

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

GIOVANNA LUIZA GOMES

Identificação do potencial inseticida de isolados bacterianos contra *Spodoptera frugiperda* (Je Smith) e *Diatraea saccharalis* (F.) e atividade fungistática.

Jaboticabal – SP
2º Semestre/2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Identificação do potencial inseticida de isolados bacterianos contra *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) e *Diatraea saccharalis* (F.) e atividade fungistática.

GIOVANNA LUIZA GOMES

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliana Gertrudes Macedo Lemos.

Coorientadores: Me. Luis A. C. Rojas, Me. Heytor L. Martins e Dra. Natália S. M. Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV, da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP

2^o Semestre/2024

G633i

Gomes, Giovanna Luiza

Identificação do potencial inseticida de isolados bacterianos contra *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) e *Diatraea saccharalis* (F.) e atividade fungistática. / Giovanna Luiza Gomes. -- Jaboticabal, 2024

35 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientador: Luis Angel Chicoma Rojas

1. Agentes biológicos. 2. Bactérias. 3. Pragas agrícolas. I. Título.

NOME COMPLETO DO AUTOR

Giovanna Luiza Gomes

TÍTULO DO TRABALHO ACADÊMICO:

Identificação do potencial inseticida de isolados bacterianos contra *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) e *Diatraea saccharalis* (F.) e atividade fungistática.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Controle biológico

Orientador: Prof^ª. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Coorientador: Me. Luis Angel Chicoma Rojas, Me. Heytor Lemos Martins e Dra. Natália Sarmanho Monteiro Lima

Data da defesa: 05/12/2024

(X) Aprovado

() Reprovado

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LUIS ANGEL CHICOMA ROJAS**
Data: 06/12/2024 09:11:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Luis Angel Chicoma Rojas
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **CINARA RAMOS SALES**
Data: 06/12/2024 09:36:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Cinara Ramos Sales
UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **GABRIELA CABRAL FERNANDES**
Data: 06/12/2024 09:51:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Gabriela Cabral Fernandes
Grupo São Martinho

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: ____/____/____

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Seção Técnica de Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal/SP - Brasil
Tel (16) 3209 7106 e-mail: graduacao.fcav@unesp.br - www.fcav.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus Jaboticabal



Documento assinado digitalmente

JAIRO OSVALDO CAZETTA

Data: 06/12/2024 11:22:29-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta
Chefe do Departamento



Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Seção Técnica de Graduação
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 Jaboticabal/SP - Brasil
Tel (16) 3209 7106 e-mail: graduacao.fcav@unesp.br - www.fcav.unesp.br

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, pela força concedida por Ele, por me guiar e iluminar durante todo o meu caminho.

A minha orientadora Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, expresso minha gratidão pela sua orientação, ensinamentos e oportunidade única de poder desenvolver meu trabalho em seu laboratório.

Aos meus coorientadores Me. Luis Angel Chicoma Rojas, Me. Heytor Lemos Martins e a Dra. Natália Sarmanho Monteiro Lima, profundamente grata pela sua orientação, suporte, disponibilidade e ensinamentos. Deixo minha admiração por todos e resalto a excelência profissional de todos. Sem vocês este trabalho não teria sido possível.

A minha mãe, Vanuza Silva Teixeira, por sempre acreditar em mim, aos meus irmãos, Gerson Ferreira De Souza Junior e Vinicius Miguel Gomes por todo o apoio, aos meus avós, Ivani Silva Teixeira e Lídio de Jesus Teixeira (in memoriam), e a toda minha família por fazerem parte da minha vida.

Agradeço aos meus amigos que me acompanharam durante toda a graduação, Ana Paula Farias, Cibelle Gregorio, Esther Kawano, Felipe Almeida, Gabriel Alexander, e em especial Veronica Maria De Souza e Vitoria Maria De Souza que além de amigas foram minhas colegas de laboratório, minha imensa gratidão. Desejo sucesso a todos.

Aos meus amigos do coração Beatriz Bombonato, Gabriel Brito, Gabriela Bailarini, Maria Julia Teixeira e Maycon Martins, dos quais sempre tive o maior prazer de compartilhar momentos, vocês tornam a minha vida melhor, obrigada pela amizade.

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal pela estrutura e apoio fornecidos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Uso de agroquímicos na agricultura	8
3.2. Controle biológico	10
3.3. Mecanismos de ação dos agentes de controle biológico	11
3.4. Microrganismos bacterianos com atividade inseticida	12
3.5. Microrganismos bacterianos com atividade fungistática	14
3.6. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. Local de desenvolvimento de estudo	15
4.2. Culturas bacterianas	16
4.3. Sobrenadante Livre de Células (SLC)	16
4.4 Análises filogenéticas	16
4.5 Bioensaio <i>Spodoptera frugiperda</i> (JE Smith)	16
4.6 Bioensaio <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794)	18
4.7 Ensaio de atividade antagônica de fungos	19
4.8 Ensaio de compostos voláteis	19
4.9 Análises estatísticas	20
5. RESULTADOS	21
5.1 Análise filogenética dos isolados bacterianos	21
5.2 Atividade inseticida dos isolados bacterianos contra <i>Spodoptera frugiperda</i> .	21
5.3 Atividade inseticida de isolados bacterianos contra <i>Diatraea saccharalis</i>	24
5.4 Atividade fungistática de isolados bacterianos	25
5.4.1 Atividade antagônica dos isolados	25
5.4.2 Efeito de COVs no crescimento micelial	27
6. DISCUSSÃO	29
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS	31

RESUMO

A agricultura é essencial para a sociedade, porém sofre com a ocorrência de pragas, afetando sua produtividade e ocasionando perdas econômicas significativas. A tática mais utilizada para contornar este problema é por meio de agrotóxicos, contudo o seu uso pode trazer impactos negativos a natureza, a saúde de animais e de seres humanos devido ao seu uso exacerbado. Com isto se torna necessário buscar alternativas viáveis para reduzir danos e perdas na agricultura. Em vista desse objetivo foi feita uma avaliação se os isolados possuem atividade inseticidas, realizou-se a confirmação do gênero por meio de sequenciamento do gene 16S rRNA. O potencial de mortalidade dos isolados foi avaliado por meio de bioensaios com larvas neonatas de ambas as espécies de pragas, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) e *Diatraea saccharalis* (F.). O isolado *Bacillus* sp. JBC 01 apresentou a maior taxa de mortalidade no teste com a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). Na avaliação do bioensaio com a *Diatraea saccharalis* (F.) observou-se que não houve mortalidade, porém, se evidenciou um efeito subletal em relação ao crescimento das larvas por parte do isolado *Bacillus* sp. JAB 01 em que a média dos pesos das larvas foi 17,78 mg, enquanto a média dos pesos do tratamento com LB foi 21,01 mg. No teste com os fungos avaliou-se que o isolado *Bacillus* sp. JAB 01 se destacou por inibir o crescimento de um maior número de fungos. Foi verificada a presença de compostos voláteis em todos os fungos que apresentaram atividade inibitória, o isolado *Bacillus* sp. JAB 01, também se destacou neste requisito. Diante dos resultados obtidos é necessário realizar testes de caracterização da fração ativa dos isolados bacterianos e determinação da molécula ativa por meio de análises cromatográficas, com o intuito de investigar sua possível utilização como controle biológico de pragas e fungos patogênicos. Este trabalho teve como objetivo identificar se os isolados bacterianos *Bacillus* sp. JBC 1, *Bacillus* sp. JAB 01, *Pseudomonas* sp. JBC 43 e *Klebsiella* sp. JBC 13 possuem potencial inseticida contra a ação dos insetos-praga *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) e *Diatraea saccharalis* (F.), capacidade de inibir o crescimento de fungos patogênicos, além da produção de compostos orgânicos voláteis (COVs).

Palavras-chave: controle biológico, bioinseticidas, isolados bacterianos, fungos patogênicos, insetos-praga.

ABSTRACT

Agriculture is essential for society, but it suffers from the occurrence of pests, affecting its productivity and causing significant economic losses. The most commonly used tactic to overcome this problem is through pesticides, however, their use can have negative impacts on nature and the health of animals and humans due to their excessive use. Therefore, it is necessary to seek viable alternatives to reduce damage and losses in agriculture. In view of this objective, an assessment was made as to whether the isolates have insecticidal activity, and the genus was confirmed by sequencing the 16Sr RNA gene. The mortality potential of the isolates was evaluated by means of bioassays with neonate larvae of both pest species, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) and *Diatraea saccharalis* (F.). The isolate *Bacillus* sp. JBC 01 showed the highest mortality rate in the test with *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). In the evaluation of the bioassay with *Diatraea saccharalis* (F.), it was observed that there was no mortality, however, a sublethal effect was evidenced in relation to the growth of the larvae by the isolate *Bacillus* sp. JAB 01 in which the average weight of the larvae was 17.78 mg, while the average weight of the treatment with LB was 21.01 mg. In the test with the fungi, it was evaluated that the isolate *Bacillus* sp. JAB 01 stood out for inhibiting the growth of a greater number of fungi. The presence of volatile compounds was verified in all fungi that presented inhibitory activity, the isolate *Bacillus* sp. JAB 01, also stood out in this requirement. In view of the results obtained, it is necessary to perform tests to characterize the active fraction of the bacterial isolates and determine the active molecule by means of chromatographic analysis, in order to investigate its possible use as biological control of pests and pathogenic fungi. This work aimed to identify whether the bacterial isolates *Bacillus* sp. JBC 1, *Bacillus* sp. JAB 01, *Pseudomonas* sp. JBC 43 and *Klebsiella* sp. JBC 13 have insecticidal potential against the action of insect pests *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) and *Diatraea saccharalis* (F.), the ability to inhibit the growth of pathogenic fungi, in addition to the production of volatile organic compounds (VOCs).

Keywords: biological control, bioinsecticides, bacterial isolates, pathogenic fungi, insect pests.

1. INTRODUÇÃO

O setor agrícola desempenha um papel indispensável para a sobrevivência humana, fornecendo recursos alimentares essenciais para a população mundial (Haque; Fan; Lee, 2023), a economia de grande parte dos países em desenvolvimento é sustentada por esse segmento, tendo cerca de 70% a 75% de suas populações direta ou indiretamente dependentes dela para suprir suas necessidades vitais (Chandra, 2023). Produtos como soja, açúcar, café, laranja, aves, carne bovina e etanol são principalmente produzidos e exportados pelo Brasil (Martinelli et al., 2010). As exportações brasileiras provenientes do agronegócio, chegaram ao valor de US\$166,55 bilhões, tornando o agronegócio responsável por 49% da pauta exportadora total brasileira em 2023 (MAPA, 2024).

