes; utilização de inseticidas compatíveis com agentes de controle biológico; realizar o monitoramento da praga para reduzir aplicações e doses desnecessárias de produtos químicos; evitar as pontes verdes, que são o cultivo de culturas hospedeiras do inseto-praga de forma sequencial ou paralela; utilizar sementes certificadas Bt que expressam alta dose da proteína inseticida, de forma que a concentração dessas proteínas expressas na planta seja capaz de controlar não somente os insetos homozigotos suscetíveis (SS), mas também controlar os heterozigotos (RS); utilizar sementes com piramidação (ou piramidização) de genes, na qual se insere mais de um gene com proteínas inseticidas distintas em uma mesma planta, resultando em mais de um modo de ação sobre a mesma praga; realizar período de vazio fitossanitário; retirar do fator responsável pela pressão de seleção, utilizando em seguida outra abordagem ou ingrediente ativo para frear o desenvolvimento das populações resistentes; adotar a área de refúgio não Bt (IRAC-BR, 2024; OMOTO et al., 2016).

Uma das estratégias mais importantes para a proteção da tecnologia Bt e sua ação é a área de refúgio, que consiste no plantio de sementes sem a tecnologia Bt em uma parte da área total de um plantio Bt, resultando em um local de reserva de insetos suscetíveis que posteriormente se acasalarão com as populações resistentes da área Bt e darão origem a mais descendentes susceptíveis (ANDOW e ALSTAD, 1998). Portanto, é necessário o planejamento

da área em localização e tamanho ideal para que isso ocorra com sucesso (FARIAS et al., 2016). Entretanto, essa técnica tem baixa adoção entre os produtores de milho, onde apenas 8% deles implementam as áreas de refúgio adequadamente segundo estudos em diferentes estados do Brasil (MACHADO e FIUZA, 2011), sendo uma prática negligenciada que corrobora com a ocorrência frequente de resistência de *S. frugiperda* as toxinas cry expressas no milho Bt no país.

Com esses fatos, o controle biológico se mostra necessário para auxiliar no controle de pragas, possibilitando a combinação com outros modos de controle que auxiliem no manejo de populações resistentes de *S. frugiperda*, diminuindo a pressão de seleção que culturas de plantas Bt e aplicações recorrentes de inseticidas químicos exercem nesse inseto-praga.

3.6 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico consiste no uso de inimigos naturais para controlar uma determinada praga, resultante de interações como o parasitismo, predação e competição. Em levantamento sobre bioinseticidas para controle de *S. frugiperda* e outros lepidópteros em 30 países, foram identificados os seguintes organismos: bioinseticidas microbianos (vírus, fungos, bactérias, protozoários, oomicetos, levedura e algas) e macrobianos (predadores de insetos, parasitoides e nematóides entomopatogênicos) (BATEMAN et al., 2018).

No Brasil, existem 74 produtos registrados para controle biológico de *S. frugiperda* na cultura do milho que estão restritos a 5 tipos de agentes de controle, sendo eles baseados em: fungos, nematóides, vírus, parasitoides e bactérias (Figura 2), com apenas 2 produtos formulados em combinação de dois agentes de controle distintos (MAPA, 2024).

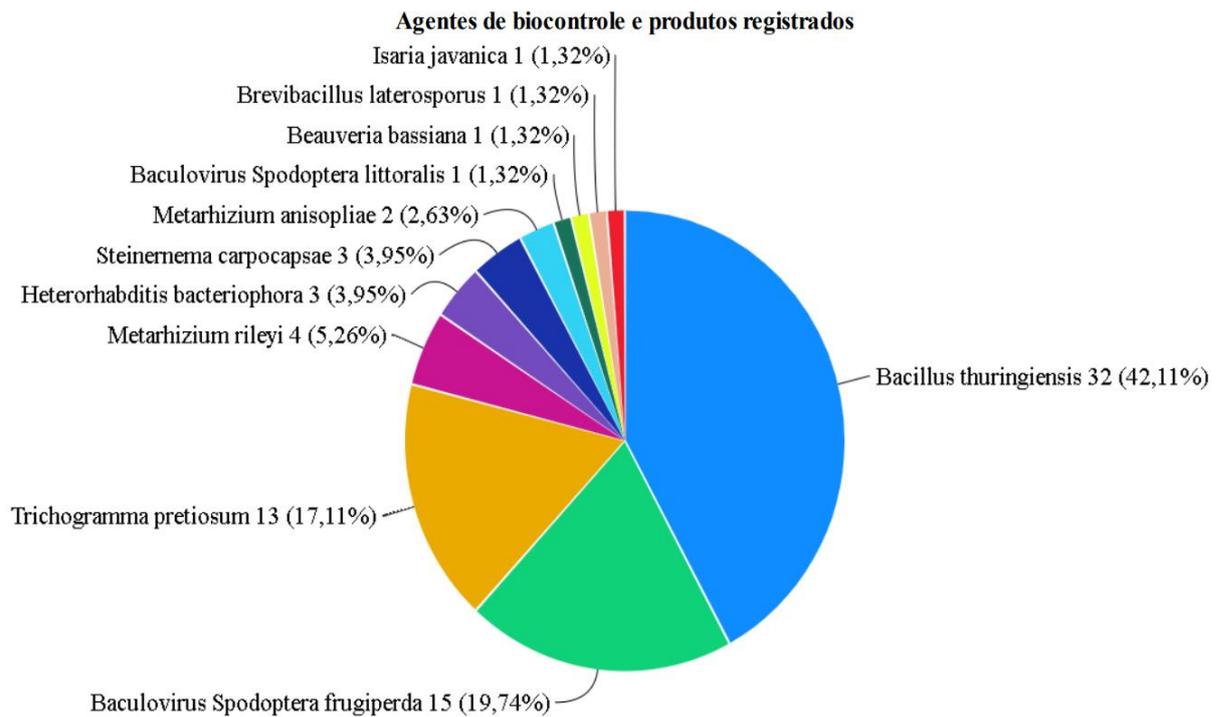


Figura 2 - Número de produtos registrados para controle biológico de *S. frugiperda*.
Fonte: elaboração própria com base em banco de dados do MAPA.

3.6.1 Fungos

Metarhizium anisopliae é um fungo encontrado na natureza, sendo o primeiro microrganismo reconhecido no controle de pragas (FRAZZON et al., 2000), tendo um amplo espectro de ação entomopatogênica. O mecanismo de ação desse fungo ocorre pela penetração cuticular por meio da combinação de pressão e degradação enzimática (FERRON, 1978), o que o permite atravessar o tegumento do inseto. Após a penetração, atinge os tecidos internos do inseto, proliferando suas hifas. A morte do inseto acontece entre três e sete dias após a infecção por meio da digestão dos tecidos internos, também sendo lançada uma micotoxina na hemolinfa do inseto (HAJEK e ST LEGER, 1994).

Isaria javanica (atual *Cordyceps javanica*) tem modo de ação semelhante a *Metarhizium anisopliae*, produz quitinases, lipases e proteases que degradam o tegumento do inseto, causando o rompimento do tecido e à liberação de conídios do fungo.

3.6.2 Nematóides

Steinernema carpocapsae e *Heterorhabditis bacteriophora* são nematoides entomopatogênicos, que são vetores de bactérias que causam a infecção do inseto. Após adentrarem na hemocele do inseto por meio do nematoide, são liberadas na hemolinfa, se proliferando e excretando toxinas que levam o inseto à morte. Eles se multiplicam no interior do inseto até as reservas nutricionais se esgotarem, quando saem do interior da praga e são capazes de infectar outros insetos (GAUGLER e KAYA, 1990). Nessa fase podem ser coletados do solo para serem replicados, podendo ser armazenados em água ou criopreservação (VOSS, 2009).

3.6.3 Vírus

Baculovírus, ou *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV), pertencem à família Baculoviridae (IKEDA et al., 2015). A infecção primária ocorre na ingestão pelas lagartas, onde os poliedros se dissolvem devido ao pH alcalino e penetram nas células epiteliais do intestino se multiplicando no seu núcleo, liberando o DNA e iniciando a replicação viral. No final do processo de infecção acontece a ruptura das células do intestino que levam a lagarta a morte, resultando na disseminação de novos vírus que são capazes de seguir infectando outras lagartas. (VALICENTE e TUELHER, 2009). *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus (SpliNPV) age de forma semelhante à descrita anteriormente.

3.6.4 Parasitoides

Trichogramma pretiosum (Riley, 1879) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) é uma microvespa parasitoide que oviposita nos ovos do inseto-praga, interrompendo o ciclo de vida da praga. As proles do parasitoide se desenvolvem no ovo e dão origem a novas vespas que se dispersam na propriedade, podendo colocar de 20 a 120 ovos. Após em média 4 dias após a oviposição, os ovos da praga se tornam enegrecidos, confirmando o parasitismo (CRUZ e MONTEIRO, 2004).

3.6.5 Bactérias

Brevibacillus laterosporus Laubach, 1916, é uma bactéria esporulante aeróbica com capacidade de produzir uma inclusão lamelar paraesporal adjacente ao esporo. Segundo

McCray (1917 apud Ruiu, 2013, p. 477), esta espécie foi isolada da água e posteriormente encontrada em diversos ambientes e em abelhas mortas, o que demonstrou a possibilidade de ser uma bactéria entomopatogênica. Produz diversas enzimas e proteínas atuantes na ação tóxica, tendo ação inseticida a diversas ordens (PANDA et al. 2014; RUIU, 2013). Porém ainda é pouco explorada, diferente de *Bacillus thuringiensis*, sendo o Dipel® um dos inseticidas biológicos mais utilizados e conhecidos (ROH et al., 2007).

O gênero *Bacillus* tem sido um dos mais utilizados contra insetos praga, como fixadores de nitrogênio nas plantas, promotores de crescimento e promotores de resistência a estresse hídrico. Este gênero se trata de um grupo heterogêneo de bactérias gram-positivas aeróbias ou anaeróbicas facultativas produtoras de endósporos. Os endósporos produzidos por *Bacillus* spp. são estruturas termotolerantes ao frio e ao calor que possuem resistência à dessecação, radiação ultravioleta, solventes orgânicos, condições extremas de pH e resistem ao tempo de estocagem, essas características são desejáveis para a ampla utilização desse gênero no controle biológico (RAGAZZOSÁNCHEZ et al., 2011).

Dentre as bactérias do gênero *Bacillus*, se destaca como microrganismo entomopatogênico *B. thuringiensis* (PESSOA et al., 2014), o qual é amplamente utilizado para o controle de insetos praga. Esta bactéria está presente no solo, em insetos mortos, plantas, água e detritos (KONECKA et al., 2012).

A ação entomopatogênica de *B. thuringiensis* se dá devido à produção de diferentes toxinas como as δ -endotoxinas (Cry), α -exotoxina, β -exotoxina, VIP (vegetative insecticidal proteins) e SIP (secreted insecticidal proteins) (ESIKOVA et al., 2002), sendo as toxinas Cry as mais estudadas e utilizadas para este fim. Para identificar e selecionar estirpes de *Bacillus* eficazes no combate de insetos praga, é necessário realizar diversos bioensaios, sendo o teste de patogenicidade contra o inseto-praga uma das etapas primordiais. Após identificar a atividade inseticida em dosagem viável, pode ser caracterizado por testes bioquímicos e passar por identificação molecular através do PCR (Técnica de Reação em Cadeia Polimerase) e sequenciamento genético (CONSTANSKI et al., 2015; VALICENTE e TUELHER, 2015).

4. JUSTIFICATIVA

Uma das maiores limitações na produção de alimentos é o ataque de pragas, que pode reduzir consideravelmente a produção, sendo necessário o emprego do controle de pragas de forma eficiente. Com a conscientização da sociedade acerca da necessidade da preservação do meio ambiente e o grande problema do desenvolvimento de resistência de pragas aos inseticidas, há uma busca constante por outros métodos de controle de pragas que sejam eficientes e tenham menor impacto ambiental. Além disso, há a pressão de políticas públicas relacionadas aos impactos do uso de inseticidas químicos ao meio ambiente e a saúde humana, se destacando os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU, que incluem fome zero e agricultura sustentável (ODS 2).

Com todos estes fatos, há uma grande preocupação com o desenvolvimento da tecnologia empregada na produção de alimentos, haja vista que a população mundial cresce a cada ano, aumentando a demanda por alimentos para suprir as necessidades nutricionais da população. Meios de reduzir o uso de inseticidas químicos são um importante nicho de pesquisa e desenvolvimento, sendo o emprego do controle biológico de pragas uma alternativa mais sustentável e por isso apresentam um mercado com demanda crescente. Neste cenário, é necessário realizar pesquisas de cunho exploratório visando características de interesse agrônomo como a obtenção de organismos com característica entomopatogênica, viabilizando a descoberta e a seleção de isolados que podem constituir a base de novos produtos comerciais.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ISOLADOS BACTERIANOS

O estudo foi conduzido no Instituto Biológico - Centro Avançado de Pesquisa em Proteção de Plantas e Saúde Animal, com sede em Campinas, São Paulo. Foram utilizados isolados da Coleção de Microrganismos Entomopatogênicos “Oldemar Cardim Abreu”, pertencentes da Unidade Laboratorial de Referência em Controle Biológico (ULRCB – IB), sendo oriundos de duas fontes:

1) Resultados de pesquisas realizadas anteriormente, provenientes de isolamento de bactérias endofíticas da planta de cana de açúcar e edáficas, pertencentes ao solo da plantação provenientes de municípios do estado de São Paulo (FERREIRA, 2012).