O incessante crescimento da população mundial, previsões indicam que este número alcance a 9,8 bilhões de pessoas até 2050 e 11,2 bilhões até 2100. Esse implica um crescimento exponencial no consumo de recursos naturais globais (Nações Unidas, 2022). Recursos como alimentos e energia apresentam uma constante intensificação de demanda (Haque; Fan; Lee, 2023). Sendo assim, a necessidade aumentar a capacidade de produção de culturas aumenta em um contexto mundial (Tomar et al., 2024). Doenças e pragas de insetos causam cerca de 20–40% de perdas na produção todos os anos. De acordo com Tomar et al. (2024) há mais de 30.000 ervas daninhas, 10.000 espécies de insetos, 1.000 espécies de nematóides e mais de 100.000 doenças causadas por microrganismos impactando de forma crítica a agricultura (Tomar et al., 2024).

Como uma forma de minimizar as perdas excessivas nas colheitas são utilizados pesticidas sintéticos, porém seu uso prolongado e inadequado ocasionou o desenvolvimento de resistência entre esses organismos considerados como pragas. Além de causarem danos irremediáveis ao meio ambiente, à biodiversidade, causando desequilíbrios ecológicos, poluição ambiental, ameaças à saúde, microrganismos considerados benéficos estão sendo cada vez mais afetados. Estes produtos apresentam como características marcantes a alta toxicidade e a não biodegradabilidade. Fazendo-se necessário repensar nos métodos de controle sustentado de pragas, doenças e plantas daninhas (Chaudhary et al., 2024).

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith), é uma praga agrícola mais importante e devastando culturas pelo mundo. É um inseto nativo de regiões tropicais e subtropicais das Américas e com hábitos noturnos. Enquanto larva esta praga é um mastigador

de tecido vegetal alimentando-se de folhas e principalmente brotos tenros (Paredes-Sánchez et al., 2021). Se dispersa facilmente devido a sua eficiente capacidade de adaptação, sua preferência por alimentos consiste em uma variedade de plantas hospedeiras (Paredes-Sánchez et al., 2021). Junto a ela, a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (F.), também é uma das principais pragas da cana-de-açúcar e pode matar plantas ainda em estágios iniciais, e impactando negativamente a produtividade em plantas mais velhas devido ao hábito de cavar túneis dentro de seus colmos (De Souza et al., 2022).

Os patógenos que afetam plantações podem incluir fungos, bactérias, vírus e protistas. Mais comumente encontramos fungos colonizando plantas e provocando doenças por meio de diversos mecanismos (Arya Kaniyassery et al., 2024). As perdas de produtividade geradas por contaminação de fungos chegam a 10–15% das safras anuais, resultando em prejuízos econômicos de bilhões (Chatterjee et al., 2016).

Uma forma ecologicamente mais correta e financeiramente mais viável de conter a ação de pragas agrícolas é por meio do uso de biopesticidas, se trata de agentes de controle de pragas advindos de produtos naturais ou microrganismos como bactérias, plantas, animais e alguns minerais. Possuem vantagens benéficas ao serem utilizados como alternativa aos de origem química, por controlarem as contaminações de patógenos sem que haja perda de qualidade do produto (Khursheed et al., 2022).

Dentre os microrganismos com maior ação citados por Chaudhary et al (2024) temos aqueles pertencentes às famílias de *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae* e *Micrococcaceae* destacando *Bacillus subtilis*.

Klebsiella spp é um gênero de bactéria isolada inicialmente de uma espécie de planta halófila, *Arthrocnemum indicum*, possui mecanismos que aumentam o conteúdo total de nitrogênio do hospedeiro e atua como uma rizobactéria promotora do crescimento da planta (PGPR) (Pandey et al., 2024), foi relatada por Sharma et al. (2019) efeitos de proteção contra fungos fitopatogênicos, como por espécies de *Aspergillus*.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos determinar os potenciais inseticidas dos isolados bacterianos de espécies de *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp* e *Klebsiella sp.*, além de

determinar o efeito fungistático sobre fungos patogênicos destes mesmos isolados. Com o intuito de encontrar novas alternativas promissoras de controle biológico para que o uso de agroquímicos seja reduzido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Uso de agroquímicos na agricultura

Agroquímicos são produtos químicos que possuem o potencial de otimizar a produtividade e crescimento das lavouras e por isso são amplamente utilizados na agricultura (Priya et al. 2023). Inseticidas, fungicidas, herbicidas e fertilizantes, bem como reguladores de crescimento, hormônios e suplementos nutricionais são classificados como agroquímicos (Priya et al. 2023). Entretanto, essas substâncias causam contaminações e seu uso inadequado interfere na qualidade da água, na saúde humana e na biodiversidade (Tang et al., 2021). O modo de ação e os efeitos ecológicos e na saúde humana das formulações variam de acordo com os grupos químicos presentes (Devi; Manjula; Bhavani, 2022). Quatro milhões e duzentas mil toneladas de pesticidas foram usadas no ano de 2019, a Alimentação e Agricultura Dados da Organização das Nações Unidas (FAO) indicaram que 53% correspondiam a herbicidas, fungicidas e bactericidas 23% e inseticidas 17% (Devi; Manjula; Bhavani, 2022). O consumo médio anual de inseticidas no período de 1990 a 2010 por 82 países foi de 342.000 toneladas, o de herbicidas de 75 países durante o mesmo intervalo foi de 566.000 toneladas, 353.000 toneladas de fungicidas e bactericidas foram consumidas anualmente em 77 países (Devi; Manjula; Bhavani, 2022). Os maiores produtores e consumidores de pesticidas agrícolas do mundo são os Estados Unidos, a UE, o Brasil e a China (Devi; Manjula; Bhavani, 2022).

Os impactos negativos no meio ambiente ocasionados pelo uso de agroquímicos já são bem descritos e associados a persistência e a propensão de bioacumulação desses produtos (Devi; Manjula; Bhavani, 2022). Além disso, 20% dos países já relataram inúmeros incidentes que resultaram na poluição ambiental ao fazer uso de pesticidas na agricultura (Devi; Manjula; Bhavani, 2022). Insetos que não são caracterizados como pragas acabam sendo afetados pela ação de agroquímicos, agravando a perda de biodiversidade e funcionalidade do ecossistema (Devi; Manjula; Bhavani, 2022).

O solo também é afetado com o uso de agroquímicos, rizobactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias solubilizadoras de fósforo, considerados microrganismos benéficos são acometidos devido a interferência nas interações moleculares essenciais para a biotransformação de nutrientes no solo (Devi; Manjula; Bhavani, 2022; Lu et al., 2020). A associação simbiótica de micróbios do solo com plantas, que promove a fixação e solubilização de nutrientes, é alterada por inseticidas compostos por monocrotofós, lindano, diclorvos, endosulfan, malathion e clorpirifós, e a maioria dos fungicidas e herbicidas à base de cobre, como triazinas, alacloro, atrazina, paraquate e glifosato (Devi; Manjula; Bhavani, 2022).

Um fator preocupante é a disseminação dos agroquímicos no ambiente, é estimado que apenas 0,1% da totalidade de pesticidas aplicados atinja o seu alvo, pragas ou erva daninha. Por meio da deriva de pulverização, deposição fora do alvo e escoamento o restante é disperso no ecossistema (Devi; Manjula; Bhavani, 2022). Esses produtos se degradam e novos compostos são produzidos, tornando as regiões tropicais mais propensas à contaminação devido ao efeito de volatilização, isto é, altas temperaturas aumentam as chances de serem sujeitas à dispersão atmosférica (Huddellet al., 2020; Rochelle-Newall et al., 2015). A lixiviação causa a poluição de corpos d'água por causa da solubilidade do material, ameaçando a biodiversidade aquática (Capolupo et al., 2020). No trabalho de Devi; Manjula; Bhavani (2022) é descrito que amostras de água e peixes advindas de riachos nos Estados Unidos indicaram contaminação por resíduos de pesticidas em 90%, resquícios de herbicidas também foram encontrados em pântanos no Canadá.

A saúde humana é colocada em risco quando ocorre exposição a agroquímicos, seja ela diretamente ou indiretamente como a presença de resíduos nos alimentos e no meio ambiente (Devi; Manjula; Bhavani, 2022).

A exposição aos agroquímicos por meio do contato cutâneo, ingestão ou inalação, são vias de entrada de grande importância e os efeitos fisiológicos podem ser prejudiciais à saúde, como enfermidade dermatológicas, gastrointestinais, neurológicas, cancerígenas, respiratórias, reprodutivas e endócrinas (Fucic et al., 2021; Zúñiga-Venegas et al., 2022). O crescente uso de pesticidas químicos na agricultura influenciou aumento de casos de envenenamento, porém os sintomas e a gravidade do dano causado variam, podendo ser em um período curto, horas ou dias, após a exposição ou um período mais prolongado (Fucic et al., 2021; Zúñiga-Venegas et al., 2022).

3.2. Controle biológico

O controle biológico pode ser definido pelo uso de organismos vivos, ou seja, animais vertebrados ou invertebrados, plantas, microrganismos e vírus para contenção de populações de pragas, ervas daninhas ou organismos causadores de doenças (Haq et al. 2024). Seus benefícios incluem a inibição de fitopatógenos e a promoção de crescimento vegetal (Haq et al., 2024)

Os métodos de biocontrole consistem em três segmentos: clássico, conservacionista e aumentativo. O segmento "clássica" introduz agentes de biocontrole exóticos para que pragas específicas sejam predadas por eles. O biocontrole conservacional prioriza o aprimoramento de agentes biológicos nativos, já o “aumentativo” concentra-se em usar inimigos naturais nativos para reduzir pragas (Haq et al., 2024).

Bactérias são agentes de biocontrole vastamente utilizados por ser uma excelente alternativa para o controle de fitopatógenos, não deixando rastros tóxicos para o solo, água e permitindo a plena funcionalidade da fauna e flora (Haq et al., 2024). Além da sua alta especificidade, garantindo a atuação satisfatória sobre os alvos em questão, desse modo outros organismos, muitas vezes considerados benéficos, como polinizadores, que estão ao redor de plantações não são atingidas (Haq et al., 2024). O seu custo-benefício é um fator essencial para o mercado pois ao se estabelecer no campo seu efeito pode perdurar por um longo período, juntamente com a aplicação desses agentes esta prática pode ser integrada com outros métodos de combate a pragas, aumentando sua eficácia (Haq et al., 2024).

A procura por soluções que envolvam agentes de biocontrole no mercado tem crescido continuamente, em razão da maior disseminação dos danos que pesticidas sintéticos podem causar a biodiversidade e a saúde humana, das regulamentações impostas e do desenvolvimento de novos produtos sustentáveis, eficazes e objetivos em relação a sua praga-alvo (Haq et al., 2024).

3.3. Mecanismos de ação dos agentes de controle biológico

A implementação do controle biológico pode ser por meio de diferentes mecanismos como da importação, conservação ou aumento de inimigos naturais, esses tratamentos são usados de formas isoladas ou combinadas, de forma integrada (Schaffner et al., 2024).