2) Microrganismos depositados em coleções de referência com depósitos abertos: CCT0480 (*Bacillus subtilis*), CBMAI1092 (*Chromobacterium subtsugae*), CCT7393 (*Pseudomonas fluorescens*) e HD-1 Bt S1450 (*Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki). Todos os isolados se encontravam preservados em glicerol a 20% em refrigeração à -20°C

5.2 REATIVAÇÃO, CULTIVO E FERMENTAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Para reativação dos isolados foi utilizado o caldo Nutrient Broth (NB) NEOGEN, na proporção de 8gL⁻¹ de água destilada que foram misturados em um Becker até a completa diluição. Em seguida, foram colocados 40mL do caldo em frascos tipo reagente com 100mL de capacidade com tampa hermética e foram autoclavados a 15 psi durante 15 minutos.



Figura 3- Meio Nutrient Broth sendo pesado para diluição. Fonte: elaboração própria.

Após a autoclavagem e o resfriamento, os frascos contendo o caldo NB foram levados à capela de fluxo laminar, previamente limpa, para a etapa da inoculação, isto é: a transferência de $100\mu\text{L}$ de cada isolado que se encontrava preservado. Após a inoculação os frascos tipo reagente foram colocados em sala climatizada a 25°C sob agitação constante, à 160 RPM por 72 horas para a multiplicação bacteriana. Foram utilizados 80 isolados, sendo cada isolado um tratamento.



Figura 4 - Inoculação do meio de cultura Nutrient Broth. Fonte: elaboração própria.

Após um período de 72 horas, o meio de cultura se encontrava turvo, confirmando que as bactérias haviam se multiplicado.



Figura 5 – Caldo inoculado sob agitação 160 rpm. Fonte: elaboração própria.

5.3 PRÉ-SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS (SCREENING 1)

Discos de dieta artificial foram submersos no caldo bacteriano e ofertados às lagartas para que elas ingerissem as bactérias juntamente com o alimento, seguindo metodologia adaptada de Viana e Prates (2003). No screening 1 foi utilizado o caldo bacteriano à 100%, sem nenhuma diluição, com o objetivo de determinar quais dos isolados apresentavam ação entomopatogênica em lagartas de *S. frugiperda* na fase L1/L2.

Os ensaios seguiram delineamento experimental inteiramente casualizado contendo 3 repetições com 5 lagartas cada, tendo dois controle negativos, um com o meio de cultura isento de inóculo e outro apenas com água deionizada autoclavada.

As lagartas na fase L1/L2 utilizadas no experimento foram adquiridas do criadouro Pragas.com – Insumos Biológicos, juntamente com a dieta artificial que teve o tamanho padronizado com auxílio de um boleador e bisturi, resultando em discos de dieta com 2 centímetros de diâmetro.

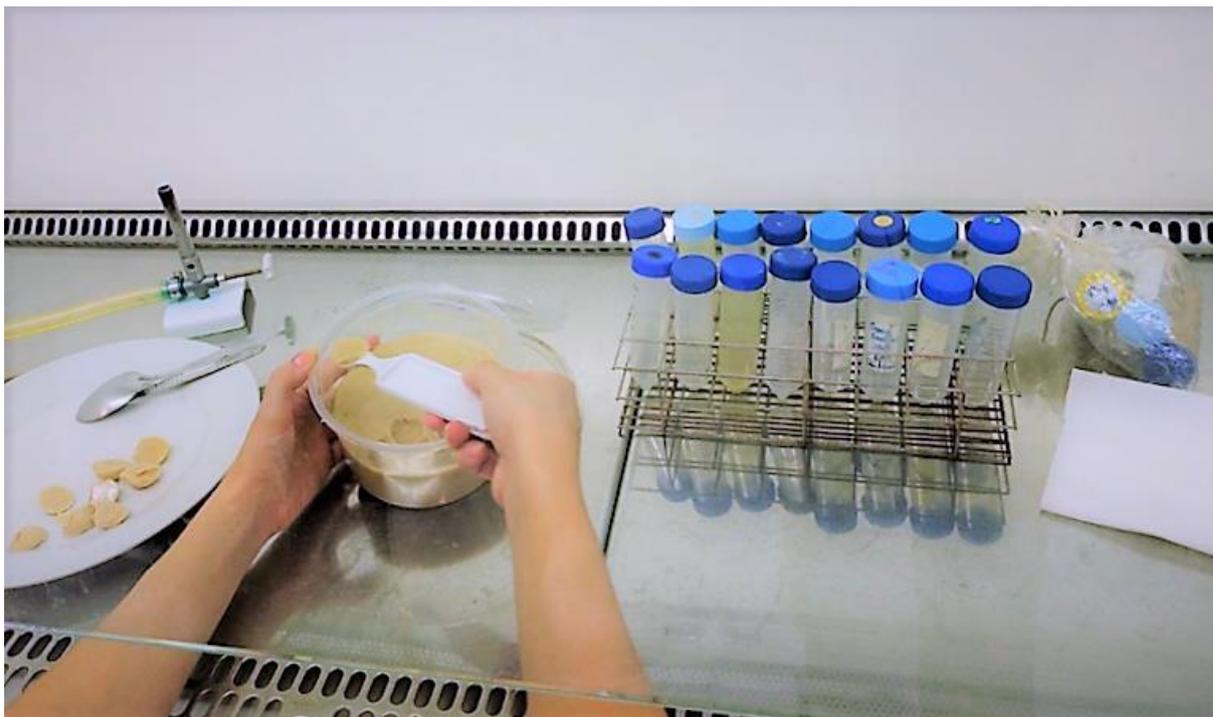


Figura 6 - Corte prévio da dieta artificial. Fonte: elaboração própria.

Os discos de dieta artificial foram submersos por 30 segundos no fermentado bacteriano, sendo posteriormente colocados em recipientes plásticos com capacidade de 100mL que foram identificados e mantidos parcialmente abertos até a evaporação do excesso de umidade, o mesmo procedimento foi adotado para os dois controles negativos.

Após a evaporação do excesso de umidade da dieta tratada, 5 lagartas foram transferidas para cada pote com o auxílio de um pincel.

Os tratamentos foram acondicionados em câmara climática, tipo Fitotron, a 25° +/- 2°C, umidade relativa do ar 50±10% e fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente, durante 7 dias subsequentes.



Figura 7 - Bioensaio montado em câmara Fitotron. Fonte: elaboração própria.

5.4 PRÉ-SELEÇÃO DAS BACTÉRIAS (SCREENING 2)

Os isolados que apresentaram mortalidade superior à 90% no screening 1 foram selecionados para nova avaliação, com metodologia semelhante à descrita anteriormente, apenas com diferença na concentração do caldo bacteriano, que foi diluído a 10% em água deionizada autoclavada. Os isolados que resultaram em mortalidade acima de 90% na concentração à 10%, foram selecionados para a continuidade do trabalho.

5.5 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS

Foi avaliada a pureza dos isolados selecionados, sendo plaqueados em meio de cultura Agar Nutriente por meio de esgotamento. As placas foram acondicionadas em estufa a 30°C, o acompanhamento do crescimento das colônias foi realizado diariamente com observação de características morfológicas das colônias como tamanho, forma e coloração, além de microscopia ótica das células por meio da coloração de Gram.

As colônias que apresentavam distinção em uma mesma placa eram transferidas para uma nova placa para purificação passando por novo esgotamento. Após purificação

comprovada, os isolados passavam novamente por preservação em glicerol a 20% mantido em congelamento a -20°C.

5.6 TESTE DE MORTALIDADE

Após a purificação dos isolados, foi realizado novo teste de mortalidade com larvas de *S. frugiperda* na fase L1/L2 para se constatar quais das bactérias isoladamente causaram mortalidade acima de 90%. A metodologia seguiu da mesma forma que fora descrita anteriormente, sendo realizada com o fermentado bacteriano diluído a 10%, contendo 3 repetições com 5 lagartas cada. A mortalidade foi analisada diariamente durante 7 dias.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados utilizando delineamento inteiramente casualizado, com os dados apresentados em porcentagem de mortalidade (%) e transformados usando a fórmula Arco Seno raiz X. Os resultados foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo programa SISVAR, tendo as médias comparadas pelo teste Skott-knott 5% (FERREIRA, 2011).

5.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Todos os procedimentos e etapas da análise molecular foram realizadas em parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na Divisão de Recursos Microbianos localizada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) em Campinas, SP.

Os isolados que foram separados e purificados passaram pelo Sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s, e os isolados purificados que causaram mortalidade acima de 90% no teste de mortalidade passaram por análise molecular utilizando primers específicos para o seu gênero pré-determinado no sequenciamento 16s, com o intuito de chegar a nível de espécie dos isolados de interesse com maior confiabilidade.

5.8.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo estabelecido por Van Soolingen et al., (1991). O equivalente a um grão de arroz do crescimento microbiano das placas contendo Nutrient Ágar foram raspadas com auxílio de alça de platina e transferidas para um microtubo de 1,5 mL contendo 495 μL do tampão TE 1X em pH 8,0. Foi adicionado 5 μL de lisozima (10 mg/mL) posteriormente incubado em banho maria a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pelo período de 1 h. Após isso, foi adicionado 70 μL da solução SDS 10% e 6 μL de proteinase k (10mg/ml), e foram incubados em banho maria a $65 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 minutos. Após isso, foi adicionado 100 μL de NaCl 5Mol e 80 μL de CTAB (10%) /NaCl (0,7 M), posteriormente incubado novamente a $65 + 1^\circ\text{C}$ por 10 min. Em seguida foi adicionado 750 μL de clorofórmio (24:1), agitado no vórtex e centrifugado a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para novo microtubo e foi adicionado 600 μL de álcool isopropanol 100% para ser incubado em freezer por 30 minutos. Posteriormente foi centrifugado a 4°C a 16.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e foi acrescentado 500 μL de etanol 70% gelado, e centrifugado mais uma vez a 16.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e os pellets secaram em temperatura ambiente. Após secagem, os pellets foram suspensos em 30 μL de água reagentes para biologia molecular.

Após a extração, a quantificação do DNA foi realizada por meio da comparação do DNA λ em concentrações distintas em gel de agarose a 1% TBE 1X submetido a eletroforese por 30 min em condição de 5V por cm^2 .

5.8.2 Amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s

Foi utilizada a técnica Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para amplificação do gene RNA ribossomal 16S, utilizando os primers homólogos às suas extremidades conservadas (ADÉKAMBI e DRANCOURT, 2004; LANE D. J., 1991; TURNER et al., 1999) e são descritos na Tabela 1.

As reações individuais foram compostas por água esterilizada (15,35 μL), tampão (2,5 μL), MgCl (0,75 μL), primers (0,5 μL), dNTp (0,2 μL), Taq polimerase (0,2 μL) e o DNA proveniente da extração (5 μL). Posteriormente, as reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C , 35 ciclos a 95°C por 15 segundos, 35 ciclos a 55°C por 15 segundos, 35 ciclos a 72°C por 30 segundos, 1 ciclo a 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram purificados pelo kit GFX PCR DNA & gel band purification kit, GE Health Care, utilizando mini colunas, posteriormente sendo submetidos ao sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDie Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Health Care) (CLAVO et al., 2021).

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados na reação de amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S

Primer	Sequencia	Referência
10f	GAGTTTGATCCTGGCTCA	(LANE D. J., 1991)
765f	ATTAGATACCCTGGTAG	(ADÉKAMBI; DRANCOURT, 2004)
1100r	AGGGTTGCGCTCGTTG	(TURNER et al., 1999)
1492r	ACCTTGTTACGACTT	(LANE D. J., 1991)
1525r	AAGGAGGTGATCCAGCC	(LANE D. J., 1991)

Fonte: elaboração própria.

5.8.3 Análise das Sequências Nucleotídicas do gene RNA ribossomal 16s

Para a montagem dos contigs, as sequências resultantes foram processadas no programa Bioedit versão 7.0.5.3 Windows (HALL, 1998), sendo comparadas com linhagens tipo nos bancos de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e EZBiocloud (<http://www.ezbiocloud.net/>). As sequências do banco de dados que resultaram em maior similaridade com a sequência analisada foram alinhadas no programa CLUSTAL W, pacote do programa Bioedit.