Espécies invasoras como artrópodes e ervas daninhas são amplamente controladas por meio da introdução de inimigos naturais exóticos especialistas para o manejo sustentável, como forma de controle biológico de importação, causando reduções drásticas no número de espécies invasoras (Schaffner et al., 2024). Como relatado no artigo Schaffner et al., (2024) 588 espécies de inseto-praga em 148 países diferentes foram controladas pela importação de inimigos naturais, 29% dos casos obtiveram sucesso, outro relato citado é do controle parcial ou completo de 66% por parte da implantação de artrópodes e fungos benéficos.

O controle biológico consiste na conservação e expansão de populações de inimigos naturais nativos (Schaffner et al., 2024). A diversificação de culturas e a manipulação de habitat, como a criação de infraestruturas ecológicas, faixas de flores, sebes ou barreiras de grama para a implementação deste método (Schaffner et al., 2024). O aumento da diversidade de inimigos naturais por meio de fornecimento de recompensas alimentares, hospedeiros de espécies alternativas, presas e abrigo em escalas de campo, fazenda ou paisagem agrícola corrobora para a resistência nos agroecossistemas (Schaffner et al., 2024). De maneira semelhante inseticidas selecionados são estrategicamente aplicados, favorecendo a persistência dos inimigos naturais e consequentemente diminuindo a ocorrência de surtos (Schaffner et al., 2024).

Com a liberação por inundação ou inoculação de agentes de controle biológico desenvolvidos em laboratório caracteriza o controle biológico aumentativo, os seus ganhos podem ser rápidos ou dependente de estações (Schaffner et al., 2024).

O mecanismo de ação de pesticidas formulados por bactérias tem como alvo o sistema digestivo da praga, que é atingido pelas endotoxinas produzidas.

De acordo com o que é relatado em Chaudhary et al. (2024) os agentes bacterianos de controle biológico podem ser classificados como patógenos facultativos (*Pseudomonas aeruginosa*), patógenos obrigatórios (*Bacillus popilliae*), formadores de esporos cristalíferos (*Bacillus thuringiensis*) e patógenos potenciais (*Serratia marcescens*). As que possuem um maior número de aplicações são os formadores de esporos, essa classe é amplamente conhecida pela sua eficácia, segurança e altamente específica, sendo aplicada em diversos campos da sociedade como medicina, agricultura e silvicultura. O mais conhecido se trata da *B. thuringiensis* (Bt), ela age produzindo durante a sua esporulação, cristais parasporais, estes cristais consistem em proteínas inseticidas (toxinas Cry e Cyt) ou δ -endotoxinas (Chaudhary et al., 2024).

3.4. Microrganismos bacterianos com atividade inseticida

A *S. frugiperda* é uma praga caracterizada por seus hábitos migratórios e polífaga que corroboram para a capacidade de atingir mais de 80 culturas agrícolas distintas, ocasionando perdas econômicas severas (Bakry; Abdel-Baky, 2024). Sua ação mais notória é no cultivo do milho, conforme relatado por Van den Berg et al. (2021) foram reportados na África do Sul perdas variando de 26,5% a 56,8%. Já Day et al. (2017) e Rwomushana et al. (2018) demonstraram que as perdas entre 22% e 67% em colheitas de milho em países como Gana e Zâmbia geraram milhões de dólares em prejuízos econômicos.

A carência de métodos de controle da *S. frugiperda* pode reduzir cerca de 21% a 53% da produção global do milho anualmente (Bakry; Abdel-Baky, 2024).

A *D. saccharalis* representa um grande risco para a eficiência produtiva da cana-de-açúcar, sendo considerada a principal praga dessa cultura, em casos de infestação de 1% dos entrenós por parte desse inseto-praga é estimado que ocorra uma perda de rendimento de açúcar em valores que variam entre 0,5% e 1,1% (De Mello et al., 2020).

O gênero bacteriano *Bacillus*, é composto por cerca de 423 espécies, são gram-positivas, possuem formato de bastonete, formam esporos e catalase positivas pertencentes ao filo Firmicutes (Prasad et al., 2023). São encontradas em quase toda a natureza disseminados no solo, na água, no ar, rizosfera, trato intestinal de humanos e animais (Prasad et al., 2023). A capacidade de formar endósporos permite que habitem ambientes de condições extremas como fontes termais e ambientes ácidos (Prasad et al., 2023). Uma das características de *Bacillus* sp. mais importante para a biotecnologia é a capacidade de produção de variados grupos de metabólitos secundários, tendo de 5 a 8% de seu genoma designado para a sua síntese (Prasad et al., 2023). Os membros desse gênero atuam como promotores de crescimento e agentes de biocontrole contra estresses biótico e abiótico, podem agir como biofertilizante e biopesticida, produzindo potenciais compostos antagonistas (Prasad et al., 2023).

B. thuringiensis é amplamente utilizado em formulações que visam o controle de pragas pois trazem uma alta especificidade, *B. thuringiensis* podem sintetizar até oito toxinas diferentes potencializando biocontrole de insetos-praga, reduzindo efeitos adversos para o ambiente a saúde humana (Daquila et al., 2019). *B. thuringiensis* e suas respectivas toxinas agem como biopesticidas para diversos insetos, como a broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*), os produtos que contêm *B. thuringiensis* tem como alvo principal o intestino médio, os

entomopatógenos levam à lise das células intestinais e a ruptura da parede intestinal, conteúdo intestinal se mistura com a hemolinfa, reduzindo o pH intestinal, dessa forma a bactéria é disseminada no organismo espalhando a infecção, levando o inseto à morte por septicemia e inanição (Daquila et al., 2019).

Segundo Daquila et al. (2019) tratamentos com *B. thuringiensis* sorovar Aizawai GC-91 reduziram gradualmente a mobilidade de larvas até que cessasse completamente. As larvas alteram sua cor de marrom para preto após a sua morte.

O gênero *Pseudomonas* são bactérias gram-negativas, adaptável a diversos habitats, sendo facilmente encontradas pelo mundo (Kupferschmied; Mauerhofer; Keel, 2013). Variam também seu modo de vida podendo se apresentar como saprófitas, patógenos de plantas ou patógenos humanos oportunistas, ou manter relações comensais com plantas, estes em grande parte são membros colonizadores de raízes do grupo, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas protegens* e *Pseudomonas chlororaphis* (Kupferschmied; Mauerhofer; Keel, 2013).

Foi observado que cepas características de *Pseudomonas* sp. podem infectar e matar insetos. Em Kupferschmied; Mauerhofer; Keel (2013) é dito que *Pseudomonas protegens* Pf-5 possui uma toxina de inseto ligada a atividade inseticida relacionada ao gene Fit (toxina inseticida de *P. fluorescens*). Este gene quando expressado em *Escherichia coli* induz a morte e melanização do verme do chifre do tabaco *Manduca sexta* e larvas da traça da cera maior *Galleria mellonella*.

De acordo com Ruffner et al. (2015) o gene Fit se mostrou eficiente no teste para *P. chlororaphis* PCL1391 contra *S. littoralis*. “A toxina do inseto Fit compartilha 73% de identidade com a toxina inseticida flexível Mcf1 e 67% com a Mcf2, ambas produzidas por *Photobacterium luminescens*, uma bactéria simbiote de nematóides entomopatogênicos” (Ruffner et al. 2015).

3.5. Microrganismos bacterianos com atividade fungistática

Bacillus sp. produz uma gama de bacteriocinas atividade antimicrobiana, como amisina, subtilina, amilo-lisina, amilociclina, turicina, subtilosina A e B, algumas podem ser utilizadas no biocontrole de patógenos vegetais. Os Lipopeptídeos cíclicos (CLPs), se trata de um

composto anfifílico composto de ácidos graxos ligados à cauda com um oligopeptídeo curto para formar uma estrutura de anel cíclico, são sintetizadas por diversos *Bacillus sp.*, sendo as surfactinas, iturinas e fengicinas os compostos mais importantes e são potentes agentes de biocontrole. Os CLPs interagem com a membrana celular de patógenos, desequilibrando o fluxo de íons transmembrana, por meio da criação de criando poros. *B. velezensis* foi capaz de produzir metabólitos secundários contra fitopatógenos, como lipopeptídeos e policetídeos, incluindo macrolactina, bacilibactina, surfactina, fengicina, difficidina, bacileno e bacilomicina (Prasad et al., 2023). *B. subtilis* possui o mecanismo de defesa da resistência sistêmica induzida (RSI) como forma de aumentar a imunidade da planta hospedeira contra a infecção microbiana, além de comprovado de efeito antagônico contra fitopatógenos fúngicos dentre eles *Penicillium digitum*, *Microsporum canis*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *A. niger* e *Rhizopus oryzae* (Prasad et al., 2023).

Segundo as informações contidas em Prasad et al. (2023) *B. subtilis* NCIB 3610 reduziu o crescimento de de 61% de *Botryodiplodia theobromae*, 58% *Macrophoma mangiferae* e 51% *Pestalotiopsis mangiferae*, *B. subtilis* exerceu efeitos antagônicos sobre *Fusarium avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *Alternaria spp.* e *Bipolaris spp.* Além desses resultados demonstrados, *B. subtilis* foi capaz de produzir surfactina e compostos voláteis eficientes contra *Fusarium*, *Alternaria*, *Saccharicola* e *Cochliobolus* (Prasad et al., 2023).

A produção de quitinase por parte da *B. subtilis* TD11 inibiu vários fitopatógenos fúngicos que continham quitina em sua parede celular como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Colletotrichum* (Prasad et al., 2023). *B. subtilis* (B1) e *B. tequilensis* (B2–B4) evidenciaram a produção de proteases e esse composto inibiu o crescimento de *Fusarium spp.* em quatro espécies (Prasad et al., 2023).

Antibiose é a forma mais potente das *Pseudomonas sp.* combater fitopatógenos transmitidos pelo solo (Kupferschmied; Maurhofer; Keel, 2013). Cepas deste gênero produzem metabólitos secundários contra fungos como Fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), pioluteorina, pirrolnitrina, cianeto de hidrogênio (HCN) e lipopeptídeos cíclicos capazes de combater doenças (Kupferschmied; Maurhofer; Keel, 2013).

Algumas linhagens de *Pseudomonas sp.* colonizadoras de raízes conseguem proteger plantas de importantes patógenos fúngicos e oomicetos que são transmitidos via solo, incluindo *Gaeumannomyces*, *Thielaviopsis*, *Rhizoctonia*, *Fusarium oxysporum* e *Pythium sp.* (Kupferschmied; Maurhofer; Keel, 2013).

Segundo os autores Kupferschmied; Maurhofer; Keel (2013) produtos que apresentam em sua composição *Pseudomonas sp.* benéficas para a planta podem apresentar potenciais fungicidas significativos como AtEze (*P. chlororaphis*) contra doenças de raiz *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* de vegetais e plantas ornamentais em estufas, BlightBan A506 (*P. fluorescens*) contra queimadura bacteriana observadas em maçã e pera, e Bio-Save 10 LP/11 LP (*Pseudomonas syringae*) no controle de doenças pós-colheita de frutas e batata. Tubérculos de batata são acometidos por doenças causadas por *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Streptomyces* e *Erwinia*, como forma de combate *Pseudomonas Proradix* foi aplicado na formulação de novos produtos (Kupferschmied; Maurhofer; Keel, 2013).

3.6. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Este trabalho pode ser alinhado com alguns objetivos de desenvolvimento sustentável propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU) como a ODS 2: Fome Zero e Agricultura Sustentável, por meio da proposta de inserir novas alternativas de agentes de controle biológico ecologicamente mais corretos no mercado, diminuindo perdas de produtividade agrícola. A ODS 12: Consumo e Produção Responsáveis, a substituição ou até mesmo a redução de agroquímicos indica práticas mais responsáveis e sustentáveis. A presença de agentes de biocontrole no ambiente possui menores níveis de toxicidade para a biodiversidade do planeta, principalmente a fauna e flora associadas aos sistemas agrícolas, ao compararmos com agroquímicos convencionais, este aspecto do trabalho contribui para o objetivo ODS 15: Vida Terrestre.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de desenvolvimento de estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, situado no Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental no campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo.

4.2. Culturas bacterianas

Os isolados bacterianos JBC 1, JBC 13, JBC 43 e JAB 01, armazenado no banco “Jaboticabal Biological Control” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) (UNESP-FCAV), e armazenados em freezer -80 °C em microtubos contendo 205 de glicerol. Os isolados foram cultivados em meio Luria-Bertani (LB) e incubados a 30°C e 150 rpm por 24 horas. Condições de cultura usadas para todas as análises. Os isolados bacterianos foram selecionados devido a características de promoção de crescimento relevantes apresentadas em estudos anteriores realizados por membros do LBMP.

4.3. Sobrenadante Livre de Células (SLC)

Após o cultivo dos microrganismos, com a densidade óptica igual a (DO 600nm), as culturas foram submetidas a duas centrifugações sequenciais (4°C, 40 min, 10.000 rpm) em tubos Falcon estéreis. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi filtrado com um filtro de politetrafluoretileno de 0,22 micrômetro. Uma alíquota de 100 ul foi retirada e inoculada em uma placa com meio LB sólido. Em seguida, incubada em estufa (Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO) a 30°C, para a verificação da eficácia da filtragem (Luis A. Ch. Rojas, 2024).

4.4 Análises filogenéticas

Os isolados bacterianos utilizados no estudo foram identificados utilizando a técnica molecular de sequenciamento do gene 16Sr RNA.

4.5 Bioensaio *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)

As posturas de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) foram fornecidas pelo Laboratório de Ecologia Aplicada – FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP e os bioensaios conduzidos com dieta artificial (Greene et al., 1976), em placas de poliestireno de 128 poços, (Cell Wells, Corning Glass Works), com aproximadamente 1 mL de dieta por poço. Sobre a superfície da dieta solidificada, foram adicionados 60 µL do cultivo bacteriano em cada poço da placa, que possui área de 2 cm², cada parcela foi constituída de 16 poços. Foram realizados 5 tratamentos, sendo

uma placa para cada tratamento, com os cultivos dos seguintes isolados bacterianos JBC 01, JBC 13, JBC 43 e JAB 01, o meio LB esterilizado foi usado como controle. Foram realizados dois bioensaios, o primeiro bioensaio continha os tratamentos JBC 01, JBC 13, JBC 43 e LB, e o segundo bioensaio foi submetido aos tratamentos com os isolados bacterianos JBC 01, JBC 43, JAB 01 e LB. Após a confecção dos tratamentos, aguardou-se até que o líquido adicionado estivesse completamente seco e em seguida uma larva neonata de *S. frugiperda* foi transferida para cada poço da placa e selada com adesivo. Posteriormente as bandejas foram transferidas para câmara climatizada com temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ e fotoperíodo de 12 horas de luz/12 horas de escuro. No decorrer de sete dias foram monitorados o desenvolvimento e a mortalidade das larvas ao final deste período.

Resumo gráfico

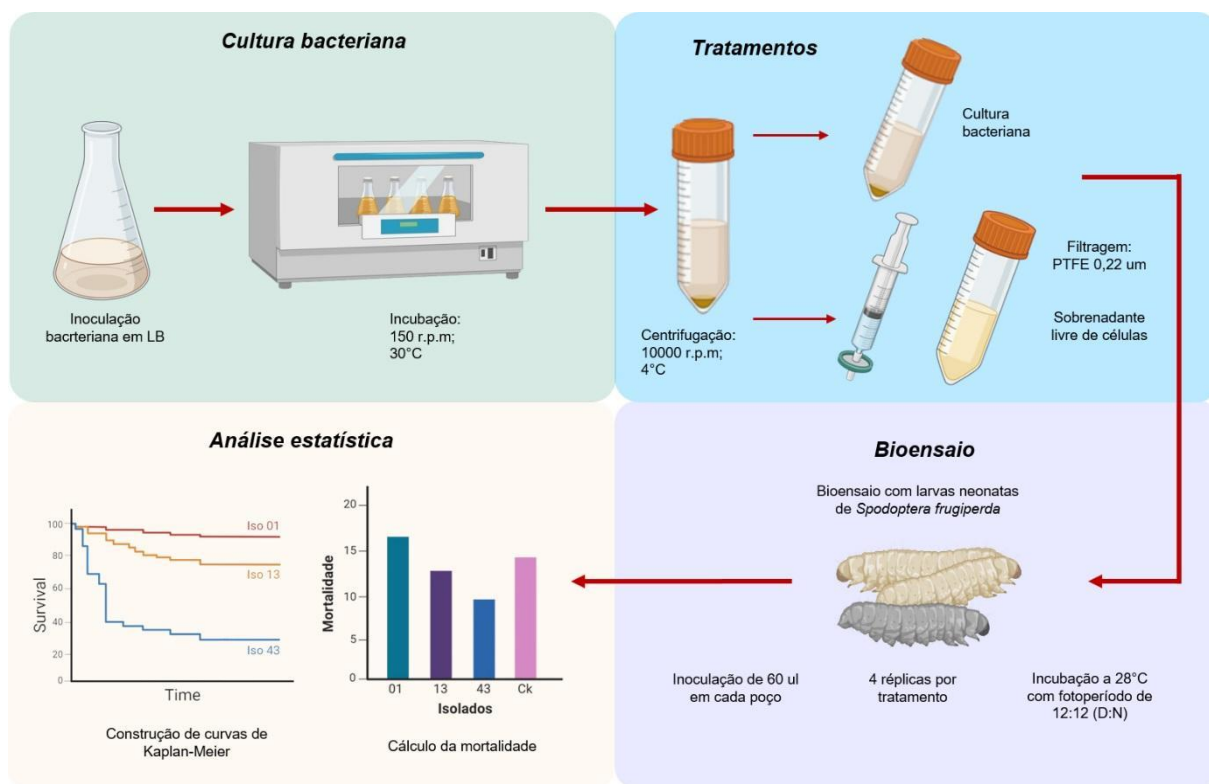


Imagem desenvolvida com BioRender.com

4.6 Bioensaio *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)

O teste foi realizado com posturas cedidas pela Usina São Martinho (Pradópolis-SP) com as dietas em tubos de ensaio com diâmetro aproximado de 2,5 cm. As larvas foram

mantidas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura), contendo dieta artificial (MACEDO et al., 1983), seguido de técnicas assépticas de criação de insetos descritas por Parra (1999), havia um total de 36 tubos que foram divididos em 4 tratamentos (LB controle, isolados JBC 1, JBC 43 e JAB 01) com 9 repetições em cada uma delas. Foi inoculado 180 µL de cada um dos cultivos bacterianos, sobre a dieta solidificada. Em cada tubo foram inoculadas cinco larvas, após o líquido adicionado estar completamente seco, os tubos foram tampados e colocados em uma estante. Em seguida foram levados para câmara climatizada com temperatura de 27 °C ± 2 e fotoperíodo de 14 horas de luz/10 horas de escuro. Decorrido sete dias foi verificada a mortalidade das larvas além disso, foi realizada a pesagem de cinco larvas de cada tratamento utilizando uma balança analítica.

Resumo gráfico

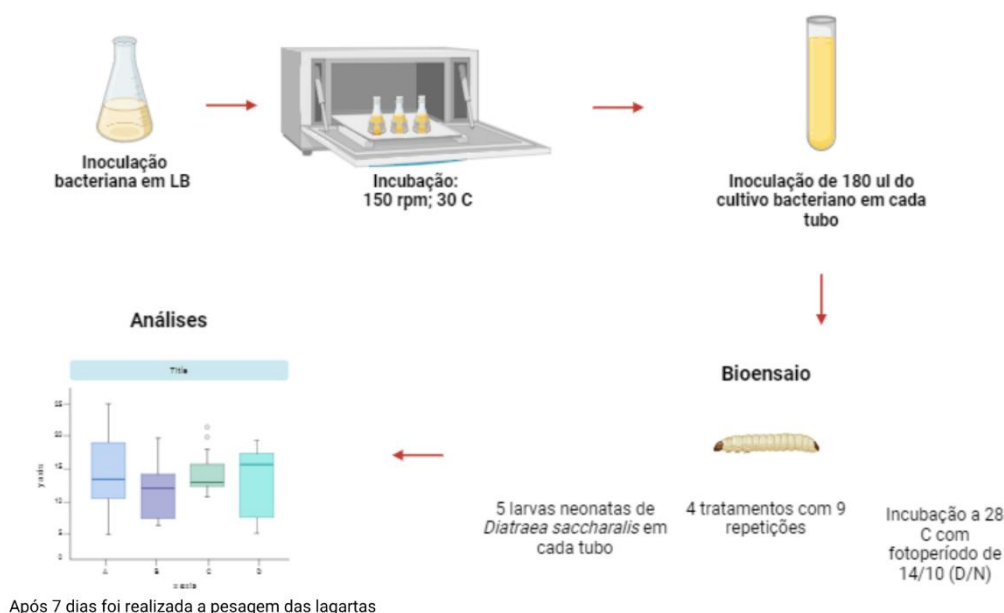


Imagem desenvolvida com BioRender.com

4.7 Ensaio de atividade antagônica de fungos

A atividade antagônica dos isolados bacterianos JBC 01, JAB 01 e JBC 43 contra fungos fitopatógenos selecionados foi testada. Um disco de ágar (aproximadamente 5 mm de diâmetro) de cultura fúngica (cultivados por 7 dias) foram colocados em um ponto extremo de placas de

Petri (9 cm de diâmetro) com meio de cultivo Agar de Batata Dextrose (BDA) e, em seguida, em ponto equidistante do disco fúngico, 10 µl dos cultivos bacterianos (JBC 01, JAB 01 e JBC 43) foram inoculados. Placas de Petri inoculadas apenas com os fungos fitopatógenos foram usadas como controle. As placas foram mantidas na incubadora (DBO) de 7 a 10 dias a $25 \pm 1^\circ$. O índice de crescimento micelial foi medido com o software Fiji.