5.8.4 Amplificação e sequenciamento com a utilização de primers específicos

A metodologia seguiu a mesma descrita acima em “Amplificação e Sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s”, se diferenciando apenas pelos primers utilizados, descritos na Tabela 2 que foram escolhidos de acordo com o gênero identificado anteriormente com o sequenciamento do gene rRNA 16s.

Tabela 2 - Sequência dos primers específicos utilizados na reação de amplificação e sequenciamento dos isolados selecionados

Utilizado para o gênero <i>Serratia</i>		
Primer	Sequencia	Referência
rpoB F	CAGTTCCGCGTTGGCCTG	(MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997)
rpoB R	CGGTTGGCGTCATCGTGTC	(MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997)
Utilizado para o gênero <i>Bacillus</i>		
Primer	Sequencia	Referência
gyrB F	CARTGGAACGACNSTTATAR	(MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997)
gyrB R	CCGTCCACGTCGGCRTCNYCAT	(MOLLET; DRANCOURT; RAOULT, 1997)

Fonte: elaboração própria.

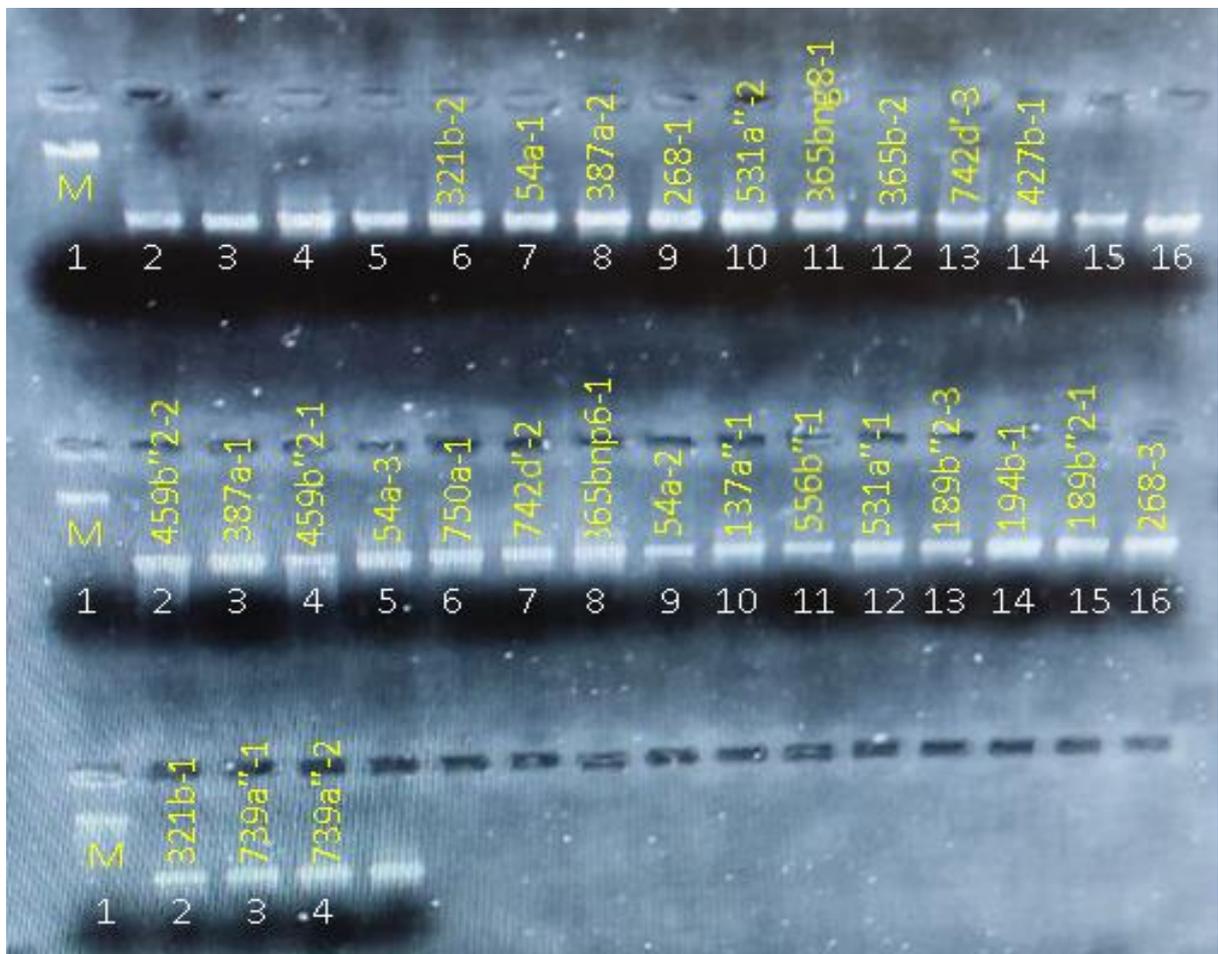


Figura 8- Avaliação do produto de PCR obtidos com a utilização de primers específicos através de eletroforese em gel de agarose a 1% TBE 1X.

M é o marcador de peso molecular λ . Fonte: elaboração própria.

5.8.5 Análise das Sequências Nucleotídicas com a utilização de primers específicos

Para a montagem dos contigs, as sequências resultantes foram processadas no programa Bioedit versão 7.0.5.3 Windows (HALL, 1998), sendo comparadas com linhagens tipo nos bancos de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências que apresentaram similaridade acima de 96% com a sequência analisada foram alinhadas no programa CLUSTAL W, pacote do programa Bioedit.

5.9 TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos, ou antibiograma, é um teste que permite a verificação *in vitro* da sensibilidade de uma bactéria a vários antibióticos, devido à importância médica foi realizado com os isolados gram-negativos pelo método Kirky-Bauer (BAUER et al., 1966). Uma suspensão do organismo foi padronizada em concentração próxima à escala 0,5 de Mac Farland (~10⁸ ufc), após padronização, um swab foi umedecido na cultura e semeado uniformemente em uma placa de contendo meio de cultura Àgar Mueller Hinton.

Posteriormente, discos de papel filtro impregnados com antibióticos foram aplicados sobre a superfície do meio de cultura em pontos separados, os antibióticos utilizados foram: amicacina (30 mcg), amoxicilina (30 mcg), ceftazidima (30 mcg), ciprofloxacina (5 mcg), imipenem (10 µg), nitrofurantoína (300 mcg), sulfazotrin (25 mcg), metronidazol (50mcg). As placas foram mantidas em incubação pelo período de 24 horas em estufa a 37°C para posterior verificação da sensibilidade da cepa pela presença ou ausência de halos de inibição. Os isolados bacterianos foram classificados de acordo com a recomendação do fabricante como: suscetível (S), intermediário (I) ou resistente (R).

6. RESULTADOS

6.1 SCREENING 1

O screening 1 foi realizado com o objetivo de prospectar isolados do banco com ação entomopatogênica em lagartas de *S. frugiperda* na fase L1/L2. Foram utilizados 80 isolados iniciais para a produção do caldo bacteriano utilizado para a submersão dos discos de dieta artificial que foram ofertados às lagartas, inicialmente com o caldo em concentração a 100%, ou seja, sem diluição. Cada isolado utilizado constituiu um tratamento (T) e cada tratamento foi realizado em 3 repetições com 5 lagartas cada. A avaliação da mortalidade foi realizada diariamente durante 7 dias subsequentes, o total de lagartas mortas foi somado e transformado em porcentagem (Mort%). Dos 80 isolados, 27 causaram acima de 90% de mortalidade das lagartas (Tabela 3).

Tabela 3 - Mortalidade (%) de lagartas de *S. frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos bacterianos sem diluição

(continua)

Tratamento	Mortalidade%	Tratamento	Mortalidade%	Tratamento	Mortalidade%
137a"	100	399b	86,66	365bpg5	46,66
189b""	100	CCT7393 ^D	86,66	552b	46,66
189b ^{""} .2	100	387d	80	729b'	46,66
194b	100	750b"	80	729b"	46,66
311a	100	332a'	73,33	102b	40
365Bng8	100	332a"	73,33	186a'	40
365Bnp6	100	387b	73,33	518b#	40
387a	100	399a"	73,33	56c	40
427b	100	133b"	66,66	74b ^{""} .2	40
459b ^{""} .2	100	1b"	66,66	160b	33,33
518b**	100	418a	66,66	287a	33,33
531a"	100	557a'	66,66	381a	33,33
54a	100	626b	66,66	729c"	33,33
556b"	100	735b	66,66	735a"	33,33
742d'	100	742c	66,66	742d"	33,33
749a'	100	IBCBA107 ^E	66,66	365a	26,66
750a	100	105	60	328a"	20

Tabela 3 - Mortalidade (%) de lagartas de *S. frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos bacterianos sem diluição

(conclusão)

Tratamento	Mortalidade%	Tratamento	Mortalidade%	Tratamento	Mortalidade%
IBCBA69 ^A	100	133b'	60	328b	20
BtS1450 ^B	100	399a'	60	102a	6,66
CBMA11092 ^C	100	523b	60	120b	6,66
321b	100	739b	60	CCT0480 ^F	0
268	93,33	ma07	60	365cp7	0
447b	93,33	137b	53,33	ma08	0
739a"	93,33	151b"	53,33	mm13	0
742a	93,33	556b'	53,33	MC ^G	6,66
74a	93,33	111b'	46,66	ÁGUA ^H	8,66
mm05	93,33	195a	46,66		
189b'	86,66	328a'	46,66		

A. *Bacillus thuringiensis* subesp. tenebrionis; B. *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki C. *Chromobacterium subtsugae*; D. *Pseudomonas fluorescens*; E. *Saccharopolyspora spinosa*; F. *Bacillus subtilis*; G. Meio de cultura puro; H. Água deionizada autoclavada. Fonte: elaboração própria.

Exemplo da diferença do tratamento com 100% de mortalidade (A) e controle negativo (B) após 7 dias de avaliação é demonstrada na figura 9.

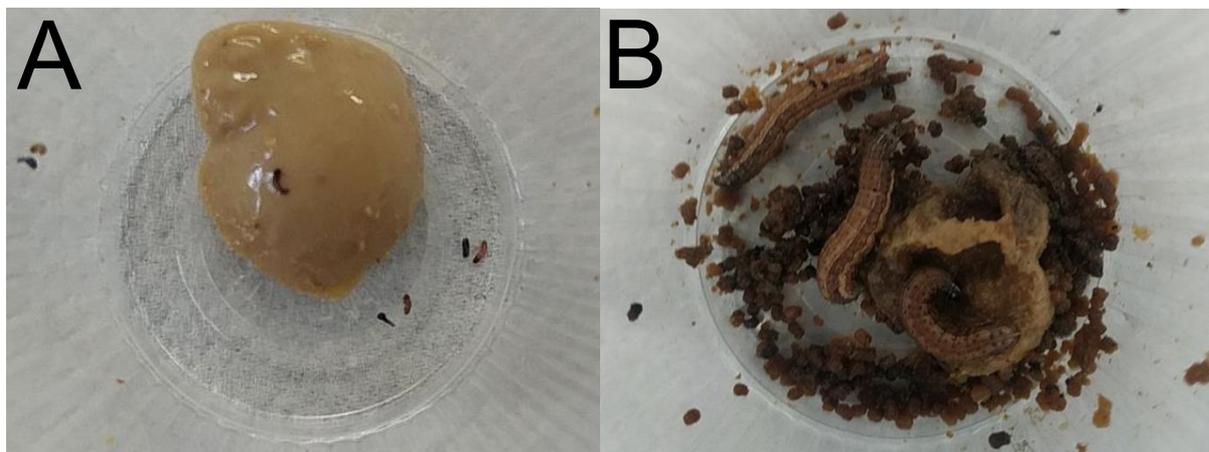


Figura 9 - Tratamento com 100% de mortalidade (A), e controle negativo meio de cultura puro (B)

6.2 SCREENING 2

O screening 2 foi realizado com os 27 isolados que resultaram em mortalidade acima de 90% no screening 1. O caldo bacteriano utilizado para a submersão dos discos de dieta artificial que foram ofertados às lagartas estava em concentração a 10%, sendo os outros 90% água deionizada autoclavada. O total de lagartas mortas foi somado e transformado em porcentagem (Mort%) e 22 tratamentos causaram mortalidade das lagartas acima de 90% em diluição a 10% (Tabela 4). Portanto, 20 isolados foram selecionados para as próximas etapas de purificação e identificação.

Tabela 4 - Mortalidade (%) de lagartas de *S. frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos bacterianos diluídos à 10%.