4.8 Ensaio de compostos voláteis

A atividade de possíveis compostos voláteis foi testada apenas com os fungos e isolados que apresentaram atividade de inibição positiva. Foram utilizadas placas descartáveis com divisória, onde de um lado foi colocado meio LB sólido, e do outro colocado meio BDA sólido, com pH 7. No meio com BDA foi inoculado um disco de ágar (≈ 5 mm de diâmetro) de cultura fúngica (cultivados por 7 dias), no meio com LB foi inoculado 10 µL do cultivo do isolado bacteriano. As placas foram armazenadas na DBO a 28°C de 5-7 dias. O índice de crescimento micelial foi medido com o software Fiji.

Resumo gráfico

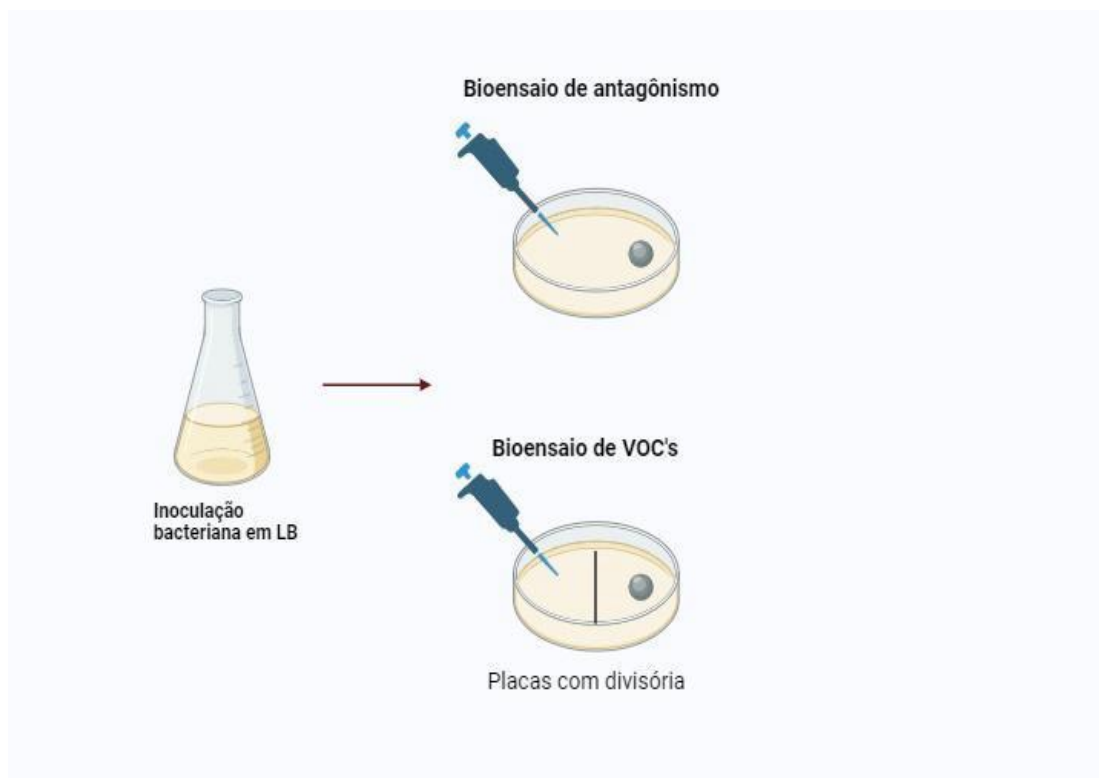


Imagem desenvolvida com BioRender.com

4.9 Análises estatísticas

A porcentagem de mortalidade do bioensaio com *S. frugiperda* e índice de crescimento micelial nos bioensaios de atividade antagônica e de crescimentos foram calculados e esses dados foram submetidos a um teste estatístico de Tukey, com uma significância igual a 95%. Os gráficos e demais análises estatísticas resultantes foram processadas pelo programa R Studio.

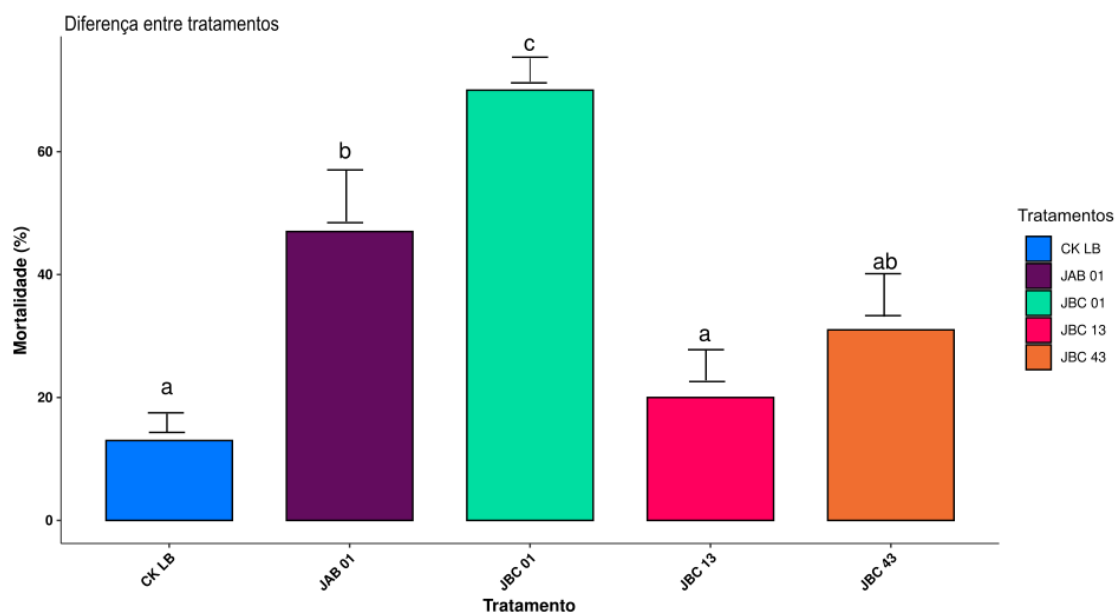
5. RESULTADOS

5.1 Análise filogenética dos isolados bacterianos

Após a identificação dos isolados bacterianos, foi encontrado que o isolado bacteriano JBC 01 e JAB 01 se trata de bactérias do gênero *Bacillus sp.*, o isolado bacteriano JBC 43 pertence ao gênero *Pseudomonas sp.* O isolado JBC 13 foi atribuído ao gênero *Klebsiella sp.* se tratando de uma espécie patogênica, portanto, seguindo as regras de biossegurança não prosseguimos os testes com este isolado.

5.2 Atividade inseticida dos isolados bacterianos contra *Spodoptera frugiperda*.

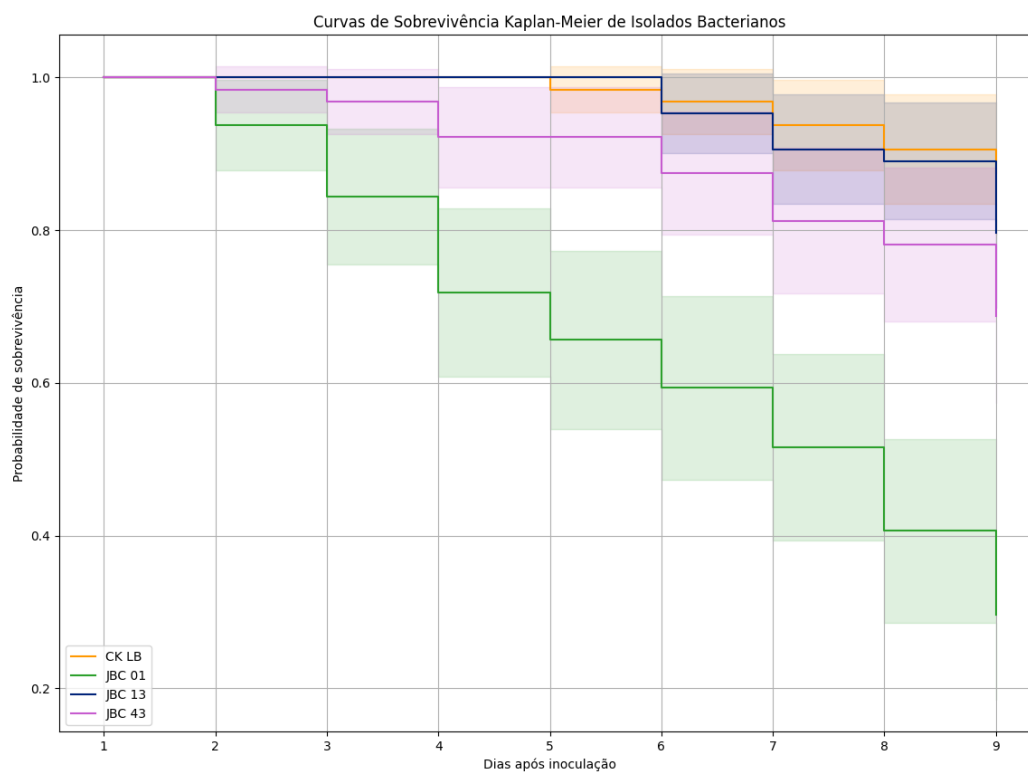
Dos cinco tratamentos realizados, os isolados bacterianos *Bacillus sp.* JBC 01 e *Bacillus sp.* JAB 01 apresentaram uma taxa de mortalidade total de 70% e 45%, respectivamente, enquanto os demais tratamentos registraram mortalidade igual ou inferior a 30% (Figura 1).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 1- Mortalidade relatada dos sete tratamentos de bioensaio de *S. frugiperda*.

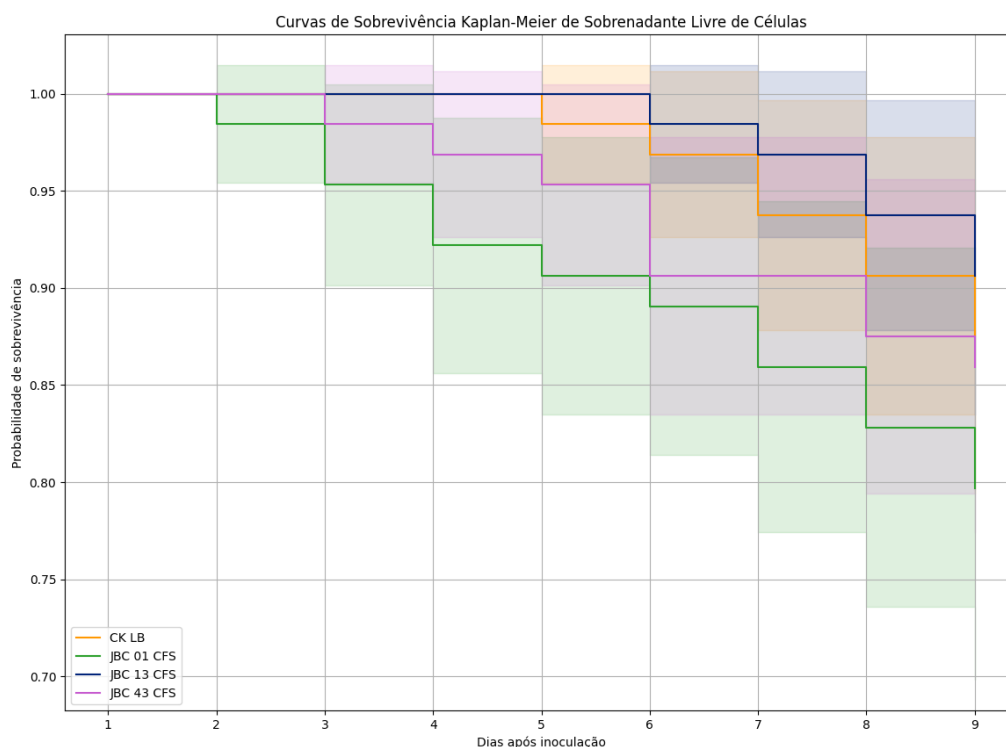
As curvas de Kaplan-Meier, avaliam a mortalidade diária ocasionada por cada tratamento, foram utilizadas com o intuito de determinar qual isolado contém o mecanismo de ação mais rápido, o efeito inseticida do *Bacillus sp.* JBC 01 foi precoce em comparação com os outros tratamentos, com registro de indivíduos mortos a partir do segundo dia do ensaio. Esse efeito foi mantido até o último dia do experimento, com uma probabilidade de sobrevivência de aproximadamente 30% (Figura 2).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 - Curva de sobrevivência Kaplan-Meier de isolados bacterianos

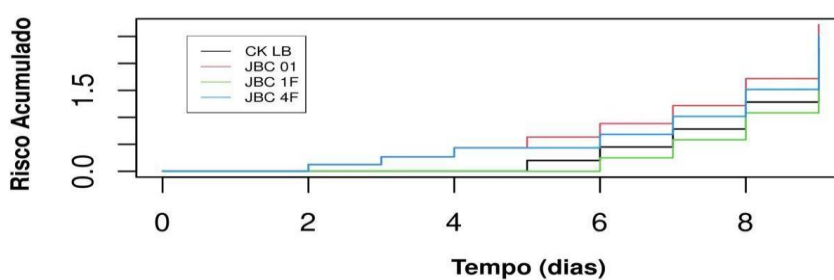
Efeito semelhante foi observado com o sobrenadante livre de células (SLC) do *Bacillus* sp. JBC 01, mas foi obtida uma probabilidade de sobrevivência de aproximadamente 80%, enquanto nos demais tratamentos a probabilidade foi superior a 85% (Figura 3).



Fonte: Elaboração própria.

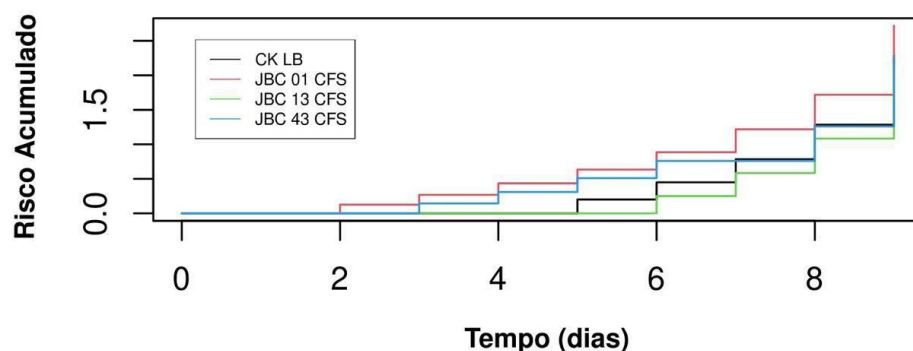
Figura 3 - Curva de sobrevivência Kaplan-Meier Sobrenadante livre de células.

As curvas obtidas pelo método estatístico de risco acumulado (Cumulative Hazard) indicaram que, nos tratamentos com os isolados bacterianos (Figura 4) e nos tratamentos com os sobrenadantes livre de células (Figura 5), o isolado *Bacillus sp.* JBC 01 destacou-se, apresentando a probabilidade acumulada de gerar mortalidade de lagartas.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Risco acumulado (Cumulative Hazard) dos isolados bacterianos



Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 - Risco acumulado (Cumulative Hazard) dos sobrenadantes livre de células.

5.3 Atividade inseticida de isolados bacterianos contra *Diatraea saccharalis*

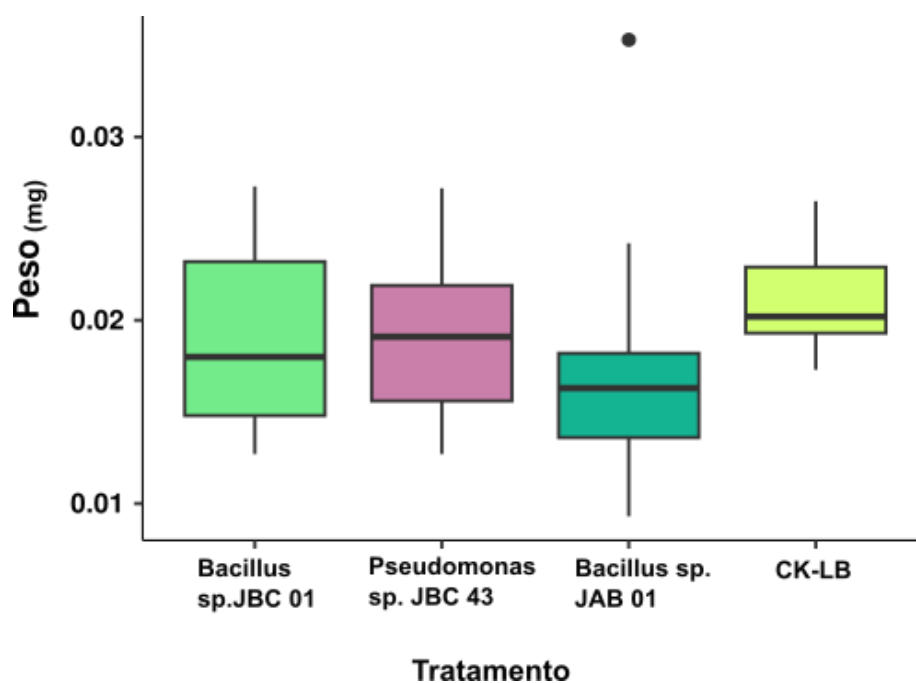
Os tratamentos em que os isolados bacterianos *Bacillus sp.* JBC 01, *Pseudomonas sp.* JBC 43 e *Bacillus sp.* JAB 01 foram inoculados não resultaram na mortalidade das larvas neonatas. Contudo, foi observado um efeito subletal sobre o seu crescimento. A média de peso do controle LB foi de 21,01 mg, dessa forma o tratamento com o isolado *Bacillus sp.* JAB 01 apresentou a maior taxa de redução de crescimento com uma média de peso igual a 17,78 mg, em seguida o tratamento *Bacillus sp.* JBC 01 com 19,16 mg e por fim o tratamento, *Pseudomonas sp.* JBC 43 obteve a menor média de taxa de redução de crescimento das larvas 19,36 mg (Tabela 1).

Tabela 1- Médias da redução de crescimento por tratamentos no bioensaio com *Diatraea saccharalis*.

Tratamentos	Massa dos indivíduos (mg)
LB	21,01
<i>Bacillus sp.</i> JBC 01	19,16
<i>Pseudomonas sp.</i> JBC 43	19,36

<i>Bacillus sp.</i> JAB 01	17,78
----------------------------	-------

O gráfico Boxplot (Figura 6) demonstra a distribuição dos pesos dos tratamentos realizados com *D. saccharalis*, se afere que o tratamento com o isolado *Bacillus sp.* JAB 01 possui o conjunto de dados mais homogêneos, isto é, os pesos das lagartas deste tratamento não apresentaram grande variação entre elas.



Fonte: Elaboração própria

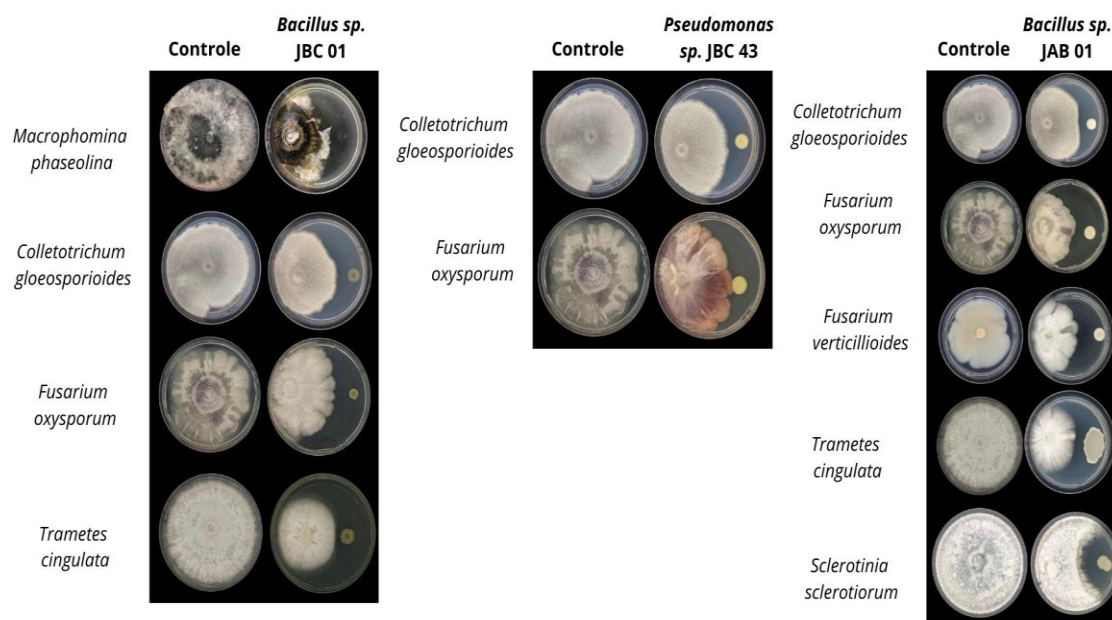
Figura 6 - Boxplot dos pesos de lagartas de *Diatraea saccharalis*.