Tratamento	Mortalidade%	Tratamento	Mortalidade%
387a	100,00	194b	100,00
54a	100,00	739a"	100,00
459b" ²	100,00	268	100,00
BtS1450 ^A	100,00	321b	100,00
427b	100,00	749a'	96,66
750a	100,00	311a	96,66
742d'	100,00	189b" ³	96,66
365Bnp6	100,00	742a	96,66
365BNg8	100,00	CBMAI1092 ^C	76,66
IBCBA69 ^B	100,00	518b**	70,00
137a"	100,00	mm05	70,00
556b"	100,00	74a	66,66
531a"	100,00	447b	43,33
189b" ²	100,00	MC ^D	16,66

A. *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*; **B.** *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*; **C.** *Chromobacterium subtsugae*; **D.** Meio de cultura puro utilizado como controle negativo. Fonte: elaboração própria.

6.3 CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROSCÓPICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS

Os isolados que foram selecionados no Screening 2 passaram por purificação, sendo plaqueados em meio de cultura ágar nutriente. Após o período de incubação foram analisadas características morfológicas das colônias como forma, tamanho e coloração. A seguir, foi realizada a coloração de gram, corando-se o esfregaço de diferentes colônias, sendo observada por meio de microscopia ótica a morfologia, disposição das células e coloração. As colônias que apresentavam distinção em uma mesma placa eram transferidas para uma nova placa com novo esgotamento. Foram separadas 34 colônias, sendo preservadas novamente em glicerol a 20% mantido em congelamento a -20°C.

6.4 TESTE DE MORTALIDADE

Foi realizado novo teste de mortalidade com os 34 isolados purificados para se constatar quais das bactérias isoladamente causaram mortalidade acima de 90%. O caldo bacteriano utilizado para a submersão dos discos de dieta artificial que foram ofertados às lagartas em concentração a 10%, sendo os outros 90% água deionizada autoclavada.

A mortalidade foi analisada diariamente durante 7 dias e os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Scott-Knott por meio do programa de análises estatísticas SISVAR, sendo demonstrado em porcentagem de mortalidade (%) na Tabela 5.

Treze dos 34 isolados purificados causaram mortalidade das lagartas acima de 90%, (a) se diferenciando estatisticamente dos demais grupos, sendo selecionados para a análise molecular a nível de espécie com primer específico. Os outros isolados passaram pela identificação do gene Ribossomal 16S a nível de gênero para fins de categorização do banco de bactérias.

Tabela 5 – Mortalidade (%) de lagartas de *S. frugiperda* submetidas a diferentes tratamentos bacterianos purificados diluídos à 10%.

Tratamento	Mortalidade (%) ¹
268-1	100 a
321b-2	100 a
365bnp6-2	100 a
365bnp6-3	100 a
365bng8-1	100 a
387a-2	100 a
459b"2-2	100 a
531a"-2	100 a
54a-1	100 a
742d'-3	100 a
387a-1	93,33 a
427b-1	93,33 a
459b"2-1	93,33 a
194b-3	73,33 b
137a"-1	60,00 b
739a"-1	60,00 b
321b-1	53,33 b
54a-3	53,33 b
556b"-1	46,66 b
739a"-2	46,66 b
194b-1	40,00 b
54a-2	33,33 b
194b-2	26,66 b
189b"2-3	20,00 c
268-2	13,33 c
750a-1	13,33 c
268-3	13,33 c
Controle negativo	13,33 c
742d'-2	6,66 c
189b"2-1	0,00 c
189b"2-2	0,00 c
321b-3	0,00 c
365bnp6-1	0,00 c
531a"-1	0,00 c
742d'-1	0,00 c

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P>0,5).

Fonte: elaboração própria com base em resultados obtidos no programa SISVAR.

Alguns dos isolados que foram efetivos no screening 2 e passaram por purificação, não foram efetivos de forma isolada, portanto podem ser entomopatogênicos quando estão em sinergia, sendo os grupos: (189b"2-1, 189b"2-2, 189b"2-3); (194b-1, 194b-2, 194b-3); (739a"-1, 739a"-2). Além disso, os isolados 189b"', 311a, 742^a e 749a' não se

encontravam viáveis no ensaio de mortalidade à partir da criopreservação a -20°C, porém foram efetivos no screening 2, portanto pode haver tentativa de reativação a partir da criopreservação matriz a -80°C.

6.5 DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS SELECIONADOS

As sequências foram comparadas com sequências tipo do banco de dados EZBiocloud. Os tamanhos das sequências obtidas variaram entre 1168 pares de base até 1452 pares de base. Foram identificados 2 gêneros, sendo eles *Serratia* (n=10) e *Bacillus* (n=2). O isolado 365bnp6-2 não obteve sucesso no sequenciamento e será repetido posteriormente, portanto não foi mencionado nas próximas etapas. A tabela com as informações complementares do sequenciamento como: Numeração da classificação de similaridade; número de acesso da sequência no Genbank; similaridade entre as sequências; o número de nucleotídeos diferentes em relação ao total e cobertura da comparação realizada entre o isolado selecionado e a sequência do gene RNA ribossomal 16S de referência contido no banco de dados está descrita no apêndice A.

6.6 DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE RNA RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS QUE NÃO FORAM SELECIONADOS

Os tamanhos das sequências obtidas variaram entre 673 pb até 1199 pb. Foram identificados 3 gêneros, sendo eles *Bacillus* (n=7); *Paenibacillus* (n=2); *Providencia* (n=1) (Tabela 7). Devido ao fato desses isolados não serem os de interesse, não foram realizados todos os sequenciamentos necessários para a cobertura completa do gene 16s. Os isolados 54a-3, 137a'-1, 189b"2-2, 194b-2, 194b-3, 268-2, 321b-3, 365bnp6-1, 739a"-2, 742d'-1, e 750a-1 não obtiveram sucesso na etapa de PCR ou sequenciamento, e como não eram os isolados de interesse, não passaram por novo sequenciamento. O número de nucleotídeos diferentes em relação ao total foi muito alto, portanto, a conclusão dos gêneros não é confiável. A tabela com as informações complementares do sequenciamento como: Numeração da classificação de similaridade; número de acesso da sequência no Genbank; similaridade entre as sequências; o número de nucleotídeos diferentes em relação ao total e cobertura da comparação realizada

entre o isolado selecionado e a sequência do gene RNA ribossomal 16S de referência contido no banco de dados está descrita no apêndice B.

6.7 DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DE GENES ESPECÍFICOS AO GÊNERO PARA OS ISOLADOS SELECIONADOS

Os tamanhos das sequências obtidas variaram entre 520 pb até 1060 pb. Foram identificadas 2 espécies, sendo elas *S. marcescens* (n=9) e *B. cereus* (n=2) (Tabela 6). Os primers utilizados foram o rpoB para o gênero *Serratia* e gyrB para o gênero *Bacillus*. O isolado 459b"2-2 não obteve sucesso no sequenciamento, portanto não foi descrito.

Tabela 6 - Identificação dos isolados que foram efetivos mediante amplificação de genes específicos e sua similaridade com espécies depositadas na base de dados biológicos do National Center for Biotechnology Information (GenBank-NCBI).

(continua)			
ID	Espécie	Acesso GenBank	Similaridade (%)
321b-2	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	98,74
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	98,38
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	98,38
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	98,38
54a-1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	99,28
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	98,91
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	98,91
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	98,73
387a-2	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	CP034551.1	99,15
	<i>Bacillus anthracis</i> Vollum	CP076225.1	91,79
268-1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	98,39
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	98,04
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	98,04
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	97,86

Tabela 6 - Identificação dos isolados que foram efetivos mediante amplificação de genes específicos e sua similaridade com espécies depositadas na base de dados biológicos do National Center for Biotechnology Information (GenBank-NCBI).

(continua)			
ID	Espécie	Acesso GenBank	Similaridade (%)
531a''-2	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	98,90
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	98,54
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	98,54
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	98,35
365bng8-1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	98,89
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	98,73
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	98,73
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	98,35
365bnp6-3	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	97,10
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	96,58
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	96,74
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	96,56
742d'-3	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	CP034551.1	98,97
	<i>Bacillus anthracis</i> Vollum	CP076225.1	91,86
427b-1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	98,46
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	98,07
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	98,07
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	97,88
387a-1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	98,09
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	97,71
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	97,71
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	97,52

Tabela 6 - Identificação dos isolados que foram efetivos mediante amplificação de genes específicos e sua similaridade com espécies depositadas na base de dados biológicos do National Center for Biotechnology Information (GenBank-NCBI).

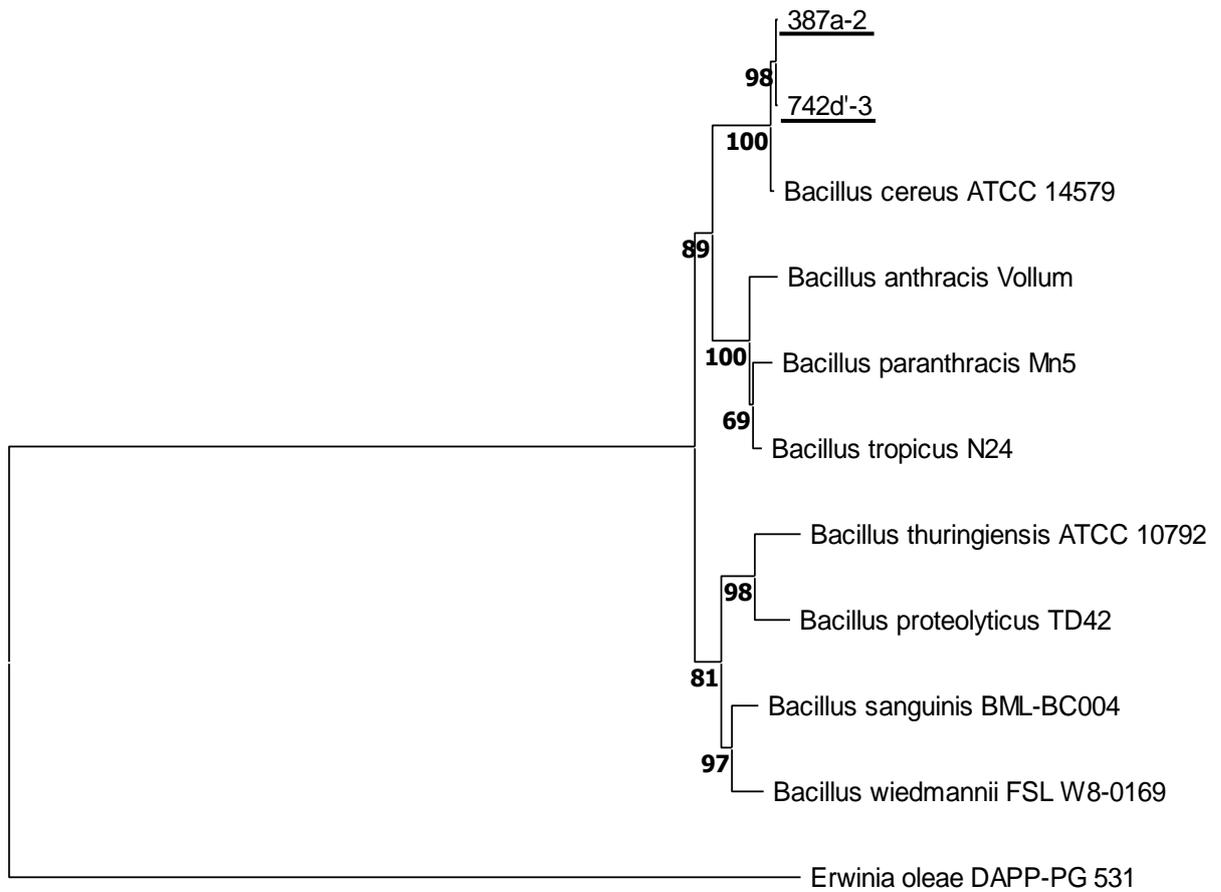
ID	Espécie	Acesso GenBank	(conclusão)
			Similaridade (%)
459b"2-1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685.1	97,70
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	CP041233.1	97,52
	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	JX425339.1	97,50
	<i>Serratia surfactantfaciens</i> YD25	CP016948.1	97,34

Fonte: elaboração própria.

6.8 FILOGENIA

A análise de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) foi utilizada, portanto as sequências foram concatenadas a fim de minimizar problemas que podem ocorrer em análises filogenéticas baseadas em um único gene (HANAGE et al., 2005). Para a árvore filogenética baseada no gene *Bacillus*, as sequências dos genes 16s e gyrB foram concatenadas, a espécie *Erwinia oleae* DAPP-PG 531 foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore (Figura 10). Para a árvore filogenética baseada no gene *Serratia*, as sequências dos genes 16s e rpoB foram concatenadas, a espécie *Enterobacter wuhouensis* WCHEs120002 foi utilizada como grupo externo para enraizamento da árvore (Figura 11).

As sequências foram processadas no programa Bioedit versão 7.0.5.3 Windows (HALL, 1998), sendo comparadas com linhagens tipo nos bancos de dados Genbank por meio do BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e alinhadas no programa CLUSTAL W, pacote do programa Bioedit. As árvores filogenéticas foram construídas pelo programa MEGA. O valor do bootstrap (1000 repetições) é demonstrado no início de cada nodo, mostrados em %. A barra de escala representa 2 substituições de nucleotídeos por posição em 100 nucleotídeos.