5.4 Atividade fungistática de isolados bacterianos

5.4.1 Atividade antagônica dos isolados

A *Bacillus sp.* JBC 01 apresentou uma inibição do crescimento fúngico quando co-inoculada com *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* e *Trametes cingulata*. A *Pseudomonas sp.* JBC 43 inibiu o crescimento fúngico de *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium oxysporum*. A *Bacillus sp.* JAB 01 ao ser co-

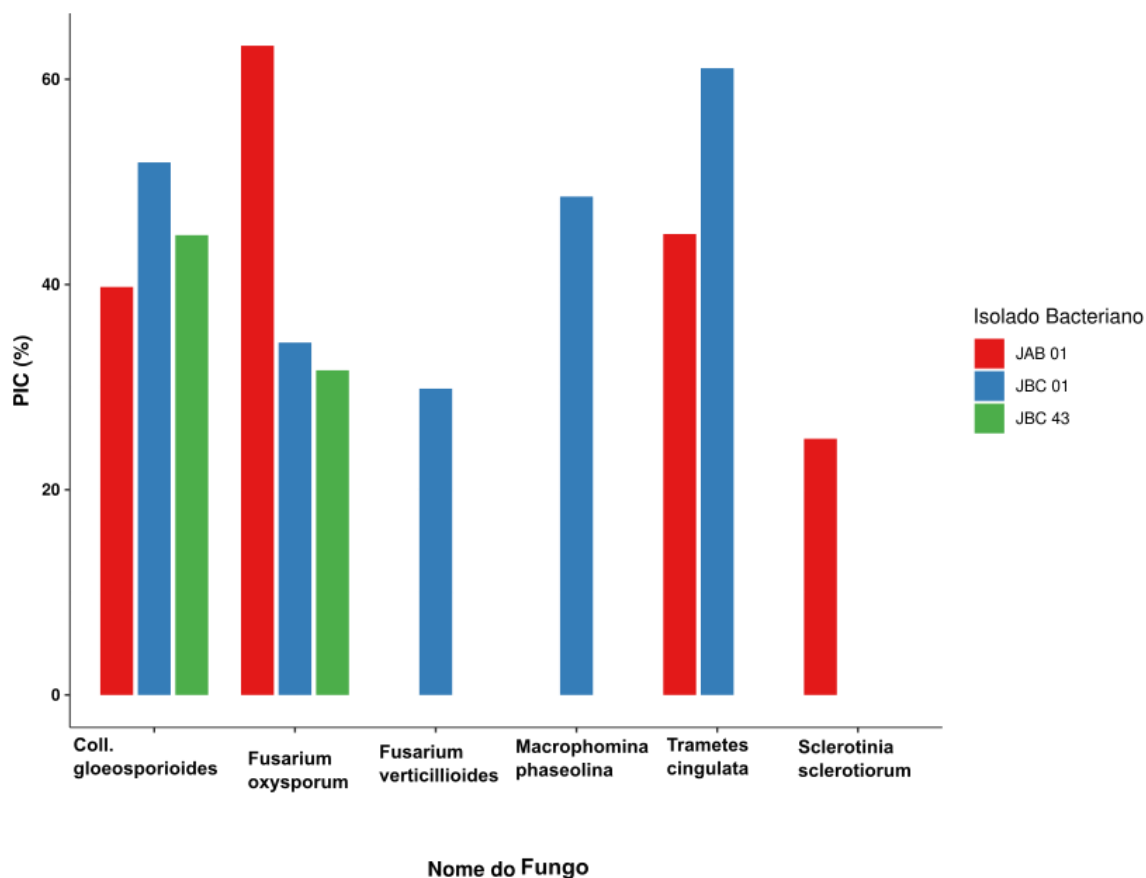
inoculada com *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Trametes cingulata* e *Sclerotinia sclerotiorum* inibiram o seu crescimento fúngico (Figura 6).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Bioensaio da atividade antagônica dos isolados bacterianos sobre fungos patogênicos de plantas.

Em relação a porcentagem de inibição crescimento micelial (ICM) o tratamento com o maior valor obtido foi 63% em *Fusarium oxysporum* com a *Bacillus sp.* JAB 01, 61% em *Trametes cingulata* com *Bacillus sp.* JBC 01, 51% em *Colletotrichum gloeosporioides* com *Bacillus sp.* JBC 01, 48% em *Macrophomina phaseolina* com *Bacillus sp.* JBC 01, 44,9% em *Trametes cingulata* com *Bacillus sp.* JAB 01, 44,8% em *Colletotrichum gloeosporioides* com a *Pseudomonas sp.* JBC 43, 39% em *Colletotrichum gloeosporioides* com *Bacillus sp.* JAB 01, 34% em *Fusarium oxysporum* com *Bacillus sp.* JBC 01, 31% em *Fusarium oxysporum* com *Pseudomonas sp.* JBC 43, 29% em *Fusarium oxysporum* com *Bacillus sp.* JAB 01 e 24% em *Sclerotinia sclerotiorum* com *Bacillus sp.* JAB 01 (Figura 7).

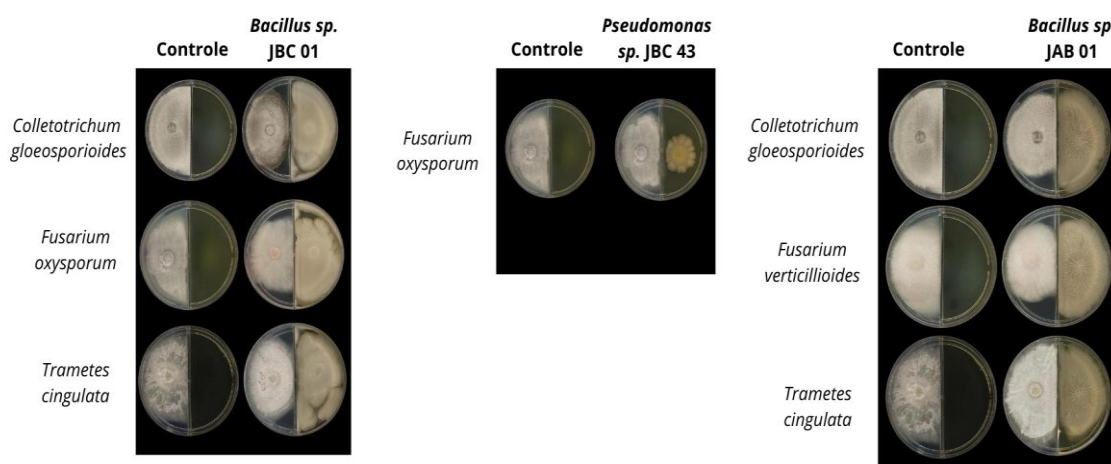


Fonte: Elaboração própria

Figura 7 - Porcentagem de inibição do crescimento micelial (ICM). Valores com letras iguais não diferem significativamente. As barras pretas representam o erro percentual.

5.4.2 Efeito de COVs no crescimento micelial

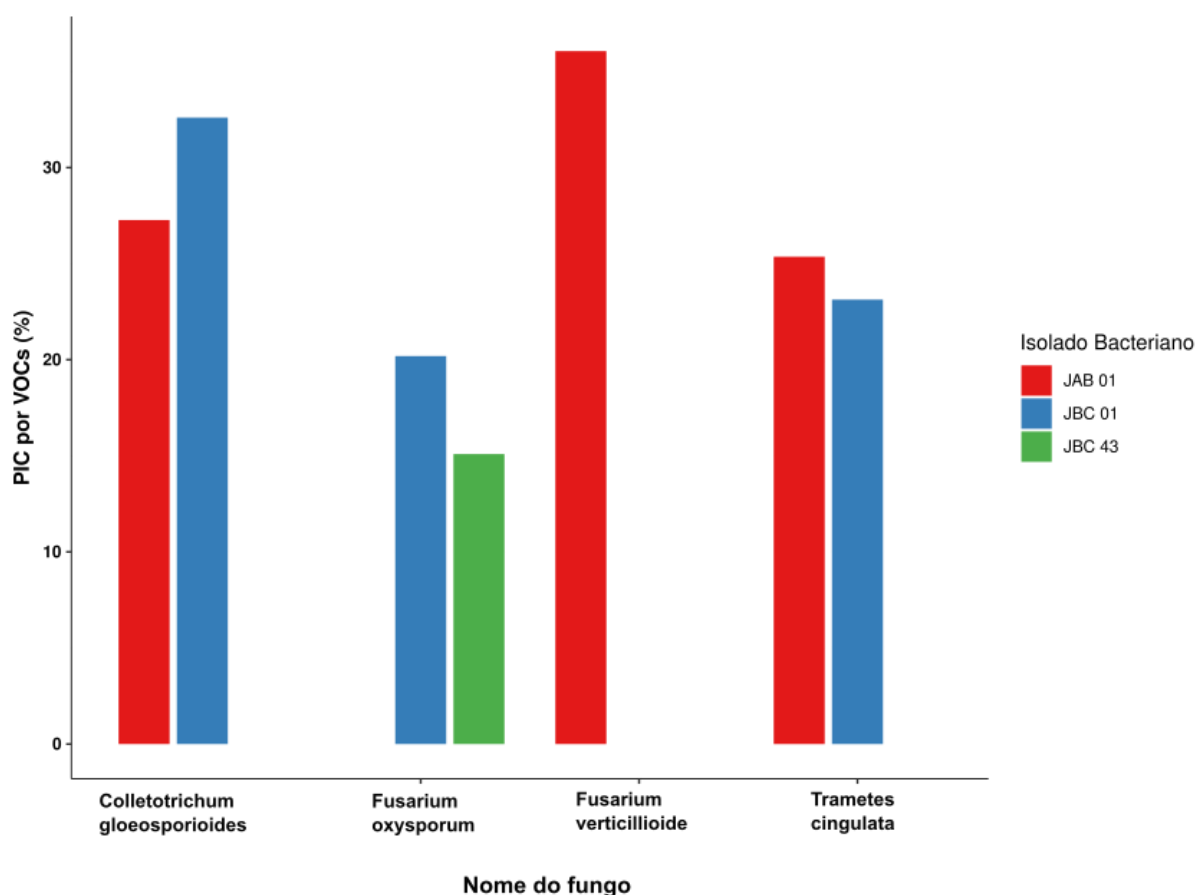
Foi avaliado se os isolados bacterianos *Bacillus sp.* JBC 01, *Pseudomonas sp.* JBC 43 e *Bacillus sp.* JAB 01 possui o mecanismo de produção de compostos orgânicos voláteis (COVs) como forma de controle biológico contra fungos patogênicos de plantas que apresentaram atividade positiva nos testes de fungos antagonistas (Figura 8).



Fonte: Elaboração própria

Figura 8- Efeito antifúngico de VOCs liberados pelos isolados bacterianos

A *Bacillus sp. JBC 01* inibiu o crescimento fúngico de *Colletotrichum gloeosporioides* em 32%, *Fusarium oxysporum* em 20% e *Trametes cingulata* em 23%. A *Pseudomonas sp. JBC 43* inibiu o crescimento micelar *Fusarium oxysporum* em 15%. E a *Bacillus sp. JAB 01* ao ser confrontado com os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum gloeosporioides* em 27%, *Fusarium verticillioides* em 36% e *Trametes cingulata* em 25% inibiu o seu crescimento micelial (Figura 9).



Fonte: Elaboração própria.

Figura 9 - Porcentagem de inibição do crescimento micelar (ICM). Valores com letras iguais não diferem significativamente. As barras pretas representam o erro percentual.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no bioensaio com as lagartas de *S. frugiperda* mostram melhor desempenho de controle com o *Bacillus sp.* JBC 01. Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Polanczyk; Silva; Fiuza (2000) onde as cepas *Bt. thuringiensis* 4412 e *Bt aizawai* HD 68 causaram 80,40% e 100% de mortalidade, respectivamente, foi sugerido que a toxicidade das cepas em questão está associada a composição de seus cristais, que pode influenciar no potencial tóxico, a cepa *Bt aizawai* HD 68 carrega os genes (*cryIA* (a), *cryID*) ligados à toxicidade, ao passo que *Bt. thuringiensis* 4412 tem apenas o gene (*cryIB*).

Os resultados relacionados a mortalidade entre os isolados bacterianos (*Bacillus* JBC 01, *Klebsiella* JBC 13 e *Pseudomonas* JBC 43) e seus respectivos sobrenadantes livre de células (SLC) indicam que a atividade inseticida está associada a células bacterianas e, em menor grau,

a seus respectivos sobrenadantes livres de células, sugerindo que a molécula ativa provavelmente é intracelular, porém é importante fazer teste de caracterização da fração ativa dos isolados bacterianos e determinação da molécula ativa por meio de análises cromatográficas.

Os tratamentos com os isolados bacterianos *Bacillus sp.* JBC 01, *Pseudomonas sp.* JBC 43 e *Bacillus sp.* JAB 01, que foram submetidos ao bioensaio com as lagartas de *D. saccharalis* (F) não resultaram em morte mas manifestaram efeitos subletais como a redução de massa das lagartas, sendo que o isolado *Bacillus sp.* JAB 01 se sobressaiu. Efeitos subletais como a redução de peso após a exposição larval de *Helicoverpa armigera* (Hübner 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) a azadiractina e *Bt thuringiensis* Berliner (Bacillales: Bacillaceae) foram relatados no estudo feito por Abedi et al. (2014).

No bioensaio de atividade antagônica de fungos, *Bacillus sp.* JAB 01 inibiu o crescimento fúngico de forma mais acentuada, semelhantes ao estudo conduzido por Bolívar-Anillo et al. (2021) em que duas cepas de *B. subtilis* de *Zea mays* inibiram (40%) do crescimento de *Botrytis cinerea* em condições in vitro e *B. subtilis* XZ 18-3 que possui um potencial para inibir o patógeno do trigo (*Rhizoctonia cerealis*) revestimento de sementes e/ou introdução direta da bactéria no solo de acordo com uma pesquisa de Yi et al. (2022).

Ao avaliarmos a capacidade de inibir o crescimento fúngico, novamente, o isolado que se destacou foi *Bacillus sp.* JAB 01, He et al. (2020) registraram em seu experimento que na placa inoculada com *B. methylotrophicus* BCN2 e *B. thuringiensis* BCN10 os COVs ao serem confrontados com cinco patógenos testados (*Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria sp.*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma atroviride*, *Colletotrichum gloeosporioides*) inibiram o crescimento de micelial de todos eles. A cepa BCN2 inibiu o crescimento de *C. gloeosporioides*, *Botryosphaeria sp.* e *F. oxysporum*. Enquanto, o BCN10 mostrou efeito inibitório contra *Botryosphaeria sp.*, *P. expansum*, *T. atroviride* e *C. gloeosporioides*.

7. CONCLUSÃO

Ao relacionar todos os resultados obtidos é possível concluir que nos testes realizados no atual trabalho o gênero *Bacillus sp.* (JBC 01 e JAB 01) se destacou em comparação com os demais isolados bacterianos, em especial o isolado *Bacillus sp.* JAB 01, pela sua atividade inseticida ou capacidade de inibição do crescimento micelial, isto permite classificar este

isolado bacteriano como uma promissora possível alternativa de recurso para o desenvolvimento de novos produtos de controle biológico, e incentivar a redução demasiada de agroquímicos por meio de alternativas sustentáveis que geram um impacto negativo menor para o ambiente como um todo.

Apesar dos isolados pertencentes a *Pseudomonas sp.* e *Klebsiella sp.* utilizados no presente estudo, não obteve resultados tão satisfatórios quanto o gênero *Bacillus sp.* estes gêneros possuem potenciais biotecnológicos promissores, porém demandam estudos aprofundados para elucidar seus mecanismos de ação e futuramente ampliar suas aplicações na ciência.

8. REFERÊNCIAS

ABEDI, Z. et al. Acute, sublethal, and combination effects of azadirachtin and *Bacillus thuringiensis* on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of insect science**, v. 14, p. 30, 2014.

AKHTAR, R.; DHARUMADURAI, D.; SENTHIL KUMAR, T. Novel antifungal compound from *Prunella vulgaris*: An in-silico approach towards the discovery of potent inhibitor to combat phytopathogenic fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 58, p.103187, jun. 2024.

ARYA KANIYASSERY et al. Leaf spot-associated pathogenic fungi alter photosynthetic, biochemical, and metabolic responses in eggplant during the early stages of infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 133, p. 102320–102320, 30 maio 2024.

BAKRY, M. M. S.; ABDEL-BAKY, N. F. Impact of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) infestation on maize growth characteristics and yield loss. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2024.

BENSIDHOUM, L. et al. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *European Journal of Soil Biology*, v. 75, p. 38–46, 1 jul. 2016.

CAPOLUPO, M. et al. Chemical composition and ecotoxicity of plastic and car tire rubber leachates to aquatic organisms. **Water research**, v. 169, n. 115270, p. 115270, 2020.

CHAUDHARY, R. et al. Microbial bio-control agents: A comprehensive analysis on sustainable pest management in agriculture. **Journal of agriculture and food research**, v.18, n. 101421, p. 101421, 2024.

DAQUILA, B. V. et al. Action of *Bacillus thuringiensis* (Bacillales: Bacillaceae) in the midgut of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 184, n. 109642, p. 109642, 2019.

DAY, R. et al. Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. **Outlooks on pest management**, v. 28, n. 5, p. 196–201, 2017.

DE MELLO, U. S. et al. An overview of the transcriptional responses of two tolerant and susceptible sugarcane cultivars to borer (*Diatraea saccharalis*) infestation. **Functional & integrative genomics**, v. 20, n. 6, p. 839–855, 2020.

DE SOUZA, J. M. et al. Predation of *Diatraea saccharalis* eggs and neonates by the earwig *Euborellia annulipes*. *Biological Control*, v. 172, p. 104953, set. 2022.

DEVI, P. I.; MANJULA, M.; BHAVANI, R. V. Agrochemicals, environment, and human health. **Annual review of environment and resources**, v. 47, n. 1, p. 399–421, 2022.

FUCIC, A. et al. Reproductive health risks associated with occupational and environmental exposure to pesticides. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 12, p. 6576, 2021.

GITAHY, P. DE M. et al. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 531–537, 1 set. 2007.

HAQ, I. U. et al. Eco-smart biocontrol strategies utilizing potent microbes for sustainable management of phytopathogenic diseases. **Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)**, v. 44, n. e00859, p. e00859, 2024.

HE, C.-N. et al. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 15, p. 3360, 2020.

HUDDELL, A. M. et al. Meta-analysis on the potential for increasing nitrogen losses from intensifying tropical agriculture. **Global change biology**, v. 26, n. 3, p. 1668–1680, 2020.

K.K. CHETAN et al. Plant, Bacteria and Fungi Crosstalk: Direct and Indirect Biocontrol Mechanisms of Sugarcane Rhizoplane *Pseudomonas* Species against Fusarium Wilt. *Rhizosphere*, v. 31, p. 100952–100952, 19 ago. 2024.

KAUSAR, A.; RASUL, F.; ASGHAR, N. How to get green with agricultural footprint: A global analysis of carbon emissions, environmental taxes, and agrochemical use. *Journal of Environmental Management*, v. 370, p. 122665–122665, 27 set. 2024.

KHURSHEED, A. et al. Plant based natural products as potential ecofriendly and safer biopesticides: A comprehensive overview of their advantages over conventional pesticides, limitations and regulatory aspects. **Microbial pathogenesis**, v. 173, n. Pt A, p. 105854, 2022.

LU, C. et al. Chlorpyrifos inhibits nitrogen fixation in rice-vegetated soil containing *Pseudomonas stutzeri* A1501. **Chemosphere**, v. 256, n. 127098, p. 127098, 2020.

MARTINELLI, L. A. et al. Agriculture in Brazil: impacts, costs, and opportunities for a sustainable future. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, v. 2, n. 5-6, p. 431–438, dez. 2010.

MONDÉJAR-LÓPEZ, M. et al. A review on the encapsulation of “eco-friendly” compounds in natural polymer-based nanoparticles as next generation nano-agrochemicals for sustainable agriculture and crop management. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 280, p. 136030, nov. 2024.

PANDEY, S. P. et al. A *Klebsiella* rhizobacterium deregulates the metabolism of phytopathogenic *Aspergillus flavus* during in-vitro assays and confers protective functions. **The Microbe**, v. 5, n. 100181, p. 100181, 2024.

PAREDES-SÁNCHEZ, F. A. et al. Advances in Control Strategies against *Spodoptera frugiperda*. A Review. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n.18, p. 5587, 2021.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P. DA; FIUZA, L. M. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (lepidoptera: noctuidae). **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, n. 3, p. 164–166, 2000.

PRASAD, B. et al. Biocontrol potential of *Bacillus* spp. for resilient and sustainable agricultural systems. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 128, n. 102173, p. 102173, 2023.

PRIYA, A. K. et al. Bio-based agricultural products: a sustainable alternative to agrochemicals for promoting a circular economy. *RSC Sustainability*, v. 1, n. 4, p. 746–762, 6 jul. 2023.

ROCHELLE-NEWALL, E. et al. A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 308, 2015.

SCHAFFNER, U. et al. Biological control for One Health. **The Science of the total environment**, v. 951, n. 175800, p. 175800, 2024.

SHARMA, S. et al. A halotolerant growth promoting rhizobacteria triggers induced systemic resistance in plants and defends against fungal infection. **Scientific reports**, v.9, n. 1, p. 4054, 2019.

VAN DEN BERG, J.; BRITZ, C.; DU PLESSIS, H. Maize yield response to chemical control of *Spodoptera frugiperda* at different plant growth stages in South Africa. **Agriculture**, v. 11, n. 9, p. 826, 2021.

ZÚÑIGA-VENEGAS, L. A. et al. Health effects of pesticide exposure in Latin American and the Caribbean populations: A scoping review. **Environmental health perspectives**, v. 130, n. 9, p.96002, 2022.