0.02

Figura 10 - Árvore filogenética de sequências concatenadas dos genes RNA ribossomal 16s e *gyrB* obtida pelo método de Neighbor-Joining, tendo *Erwinia oleae* como grupo externo. As sequências geradas neste estudo estão sublinhadas. Fonte: MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.

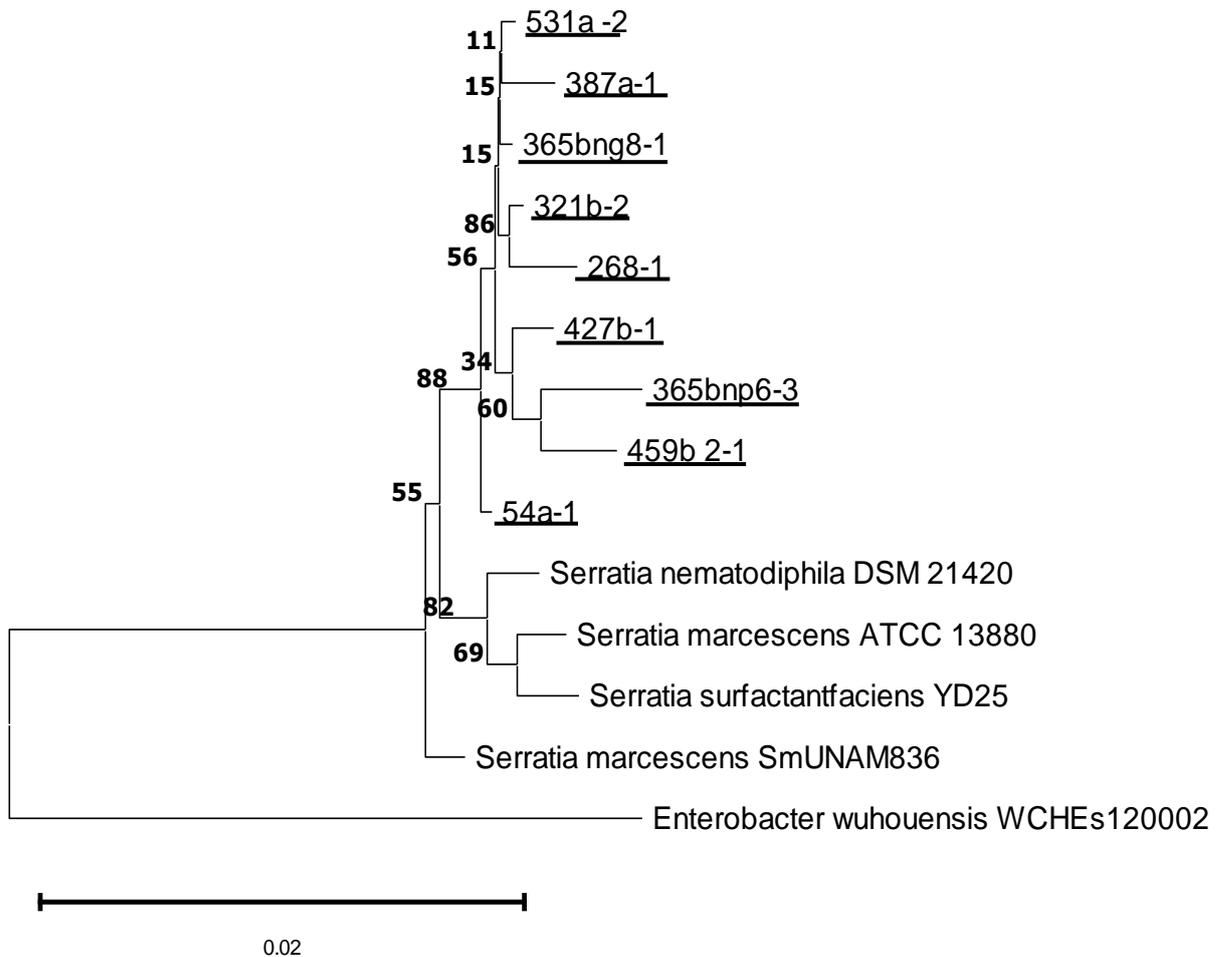


Figura 11 - Árvore filogenética de seqüências concatenadas dos genes RNA ribossomal 16s e rpoB obtida pelo método de Neighbor-Joining, tendo *Enterobacter wuhouensis* como grupo externo. As seqüências geradas neste estudo estão sublinhadas. Fonte: MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11

6.9 SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de antibiograma, realizado com as bactérias gram-negativas determina se há resistência do microrganismo de interesse a diferentes antibióticos. Os isolados bacterianos foram classificados de acordo com a recomendação do fabricante e medição do halo de inibição como: suscetível (S), intermediário (I) ou resistente (R), sendo resistentes aos antibióticos Amoxicilina, Nitrofurantoína e Metronidazol, e suscetíveis a Amicacina, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Imipenem e Sulfazotrin (Tabela 7), tendo os mesmos resultados entre si, assim como no sequenciamento genético.

Tabela 7 - Avaliação do antibiograma

ID	Tipo de antibiótico							
	Amicacina	Amoxicilina	Ceftazidima	Ciprofloxacina	Imipenem	Nitrofurantoína	Sulfazotrin	Metronidazol
321b-2	S	R	S	S	S	R	S	R
54a-1	S	R	S	S	S	R	S	R
268-1	S	R	S	S	S	R	S	R
531a''-2	S	R	S	S	S	R	S	R
365bng8-1	S	R	S	S	S	R	S	R
365b-2	S	R	S	S	S	R	S	R
427b-1	S	R	S	S	S	R	S	R
387a-1	S	R	S	S	S	R	S	R
459b''2-1	S	R	S	S	S	R	S	R

Fonte: elaboração própria.

7. DISCUSSÃO

Os isolados que resultaram em maior taxa de mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* foram identificados molecularmente como *B. cereus* (n=2) e *S. marcescens* (n=9).

Estudos realizados por Mora (2023) obtiveram resultados semelhantes, onde uma cepa de *B. cereus* foi efetiva para o controle de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), o percevejo-marrom. Dutta e Thakur (2021) utilizaram bactérias isoladas de amostras de solo da rizosfera de chá de Assam para controle de fungos, na qual os isolados promissores passaram por análise molecular e investigação de produção de enzimas quitinolíticas, onde *B. cereus* ATCC 14579 foi identificado e demonstrou a presença dessas enzimas que degradam a quitina presente no exoesqueleto dos artrópodes e na parede celular de fungos. Frederiksen et al., (2013) também identificaram *B. cereus* ATCC 14579 (a mesma linhagem de maior similaridade com os isolados do estudo) como produtor da enzima quitinolítica quitinase C.

Entretanto, diversos estudos envolvendo *B. cereus* ATCC 14579 (IVANOVA et al., 2003) demonstraram a presença de um gene codificador da citotoxina K (PESSOA; ASTOLFI-FILHO, 2014), que causa da síndrome diarreica, possui atividade citotóxica, necrótica e hemolítica que se enquadram como fatores primários de virulência em mamíferos. (ARSLAN et al., 2014; SAMAPUNDO et al., 2011), o que deve ser levado em consideração para futuras pesquisas. Há poucos estudos relacionando *B. cereus* a características entomopatogênicas devido a sua importância como patógeno humano, porém, também existem estudos que obtiveram sucesso na inativação de genes de *B. cereus* ATCC 14579 com atividade enterotoxigênica a mamíferos, demonstrando que existe a possibilidade da inativação de genes indesejáveis (LINDBÄCK et al., 1999).

Os outros 9 isolados demonstraram similaridade com *S. marcescens*. No que diz respeito ao potencial entomopatogênico, Bodade (2023) descreveu que diversas espécies do gênero *Serratia*, incluindo *S. marcescens*, foram isoladas de diversos insetos/térmites saudáveis, doentes e mortos. Em estudos realizados por Monreal & Reese (2011), *S. marcescens* foi considerada a mais ativa dentre 100 organismos testados para produção de quitinase.

Mason et al. (2022) realizaram experimentos semelhantes com os aqui descritos, realizando a aplicação de diferentes isolados de *Serratia* spp. para controle de *S. frugiperda* em condições de laboratório, demonstrando que houve mortalidade das lagartas, em diferentes níveis e variando com as metodologias aplicadas. Diversos estudos de investigação de características inseticidas provenientes de cepas de *S. marcescens* foram abordados, destacando

a presença de proteínas extracelulares, como nucleases, fosfolipases, DNase, lipase, quitinase, proteases, gelatinase (BARMAN et al., 2020; HINES et al., 1988, HEJAZI e FALKINER, 1997; TAO et al., 2006, 2007), demonstrando a ampla possibilidade de exploração dos diversos produtos extracelulares dessa bactéria. Além disso, *Serratia* spp. tem amplos estudos baseados em seus diversos outros metabólitos secundários como biossurfactantes, sideróforos, enzimas hidrolisantes e potencial promotor de crescimento de plantas (KESWANI et al., 2020; SILVA et al., 2022). Entretanto, *S. marcescens* é uma bactéria patogênica a mamíferos, o que é um entrave na sua utilização na biotecnologia na sua forma ativa mesmo com vários estudos demonstrando suas atividades entomopatogênicas.

Tanto o sequenciamento do gene 16s quanto do rpoB resultaram em maior semelhança genética especificamente com a linhagem SmUNAM836. Segundo o artigo de descrição da linhagem descrito por Sandner-Miranda et al., (2016), *S. marcescens* SmUNAM836 é uma cepa não pigmentada, patogênica e com múltipla resistência a antibióticos. Phillips; King (1977), descreveram que cepas patogênicas de *S. marcescens* que causam infecção humana não produzem pigmento, formando colônias incolores facilmente confundidas com coliformes, o que é similar a aparência das colônias das bactérias identificadas como *S. marcescens* neste estudo, que não produzem pigmento.

No Brasil, *Serratia* spp. é enquadrada na classe de risco 2 segundo a Portaria GM/MS Nº 3.398, de 7 de Dezembro de 2021 (BRASIL, 2021), que descreve a classificação de risco dos agentes biológicos. Dados da OMS também definem que *Serratia* spp. possui resistência a antibióticos e tem alta taxa de transmissibilidade e mortalidade, demonstrando alto risco para a saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017), sendo estes impedimentos legais para sua utilização como um bioinsumo em sua forma íntegra em meio de cultura. Também foi descrito que *S. marcescens* tem alto potencial de sobrevivência em condições extremas, como em desinfetantes, antissépticos (MARRIE; COSTERTON, 1981; NAKASHIMA; HIGHSMITH; MARTONE, 1987), e água bidestilada (NAKASHIMA; HIGHSMITH; MARTONE, 1987), sendo um problema grave em hospitais.

Entretanto há uma alternativa com a utilização de engenharia genética, Okay & Alshehri (2020) realizaram a clonagem e superexpressão de um gene quitinolítico de *S. marcescens* linhagem Bn10 em *Bacillus subtilis* 168, resultando em atividade ótima em condições alcalinas e alta temperatura, integrando a característica inseticida desejável de *S. marcescens* inserida em um microrganismo de interesse que já é amplamente utilizado. Diversos outros estudos realizado ao longo dos anos exploram a clonagem de genes de linhagens de *S. marcescens* que codificam a quitinase chegando a resultados bem sucedidos

(MURATOĞLU et al., 2015; SUNDHEIM; POPLAWSKY; ELLINGBOE, 1988; WU; CHENG; LI, 2009), sendo essa uma saída para a utilização das características desejáveis dos isolados identificados para aplicações biotecnológicas sem o entrave da sua patogenicidade para mamíferos.

Diversos estudos futuros podem ser abordados, como:

- A investigação dos metabolitos secundários, verificando se há alguma ação benéfica desses compostos;
- Realizar o sequenciamento completo do genoma das bactérias selecionadas, investigando os genes de interesse que codificam as proteínas inseticidas e os genes responsáveis pela patogenicidade a mamíferos;
- Utilizar os genes de interesse para testes com superexpressão do gene e sua transferência para outros organismos benignos utilizando CRISPR-Cas para edição genômica;
- Investigar a interação entre diferentes isolados, se em sinergia resultam em maior mortalidade das lagartas em relação ao seu efeito isolado;
- Verificar potencial perigo do produto final da pesquisa para mamíferos e organismos benéficos;

A engenharia genética tem avançado exponencialmente a cada ano, sendo a exploração e manipulação do genoma cada vez mais estudado e realizado ao redor do mundo, tornando a prospecção de genes de interesse extremamente necessário para o futuro do agronegócio e o desenvolvimento de novas tecnologias. As bactérias investigadas nesse estudo demonstraram alta mortalidade de *S. frugiperda*, tendo potencial para investigação de suas características para o desenvolvimento de novos produtos.

8. CONCLUSÃO

Dos 80 isolados avaliados, 11 isolados demonstraram mortalidade de *S. frugiperda*, entre 90 e 100%, e obtiveram sucesso no sequenciamento genético, sendo 2 identificados como *Bacillus cereus*: 387a-2, 742d'-3; e 9 com *Serratia marcescens*: 321b-2, 54a-1, 268-1, 531a"-2, 365bng8-1, 365bnp6-3, 427b-1, 387a-1, 459b"2-1. Os isolados 189b"2, 194b e 739a" foram efetivos no screening 2, mas após passarem por purificação não foram efetivos separadamente, portanto, há a possibilidade de investigação da ação entomopatogênica desses isolados em sinergia, sendo os grupos: (189b"2-1, 189b"2-2, 189b"2-3); (194b-1, 194b-2, 194b-3) e (739a"-1, 739a"-2).

Os diversos estudos abordados, junto dos resultados obtidos nesse trabalho demonstram o potencial dessas bactérias para a aplicação na biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S.l.], v 54, n 6, 2004. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.63094-0>. Acesso em: 19 out. 2023.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N. F2 Screen for Rare Resistance Alleles. *Journal of Economic Entomology*. **Oxford Academic**, [S.l.], v 91, n 3, 1998. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/jee/91.3.572>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- ARSLAN, S.; EYI, A.; KÜÇÜKSARI, R. Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of Bacillus cereus group strains from ice cream. **Anaerobe Academic Press**, [S.l.], v 25, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24309214/>. Acesso em: 24 out. 2023.
- ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. **Spodoptera frugiperda - Profile**, 2023. Disponível em: <https://www.pesticideresistance.org/display.php?page=species&arId=200>. Acesso em: 2 ago. 2023.
- ARTURO RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. et al. Selección de cepas de Bacillus spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales selection of antibiotic-producing strains of Bacillus spp. isolated from tropical fruits. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, [Chapingo], v 17, n 1, 2011. Disponível em: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2011000400002. Acesso em: 9 abr. 2024.
- BARMAN, S.; BHATTACHARYA, S. S.; MANDAL, N. C. Chapter 3 – Serratia. **Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi**. [s.l.]: Academic Press, 2020. 27-36 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00003-4>. Acesso em: 27 out. 2023.
- BARROS, R. et al. Flutuação populacional de insetos predadores associados a pragas do algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, Dourados, v. 73, n.1, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/ncvBNGGLgM8nGBHYHFXn8BP/?format=pdf>. Acesso em: 22 mar. 2023.
- BATEMAN, M. L. et al. Assessment of potential biopesticide options for managing fall armyworm (Spodoptera frugiperda) in Africa, **Journal of Applied Entomology**, [S.l.], v. 142, n. 9, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jen.12565>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, Seattle, USA, v. 45, n. 4, 1966. Disponível em: https://dx.doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493. Acesso em: 10 abr. 2024.

BERNARDI, O. et al. Selection and characterization of resistance to the Vip3Aa20 protein from *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, [S.l.], v 72, n 9, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733182/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

BIANCHINI, K. DOS S. **Seleção e caracterização de estirpes de *Bacillus Thuringiensis* tóxicas à *Spodoptera eridania* (Cramer), *Spodoptera cosmioides* (Walker) e *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2008. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.uel.br/document/?code=vtls000145659>. Acesso em: 19 ago. 2023.

BOAVENTURA, D. et al. Detection of a ryanodine receptor target-site mutation in diamide insecticide resistant fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, [S.l.], v. 76, n. 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31157506/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

BOAVENTURA, D. et al. Toxicological and molecular profiling of insecticide resistance in a Brazilian strain of fall armyworm resistant to Bt Cry1 proteins. **Pest Management Science**, [S.l.], v. 77, n. 8, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.6061>. Acesso em: 31 jul. 2023.

BODADE, R. G. Secondary metabolites from *Serratia* sp. and their applications. ABD-ELSALAM, K. A.; MOHAMED, H. I. (Eds.). **Bacterial Secondary Metabolites: Synthesis and Applications in Agroecosystem**. Chennai, IN: Elsevier, 2024. p. 259–275.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a união europeia**. 1. ed. São Paulo, SP: USP, 2017. p. 53-37. Disponível em: <https://drive.google.com/file/d/1uRgO057EGY59I880BfPBu8LcviBpFD2V/view?pli=1>. Acesso em: 28 jul. 2023.

BOREGAS, K. G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, Belo Horizonte, ed. 72, n. 1, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/brag/a/C8CZcxRW9xwgi8tNDJ8mpvS/?lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2023.

BOTTON, M. et al. Preferência alimentar e biologia de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. In: **SOCIEDADE ENTOMOLÓGICA DO BRASIL**, Pelotas. **Anais**. Sociedade Entomológica do Brasil, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/aseb/a/6smT6CnmSXcQrKJzTS4fPtQ/?lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2023.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ato nº 45, de 09 de junho de 2017. Brasília, 2017. 9 p. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/MINISTRIODAAGRICULTURAATO45_ret_ato_52e85_2017_correcao09_07_2018.pdf. Acesso em: 25 mar. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Classificação de Risco dos Agentes Biológicos**. 3. ed. Brasília, 2017.

BRASIL. Portaria GM/MS Nº 3.398 Nº 3.398, de 7 de dezembro de 2021. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-3.398-de-7-de-dezembro-de-2021-370619275>. Acesso em: 23 out. 2023.

BRAVO, A. et al. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. Pergamon, v. 41, n. 7, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21376122/>. Acesso em: 22 mar. 2023.

BURTET, L. M. et al. Managing fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), with Bt maize and insecticides in southern Brazil. **Pest Management Science**, [S.l.], v. 73, n. 12, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.4660>. Acesso em: 27 jul. 2023.

CAMPANINI, E. B. et al. Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. **Bragantia**. [Campinas], v. 71, n. 3, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/brag/a/wTXsbJqDq83XzgtSqYrvDbG/?lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2023.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Public Library of Science**, [S.l.], v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0062268>. Acesso em: 27 jul. 2023.

CHANDRASENA, D. I. et al. Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F δ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest Management Science**. [S.l.], v. 74, n. 3, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.4776>. Acesso em: 27 jul. 2023.

CLAVO, R. F.; ORTEGA, C. D. A.; RUIZ QUINONES, N. **16s rDNA sequencing reaction and precipitation protocol**. [Protocolo]. [S.l.]. 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.brzpm75n>. Acesso em: 13 ago. 2023.

COMITÊ BRASILEIRO DE AÇÃO À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS, **Recomendações de Manejo de Resistência a Inseticidas e Manejo de Pragas para Soja, Algodão e Milho no Brasil**. [S.l.], 2024. Disponível em: <https://www.irc-br.org/single-post/recomenda%C3%A7%C3%B5es-de-manejo-de-resist%C3%Aancia-a-inseticidas-e-manejo-de-pragas-para-soja-algod%C3%A3o-e-milho-n>. Acesso em: 20 ago. 2023.

COMITÊ BRASILEIRO DE AÇÃO À RESISTÊNCIA A INSETICIDAS. **Você sabe o que é resistência das pragas aos inseticidas?** [S.l.], 2021. Disponível em: <https://www.irac-br.org/single-post/voc%C3%AA-sabe-o-que-%C3%A9-resist%C3%AAncia-das-pragas-aos-inseticidas>. Acesso em: 31 jul. 2023.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**. Brasília, DF, 2023. v. 10, p. 58. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/44171_1d9f893d78f593b07d41887104acc43f. Acesso em: 11 fev. 2024.

CONSTANSKI, K. C. et al. Seleção e caracterização molecular de isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Spodoptera* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [Brasília], v. 50, n. 8, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/pab/a/zZQDd96zskY79QNkkhXrXZN/?lang=pt>. Acesso em: 26 mar. 2023.

CROPLIFE. **Biodefensivos, cada vez mais presentes no campo**. Brasília, 2023. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/biodefensivos-cada-vez-mais-presentes-no-campo/#from-home>. Acesso em: 26 jul. 2023.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. **Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitoide de ovos *Trichogramma pretiosum***. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2004. 4p. (Comunicado Técnico, 98). Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767891/control-biologico-da-lagarta-do-cartucho-do-milho-utilizando-o-parasitoide-de-ovos-trichogramma-pretiosum.pdf/6b31beacca94-4b16-8872-8f1ed4774bed>. Acesso em: 8 ago. 2023.

DANGAL, V.; HUANG, F. Fitness costs of Cry1F resistance in two populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), collected from Puerto Rico and Florida. **Journal of Invertebrate Pathology**, [S.l.], v. 127, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25791021/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

DE MELO, E. P. et al. Disposição espacial e injúrias da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. **Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 3, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rceres/a/trQjNzS7xfvGqYf55Sr7mDC/?lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2023.

DUTTA, J.; THAKUR, D. Diversity of culturable bacteria endowed with antifungal metabolites biosynthetic characteristics associated with tea rhizosphere soil of Assam, India. **BMC Microbiology**, [S.l.], v. 21, n. 1, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34275448/>. Acesso em: 25 set. 2023.

ESIKOVA, T. Z. et al. Secondary antimicrobial metabolites produced by thermophilic *Bacillus* spp. strains VK2 and VK21. **Applied Biochemistry and Microbiology**. [S.l.], v. 38, n. 3, 2002. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1015463122840>. Acesso em: 22 mar. 2023.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, [S.l.], v. 64, 2014. Disponível em: <https://experts.umn.edu/en/publications/field-evolved-resistance-to-cry1f-maize-by-spodoptera-frugiperda->. Acesso em: 26 jul. 2023.

FARIAS, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest management science**, [S.l.], v. 72, n. 5, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26172071/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, 1985. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2408678>. Acesso em: 13 ago. 2023.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/yjKLJXN9KysfmX6rvL93TSh/abstract/?lang=en>. Acesso em: 19 out. 2023.

FERREIRA, M. E. P. Comparação de métodos para isolamento de linhagens endofíticas e edáficas de *Bacillus thuringiensis* Berliner em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L). 2012. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2012.

FERRON, P. Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 23, 1978. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>. Acesso em: 8 ago. 2023.

FRAZZON, A. P. G. et al. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, [S.l.], v. 94, n 1-2, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11078949/>. Acesso em: 8 ago. 2023.

FREDERIKSEN, R. F. et al. Bacterial chitinases and chitin-binding proteins as virulence factors. **Microbiology**, [S.l.], v. 159, n. 5, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.051839-0>. Acesso em: 24 out. 2023.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. São Paulo: CERES, 1978.

GAUGLER, R., KAYA, H. K. **Entomopathogenic nematodes in biological control**. Florida, 1990. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Randy-Gaugler/publication/236596526_Gaugler_R_Kaya_HK_Eds_1990_Entomopathogenic_Nematodes_in_Biological_Control_CRC_Press_365_pp/links/00b4953ad79152016b000000/Gaugler-R-Kaya-HK-Eds-1990-Entomopathogenic-Nematodes-in-Biological-Control-CRC-Press-365-pp.pdf. Acesso em: 20 mar. 2024

GOMES, C. DE M. **Custo adaptativo e perda da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) resistente ao milho Bt**. 2020. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/202752>. Acesso em: 27 jul. 2023.

HAJEK, A. E.; ST LEGER, R. J. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. **Annual Review Of Entomology**, Ithaca, v. 39, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>. Acesso em: 09 ago. 2023.

HALL, T. A. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Versão 7.0.5.3 1998.

HANAGE, W. P. et al. Using Multilocus Sequence Data To Define the Pneumococcus. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 187, n. 17, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.187.17.6223-6230.2005>. Acesso em: 14 mai. 2024.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. **Journal of Medical Microbiology**, [S.n.], v. 46, n. 11, 1997. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-46-11-903>. Acesso em: 23 out. 2023.

HINES, D. A. et al. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 170, n. 9, 1988. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.170.9.4141-4146.1988>. Acesso em: 9 abr. 2024.

HORIKOSHI, R. J. et al. Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports**, [S.l.] v. 6, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep34864>. Acesso em: 26 jul. 2023.

HOY, M. A. Multitactic Resistance Management: An Approach that is Long Overdue?. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 78, n. 3, 1995. Disponível em: <https://journals.flvc.org/flaent/article/view/59146>. Acesso em: 31 jul. 2023.

HUANG, F. et al. Cry1F Resistance in Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*: Single Gene versus Pyramided Bt Maize. **Public Library of Science**, [S.l.], v. 9, n. 11, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112958>. Acesso em: 27 jul. 2023.

HUANG, F. Resistance of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to transgenic *Bacillus thuringiensis* Cry1F corn in the Americas: lessons and implications for Bt corn IRM in China. **Insect Science**, [S.l.], v. 28, n. 3, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1744-7917.12826>. Acesso em: 26 jul. 2023.

IKEDA, M.; HAMAJIMA, R.; KOBAYASHI, M. Baculoviruses: Diversity, evolution and manipulation of insects. **Entomological Science**, Nagoya, v. 18, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ens.12105>. Acesso em: 27 jul. 2023.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRICULTURAL BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA. **Brief 54: Global Status of Commercialized Biotech/GM**, 2018. Disponível em: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/54/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

IVANOVA, N. et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. **Nature**, [S.l.], v. 423, 2003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature01582>. Acesso em: 24 out. 2023.

KESWANI, C. et al. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 104, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10300-8>. Acesso em: 26 out. 2023.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**. [S.n], v. 16, 1980. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01731581>. Acesso em: 13 ago. 2023.

KOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annual Review of Entomology*. [S.l.], v. 43, 1998. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.ento.43.1.243>. Acesso em: 20 mar. 2024.

KONECKA, E. et al. Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains Isolated from Soil and Water. **The Scientific World Journal**, [S.l.], v. 2012, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22666145/>. Acesso em: 22 mar. 2023.

LANE D. J. **16S/23S rRNA sequencing**. 1. ed. Nova York, Chichester, 199. p. 115–175.

LINDBÄCK, T. et al. Insertional inactivation of *hblC* encoding the L2 component of *Bacillus cereus* ATCC 14579 haemolysin BL strongly reduces enterotoxigenic activity, but not the haemolytic activity against human erythrocytes. **Microbiology**. [S.l.], v. 145, n. 11, 1999. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-145-11-3139>. Acesso em: 24 out. 2023.

LU, C. et al. Neonicotinoid insecticides in the drinking water system – Fate, transportation, and their contributions to the overall dietary risks. **Environmental Pollution**, [S.l.], v. 258, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749119351383?via%3Dihub>. Acesso em: 22 mar. 2023.

MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Manejo da resistência: Na era das plantas transgênicas. **Oecologia Australis**, [S.l.], v. 15, n. 2, 2011. Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/8129>. Acesso em: 25 mar. 2023.

CRESPO, M. A. et al. **Manejo da lagarta-do-cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*): panorama geral das atualizações no controle alternativo**. Alegre: IFES, 2021. 20p. (Boletim técnico, 6). Disponível em: <https://biblioteca.incaper.es.gov.br/digital/bitstream/123456789/4192/1/Boletim-Tecnico-N6.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2023.

MARRIE, T. J.; COSTERTON, J. W. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 42, n. 6, 1981. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.42.6.1093-1102.1981>. Acesso em: 23 out. 2023.

MASON, C. J. et al. Concerted impacts of antiherbivore defenses and opportunistic *Serratia* pathogens on the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Oecologia**, [S.l.], v. 198, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00442-021-05072-w>. Acesso em: 24 out. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Bioinsumos é lançado e vai impulsionar uso de recursos biológicos na agropecuária. [S.l.], 2020 Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/programa-nacional-de-bioinsumos-e-lancado-e-vai-impulsionar-uso-de-recursos-biologicos-na-agropecuaria-brasileira>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Programa Nacional de Bioinsumos é lançado e vai impulsionar uso de recursos . Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 25 mar. 2024.

MOLLET, C.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. **Molecular microbiology**, [S.l.], v. 26, n. 5, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9426137/>. Acesso em: 25 out. 2023.

MONREAL, J.; REESE, E. T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, Canada, v. 15, n. 7, 1969. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/m69-122>. Acesso em: 23 out. 2023.

MONTEZANO, D. G. et al. Host Plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology**, Durban, v. 26, n. 2, 2018. Disponível em: <https://bioone.org/journals/african-entomology/volume-26/issue-2/003.026.0286/Host-Plants-of-Spodoptera-frugiperda-Lepidoptera--Noctuidae-in-the/10.4001/003.026.0286.short>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MOORE, R. G.; HANKS, L. M. Aerial dispersal and host plant selection by neonate *Thyridopteryx ephemeraeformis* (Lepidoptera: Psychidae). **Ecological Entomology**, [S.l.], v. 29, n. 3, 2004. Disponível em: <https://resjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0307-6946.2004.00611.x>. Acesso em: 22 mar. 2023.

MORA, S. F. E. **Prospecção de bactérias entomopatogênicas para o controle do percevejo- marrom *Euschistus heros* (Fabricius, 1798)**. 2023. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) - Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2023.

MOREIRA, H. J. D. C.; ARAGÃO, F. D. **Manual de Pragas do Milho**. Campinas, 2009. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/downloads/manual%20de%20pragas%20do%20milho.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2023.

MOSCARDINI, V. F. et al. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize expressing Cry1F, Cry1A.105, Cry2Ab2 and Vip3Aa20 proteins to manage the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, [S.l.], v. 137, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219420302027>. Acesso em: 26 jul. 2023.

MURATOĞLU, H. et al. Cloning and expression of chitinase A, B, and C (*chiA*, *chiB*, *chiC*) genes from *Serratia marcescens* originating from *Helicoverpa armigera* and determining their activities. **Turkish Journal of Biology**, [S.l.], v. 39, n. 1, 2015. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol39/iss1/9/>. Acesso em: 23 out. 2023.

NAGOSHI, R. N. Can the Amount of Corn Acreage Predict Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Infestation Levels in Nearby Cotton?. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 102, n. 1. 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/102/1/210/2199115>. Acesso em: 22 mar. 2023.

NAKASHIMA, A. K.; HIGHSMITH, A. K.; MARTONE, W. J. Survival of *Serratia marcescens* in benzalkonium chloride and in multiple-dose medication vials: relationship to epidemic septic arthritis. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 25, n. 6, 1987. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.25.6.1019-1021.1987>. Acesso em: 23 out. 2023.

OKAY, S.; ALSHEHRI, W. A. Overexpression of Chitinase A Gene from *Serratia marcescens* in *Bacillus subtilis* and Characterization of Enhanced Chitinolytic Activity. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/344449365_Overexpression_of_Chitinase_A_Gene_from_Serratia_marcescens_in_Bacillus_subtilis_and_Characterization_of_Enhanced_Chitinolytic_Activity. Acesso em: 24 out. 2023.

ONU BRASIL. Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável no Brasil. Nações Unidas Brasil. 2022. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 20 mar. 2024.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest management science**, [S.l.], v. 72, n. 9, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26617261/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PANDA A.K. et al. *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie Van Leeuwenhoek*. [S.l.], v. 105, n. 4, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10482-013-0099-7>. Acesso em: 28 mar. 2024.

PARRA, J. R. P. Controle Biológico na Agricultura Brasileira. **Entomological Communications**, v. 1, 2019. Disponível em: <https://entomologicalcommunications.org/index.php/entcom/article/view/ec01002>. Acesso em: 26 jul. 2023.

PESSOA, A. DA S. et al. *Bacillus thuringiensis* Berliner e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Erebidae) sob ação de extratos vegetais. **Arquivos do Instituto Biológico**, [São Paulo], v. 81, n. 4, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/aib/a/XhMQNMzHpCqBjzHvGyzRWhM/?lang=pt>. Acesso em: 22 mar. 2023.

PESSOA, M. C. F.; ASTOLFI-FILHO, S. Prevalência de enterotoxinas em linhagens de *Bacillus thuringiensis* e métodos para sua caracterização genotípica: Revisão. **Scientia Amazonia**, [Manaus], v. 3, n. 2, 2014. Disponível em: <https://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/06/v3-n2-47-64-2014.pdf>. Acesso em: 24 out. 2023.

PHILLIPS, I.; KING, A. *Serratia marcescens* in hospital practice. **The Lancet**, [S.l.], v. 309, 1977. Disponível em: <http://www.thelancet.com/article/S0140673677913927/fulltext>. Acesso em: 23 out. 2023.

QINQIN, W. et al. Research progress on insecticides resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Chinese Journal of Pesticide Science**, v. 21, n. 4, 2019. Disponível em: <http://www.nyxxb.cn/en/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2019.0072>. Acesso em: 26 jul. 2023.

ROH, J. Y. et al. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. **J Microbiol Biotechnol**, [S.l.], v. 17, n. 14, 17 abr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18051264/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

RUIU L. *Brevibacillus laterosporus*, a Pathogen of Invertebrates and a Broad Spectrum Antimicrobial Species. **Insects**. [S.l.], v. 4, n. 3, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4553477/>. Acesso em: 28 mar. 2024.

RUIZ QUIÑONES, N. **Caracterização taxonômica de actinobactérias isoladas de ambiente salino e avaliação de seus compostos com potencial antiproliferativo**. 2020. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, na Área de Microbiologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2020. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/1239013>. Acesso em: 20 mai. 2023.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, [S.l.], v. 4, n. 4, 1987. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>. Acesso em: 13 ago. 2023.

SAMAPUNDO, S. et al. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 1, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21840614/>. Acesso em: 24 out. 2023.

SANDNER-MIRANDA, L. et al. Complete Genome Sequence of *Serratia marcescens* SmUNAM836, a Nonpigmented Multidrug-Resistant Strain Isolated from a Mexican Patient with Obstructive Pulmonary Disease. **Genome Announcements**, Washington, v. 4, n. 1, 2016. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomea.01417-15>. Acesso em: 23 out. 2023.

SANTOS-AMAYA, O. F. et al. Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. **Pest management science**, [S.l.], v. 73, n. 1, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27147125/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

- SARMENTO, R. D. A. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, [S.l.], v. 18, n. 2, 2002. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6418>. Acesso em: 22 mar. 2023.
- SILVA, C. R. et al. Genomic analysis and plant growth-promoting potential of a *Serratia marcescens* isolated from food. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 1, n. 1, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/24799>. Acesso em: 26 out. 2023.
- SOLOGUREN, L. Demanda mundial cresce e Brasil tem espaço para expandir produção. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 13, 2015. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/Esalq-VA13-Milho.pdf>. Acesso em: 24 out. 2023.
- SOUSA, F. F. et al. Life-History Traits of *Spodoptera frugiperda* Populations Exposed to Low-Dose Bt Maize. **PLOS ONE**, [S.l.], v. 11, n. 5, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156608>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- STORER, N. P. et al. Discovery and Characterization of Field Resistance to Bt Maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, [S.l.], v. 103, n. 4, 2010. Disponível em: <https://academic.oup.com/jee/article/103/4/1031/2199574>. Acesso em: 22 mar. 2023.
- SUNDHEIM, L.; POPLAWSKY, A. R.; ELLINGBOE, A. H. Molecular cloning of two chitinase genes from *Serratia marcescens* and their expression in *Pseudomonas* species. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [S.l.], v. 33, n. 3, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0885576588900136>. Acesso em: 23 out. 2023.
- TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; CARRIÈRE, Y. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Tucson, v. 102, n. 43, 2005. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0507857102>. Acesso em: 26 jul. 2023.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, [S.l.], v. 38, n. 7, 2021. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msab120>. Acesso em: 13 ago. 2023.
- TAO, K. et al. Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. **Current Microbiology**, [S.l.], v. 52, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-005-0089-8>. Acesso em: 24 out. 2023.
- TAO, K. et al. Cloning, expression, and purification of insecticidal protein Pr596 from locust pathogen *Serratia marcescens* HR-3. **Current Microbiology**, [S.l.], v. 55, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-007-0096-z>. Acesso em: 24 out. 2023.
- TURNER, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **The Journal of eukaryotic microbiology**,

[S.l.], v. 46, n. 4, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10461381/>. Acesso em: 19 out. 2023.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Agricultural Projections to 2031**: Interagency Agricultural Projections Committee. Washington, 2022. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/103310/oce-2022-01.pdf?v=4673.4>. Acesso em: 23 out. 2023.

VALICENTE, F. H. **Manejo Integrado de Pragas na Cultura do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2015. 13p. (Circular técnica, 208). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2023

VALICENTE, F. H.; TUELHER, E. S. **Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, Spodoptera frugiperda, com Baculovírus**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2009. 14p. (Circular técnica, 114). Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1344498/2767891/control-biologico-da-lagarta-do-cartucho-com-baculovirus.pdf/2e536084-d40f-4e6f-8145-b6880c1487a5>. Acesso em: 2 ago. 2023.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 29, n. 11, 1991. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.29.11.2578-2586.1991>. Acesso em: 13 ago. 2023.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Desenvolvimento e mortalidade larval de Spodoptera frugiperda em folhas de milho tratadas com extrato aquoso de folhas de Azadirachta indica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/brag/a/gmcRKLtqYYPFvpzbtbfxPfQQ/?lang=pt>. Acesso em: 10 abr. 2024.

VOSS, M. **Manual de técnicas laboratoriais para obtenção, manutenção e caracterização de nematoides entomopatogênicos**. Passo Fundo: EMBRAPA, 2009. 38 p. (Documentos online, 119). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do119_1.htm. Acesso em: 8 ago. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis**. Genebra: WHO/EMP/IAU. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>. Acesso em: 24 out. 2023.

WU, Y. J.; CHENG, C. Y.; LI, Y. K. Cloning and Expression of Chitinase A from Serratia Marcescens for Large-Scale Preparation of N,N-Diacetyl Chitobiose. **Journal of the Chinese Chemical Society**, [S.l.], v. 56, n. 4, 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jccs.200900103>. Acesso em: 23 out. 2023.

**APÊNDICE A – TABELA DE INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO
SEQUENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS
SELECIONADOS**

(continua)						
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %
	Ref	321b-2	-	-	-	-
<i>Serratia</i>	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,72	4/1431	100
	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,58	6/1431	100
	3	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,58	6/1431	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,95	15/1431	99,5
	Ref	54a-1	-	-	-	-
<i>Serratia</i>	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,51	7/1417	100
	2	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,36	9/1417	100
	3	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,22	11/1417	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,73	18/1417	99,5
	Ref	387a-2	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	1	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	100	0/1396	100
	2	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	99,93	1/1396	100
	3	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	99,93	1/1396	100
	4	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	99,93	1/1396	100

(continuação)

Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Completo ^E %
<i>Bacillus</i>	5	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	99,93	1/1396	100
	6	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	CP034551.1	99,86	2/1396	100
	7	<i>Bacillus tropicus</i> N24 (T)	MACG01000025	99,86	2/1396	100
	8	<i>Bacillus fungorum</i> (T)	MG601116	99,86	2/1396	100
	9	<i>Bacillus anthracis</i> Vollum (T)	CP076225	99,86	2/1396	100
	10	<i>Bacillus paramycoides</i> NH24A2 (T)	MAOI01000012	99,79	3/1396	100
	Ref	268-1	-	-	-	-
<i>Serratia</i>	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,65	5/1423	100
	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,51	7/1423	100
	3	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,51	7/1423	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,88	16/1423	99,5
	Ref	531a”-2	-	-	-	-
<i>Serratia</i>	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,58	6/1431	100
	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,44	8/1431	100
	3	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,44	8/1431	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,95	15/1431	99,5

(continuação)

Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil C %	Dif. /total ^D	Completo ^E %
<i>Serratia</i>	Ref	365bng8-1	-	-	-	-
	1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,66	4/1168	100
	2	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,49	6/1168	100
	3	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,49	6/1168	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,72	15/1168	99,5
<i>Serratia</i>	Ref	365bnp6-3	-	-	-	-
	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,68	4/1264	100
	2	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,53	6/1264	100
	3	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,37	8/1264	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,81	15/1264	99,5
<i>Bacillus</i>	Ref	742d³-3	-	-	-	-
	1	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	100	0/1396	100
	2	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	99,93	1/1396	100
	3	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	99,93	1/1396	100
	4	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	99,93	1/1396	100
	5	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	99,93	1/1396	100
6	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	CP034551.1	99,86	2/1396	100	

(continuação)						
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %
<i>Bacillus</i>	7	<i>Bacillus tropicus</i> N24 (T)	MACG01000025	99,86	2/1396	100
	8	<i>Bacillus fungorum</i> (T)	MG601116	99,86	2/1396	100
	9	<i>Bacillus anthracis</i> Vollum (T)	CP076225	99,86	2/1396	100
	10	<i>Bacillus paramycoides</i> NH24A2 (T)	MAOI01000012	99,79	3/1396	100
<hr/>						
<i>Serratia</i>	Ref	427b-1	-	-	-	-
	1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,66	4/1180	100
	2	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,66	4/1180	100
	3	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,66	4/1180	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,56	17/1180	99,5
<hr/>						
<i>Serratia</i>	Ref	459b”2-2	-	-	-	-
	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,65	5/1437	100
	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,51	7/1437	100
	3	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,51	7/1437	100
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	99,03	14/1437	99,5

							(conclusão)
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %	
	Ref	387a-1	-	-	-	-	
Serratia	1	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,64	5/1377	100	
	2	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,49	7/1377	100	
	3	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,49	7/1377	100	
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,98	14/1377	99,5	
	Ref	459b”2-1	-	-	-	-	
Serratia	1	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880 (T)	JMPQ01000005	99,63	5/1355	100	
	2	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420 (T)	JPUX01000001	99,63	5/1355	100	
	3	<i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836	CP012685	99,63	5/1355	100	
	4	<i>Serratia ureilytica</i> NiVa 51 (T)	AJ854062	98,82	16/1355	99,5	

Rank^A - Numeração da classificação de similaridade; **GenBank^B** - Número de acesso da sequência no Genbank; **Simil %^C** - Similaridade entre as sequências; **Dif./total^D** - O número de nucleotídeos diferentes em relação ao total; **Comple^E* %^E** - Cobertura da comparação realizada entre o isolado selecionado e a sequência do gene RNA ribossomal 16S de referência contido no banco de dados. Fonte: Elaboração própria.

**APÊNDICE B – TABELA DE INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES DO
SEQUENCIAMENTO DO GENE RIBOSSOMAL 16S DOS ISOLADOS NÃO
SELECIONADOS**

(continua)						
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comp let ^E %
<i>Bacillus</i>	Ref	556b”-1	-	-	-	-
	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	99,64	3/831	100
	2	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	99,64	3/831	100
	3	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	99,64	3/831	100
	4	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF01000036	99,64	3/831	100
	5	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	99,64	3/831	100
	6	<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 (T)	MW674728	99,64	3/831	98,5
	7	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	99,52	4/831	100
	8	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	99,52	4/831	100
	9	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	99,52	4/831	100
10	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	99,52	4/831	100	
<i>Bacillus</i>	Ref	531a”-1	-	-	-	-
	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	99,24	6/788	100
	2	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	99,24	6/788	100

(continuação)						
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %
<i>Bacillus</i>	3	<i>Bacillus luti luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	99,24	6/788	100
	4	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF01000036	99,24	6/788	100
	5	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	99,24	6/788	100
	6	<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 (T)	MW674728	99,24	6/788	98,5
	7	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	99,11	7/788	100
	8	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	99,11	7/788	100
	9	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	99,11	7/788	100
	10	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	99,11	7/788	100
	Ref	189b''2-3	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	96,73	29/888	100
	2	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	96,73	29/888	100
	3	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	96,73	29/888	100
	4	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	96,73	29/888	100
	5	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	96,73	29/888	100
	6	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	96,73	29/888	100

(continuação)

Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %
<i>Bacillus</i>	7	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF01000036	96,73	29/888	100
	8	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	96,73	29/888	100
	9	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	96,73	29/888	100
	10	<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 (T)	MW674728	96,73	29/888	98,5
	Ref	194b-1	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	99,75	2/803	100
	2	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	99,75	2/803	100
	3	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	99,75	2/803	100
	4	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	99,75	2/803	100
	5	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	99,75	2/803	100
	6	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	99,75	2/803	100
	7	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF01000036	99,75	2/803	100
	8	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	99,75	2/803	100
	9	<i>Bacillus fungorum</i>	MG601116	99,75	2/803	100
	10	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	99,75	2/803	100

(continuação)

Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %
	Ref	189b”2-1	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	99,64	3/828	100
	2	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE0100008 7	99,64	3/828	100
	3	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI0100004 1	99,64	3/828	100
	4	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF0100003 6	99,64	3/828	100
	5	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	99,64	3/828	100
	6	<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 (T)	MW674728	99,64	3/828	98,5
	7	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	99,52	4/828	100
	8	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC0100005 3	99,52	4/828	100
	9	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH0100003 3	99,52	4/828	100
	10	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	99,52	4/828	100
	Ref	268-3	-	-	-	-
<i>Providencia</i>	1	<i>Providencia vermicola</i> OP1T (T)	AM040495	99,66	3/884	100
	2	<i>Providencia rettgeri</i> DSM 4542 (T)	AM040492	99,43	5/884	100
	3	<i>Providencia huaxiensis</i> WCHPr000369 (T)	CP031123	99,43	5/884	100
	4	<i>Providencia manganoxydans</i> LLDRA6 (T)	MH644827	99,10	8/884	100

(continuação)						
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Completo ^E %
<i>Providencia</i>	5	<i>Providencia alcalifaciens</i> DSM 30120 (T)	ABXW01000071	98,98	9/884	100
	6	<i>Providencia stuartii</i> DSM 4539 (T)	AM040491	98,98	9/884	99,3
	7	<i>Providencia rustigianii</i> DSM 4541 (T)	AM040489	98,87	10/884	100
	8	<i>Providencia sneebia</i> DSM 19967 (T)	AKKN01000006	98,76	11/884	100
	9	<i>Providencia burhodogranariea</i> DSM 19968 (T)	AKKL01000058	98,64	12/884	100
	10	<i>Providencia heimbachae</i> ATCC 35613 (T)	LXEW01000058	98,42	14/884	100
	Ref	321b-1	-	-	-	-
<i>Bacillus</i>	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	97,92	14/673	100
	2	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	97,92	14/673	100
	3	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	97,92	14/673	100
	4	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	97,92	14/673	100
	5	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	97,92	14/673	100
	6	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	97,92	14/673	100
	7	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF01000036	97,92	14/673	100
	8	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	97,92	14/673	100
	9	<i>Bacillus fungorum</i>	MG601116	97,92	14/673	100
	10	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	97,92	14/673	100

(continuação)

Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Comple ^E %
<i>Bacillus</i>	Ref	739a''-1	-	-	-	-
	1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (T)	AE016877	97,79	21/949	100
	2	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2 (T)	MAOE01000087	97,79	21/949	100
	3	<i>Bacillus luti</i> TD41 (T)	MACI01000041	97,79	21/949	100
	4	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1 (T)	MACF01000036	97,79	21/949	100
	5	<i>Bacillus sanguinis</i> BML-BC004 (T)	MW674727	97,79	21/949	100
	6	<i>Bacillus paramobilis</i> BML-BC017 (T)	MW674728	97,79	21/949	98,5
	7	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 (T)	CP006863	97,68	22/949	100
	8	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 (T)	LOBC01000053	97,68	22/949	100
	9	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42 (T)	MACH01000033	97,68	22/949	100
10	<i>Bacillus pacificus</i> MCCC 1A06182 (T)	KJ812450	97,68	22/949	100	
<i>Paenibacillus</i>	Ref	742d'-2	-	-	-	-
	1	<i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757 (T)	EU179327	98,75	15/1199	100
	2	<i>Paenibacillus xylanivorans A59</i>	KT461879	98,42	19/1200	100
	3	<i>Paenibacillus tundrae</i> Ab10b (T)	EU558284	97,83	26/1200	100
	4	<i>Paenibacillus pabuli</i> NBRC 13638 (T)	BCNM01000057	97,75	27/1200	100
5	<i>Paenibacillus dongdonensis</i> KUDC0114 (T)	KF425513	97,72	27/1182	92,9	

						(conclusão)
Gênero	Rank ^A	Espécie	Genbank ^B	Simil ^C %	Dif. /total ^D	Completo ^E %
<i>Paenibacillus</i>	6	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NBRC 15957 (T)	BIMJ01000009	97,42	31/1200	100
	7	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> XIL14(T)	AY427832	97,17	34/1200	100
	8	<i>Paenibacillus panacihumi</i> (T)	KY694399	96,67	40/1200	99,1
	9	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> B22a (T)	EU558281	96,50	42/1200	100
	10	<i>Paenibacillus cucumis</i> AP-115 (T)	KU201962	96,49	42/1198	98,8
	Ref	54a-2	-	-	-	-
<i>Paenibacillus</i>	1	<i>Paenibacillus taichungensis</i> BCRC 17757 (T)	EU179327	96,14	41/1063	100
	2	<i>Paenibacillus xylanivorans</i> A59	KT461879	95,95	43/1063	100
	3	<i>Paenibacillus pabuli</i> NBRC 13638 (T)	BCNM0100005 7	95,58	47/1063	100
	4	<i>Paenibacillus dongdonensis</i> KUDC0114 (T)	KF425513	95,33	49/1049	92,9
	5	<i>Paenibacillus tundrae</i> Ab10b (T)	EU558284	95,30	50/1063	100
	6	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> 15957 (T)	BIMJ01000009	94,83	55/1063	100
	7	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> XIL14(T)	AY427832	94,64	57/1063	100
	8	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> B22a (T)	EU558281	94,17	62/1063	100
	9	<i>Paenibacillus panacihumi</i>	KY694399	93,98	64/1063	99,1
	10	<i>Paenibacillus oceanisediminis</i> L10 (T)	JF811909	93,79	66/1063	100

Rank^A. Numeração da classificação de similaridade; **GenBank^B.** Número de acesso da sequência no Genbank; **Simil %^C.** Similaridade entre as sequências; **Dif./total^D.** o número de nucleotídeos diferentes em relação ao total; **Completo* %^E.** Cobertura da comparação realizada entre o isolado selecionado e a sequência do gene RNA ribossomal 16S de referência contido no banco de dados. Fonte: Elaboração própria.