

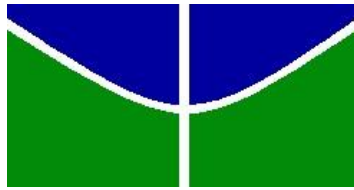
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR
DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e
Brevibacillus COM POTENCIAL ATIVIDADE ENTOMOCIDA,
FUNGICIDA E SOLUBILIZADORA DE FOSFATO**

GABRIELA TEODORO ROCHA

TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2022**



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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR
DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e
Brevibacillus COM POTENCIAL ATIVIDADE ENTOMOCIDA,
FUNGICIDA E SOLUBILIZADORA DE FOSFATO**

GABRIELA TEODORO ROCHA

ORIENTADORA: ROSE GOMES MONNERAT

PUBLICAÇÃO: TESE/2022

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2022**



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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR
DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e
Brevibacillus COM POTENCIAL ATIVIDADE ENTOMOCIDA,
FUNGICIDA E SOLUBILIZADORA DE FOSFATO**

GABRIELA TEODORO ROCHA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTORA EM AGRONOMIA.**

APROVADA POR:

**ROSE GOMES MONNERAT SOLÓN DE PONTES, Ph.D., Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia (Orientadora) / rose.monnerat@gmail.com**

**ALESSANDRA MONTEIRO DE PAULA, Ph.D, Faculdade de Agronomia e Medicina
Veterinária – Universidade de Brasília – FAV (Membro Interno) / alessandramp@unb.br**

**PAULO ROBERTO QUEIROZ, DR., Centro Universitário de Brasília – CEUB (Membro
Externo) / prqzqueiroz@gmail.com**

**ANTÔNIA DÉBORA CAMILA DE LIMA FERREIRA, Dra., Universidade Federal da
Paraíba (Membro Externo) / deboracamilla1@hotmail.com**

**BRASÍLIA/DF
OUTUBRO/2022**

FICHA CATOLÓGICA

Rocha, Gabriela Teodoro

Caracterização fenotípica, bioquímica e molecular de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* com potencial atividade entomocida, fungicida e solubilizadora de fosfato/ Gabriela Teodoro Rocha, orientação Rose Monnerat – Brasília, 2022.

403 p.: il.

Tese de Doutorado (D) – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2022.

1. Caracterização. 2. Identificação. 3. Sequenciamento Genético. 4. Real time – PCR. 5. Antibióticos. 6. Espectrometria de Massa – MALDI TOF MS. 7. Entomopatogenicidade. 8. Controle Biológico.

CDD ou CDU

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ROCHA, G. T. Caracterização fenotípica, bioquímica e molecular de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* com potencial atividade entomocida, fungicida e solubilizadora de fosfato. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 403 p. Tese de Doutorado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: GABRIELA TEODORO ROCHA

TÍTULO DA TESE: Caracterização fenotípica, bioquímica e molecular de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* com potencial atividade entomocida, fungicida e solubilizadora de fosfato.

GRAU: DOUTOR **ANO:** 2022

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

Nome: GABRIELA TEODORO ROCHA

CPF: 036.589.631-40

Endereço: QI 25 LOTE 12/14. BLOCO D. APTO 120, GUARÁ II, DF, BRASIL.

Tel. (64) 99224-7606 Email: gabriela_teodoro.rocha@yahoo.com.br

À minha família, Sônia, Marco Valério, Gustavo, Guilherme, Valdivino e Joana por todo amor e apoio.
Ao meu namorado Celso Henrique pelo companheirismo, carinho e apoio.
A todos os meus amigos pelo carinho e apoio.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus e Nossa Senhora por me concederem o dom da vida e por me guiarem e darem forças nessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Sônia Teodoro e Marco Valério por todo amor, carinho e apoio. Agradeço especialmente a minha mãe por sempre me acalantar nos momentos difíceis, por sempre acreditar em mim e por sempre me incentivar. Muito obrigada mãe, sem você nada disso seria possível!

Aos meus irmãos Gustavo e Guilherme pelo amor fraterno, apoio e carinho.

Aos meus avós Valdivino Teodoro e Joana Silvério por todo amor, incentivo e inspiração! Obrigada por todo o orgulho que vocês sentem por mim!

Ao meu namorado Celso Henrique pelo companheirismo, paciência, carinho e amor! Obrigada amor por tudo, por me consolar, alegrar e por cuidar de mim! Você foi parte fundamental nessa jornada!

Aos meus amigos Paulo Sérgio, Andréia, Kassia e Fernanda por todo apoio e carinho. Obrigada por escutarem todos os meus desabafos!

À minha orientadora Dra. Rose Monnerat por todos os conhecimentos transmitidos, por todo carinho, paciência e incentivo que teve comigo durante essa caminhada. Sou imensamente grata por ter sido sua orientanda! Você é uma fonte de inspiração!

Ao Dr. Paulo Roberto por todos os conhecimentos transmitidos, por me ensinar o que hoje é a minha verdadeira paixão, a biologia molecular. Agradeço também pelo apoio, pelas infinitas risadas no laboratório e pela amizade.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas, Letícia Helena, Sônia, Jéssica, Izabela, Camila, Sandro, Marcelo Berçot, Lillian, Lara, Amanda, Andréa, Letícia Costa, Letícia Oliveira, Anderson, Zezinho, Carol e Luana, obrigada por todo apoio, incentivo, conhecimento e amizade.

À Universidade de Brasília, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, professores e funcionários por permitirem que eu realiza-se esse sonho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e aos funcionários dessa instituição por todo suporte técnico e financeiro no desenvolvimento desse estudo.

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

E a todos que de alguma forma contribuíram para que esse sonho fosse realizado! Meu muito obrigada!

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* COM POTENCIAL ATIVIDADE ENTOMOCIDA, FUNGICIDA E SOLUBILIZADORA DE FOSFATO

RESUMO

A identificação correta de microrganismos destinados a produtos biológicos é de suma importância, uma vez que garante a qualidade do produto produzido. Assim, o uso de técnicas clássicas, como características morfológicas e bioquímicas, ou por métodos sofisticados, como sequenciamento genético NGS e/ou qPCR que auxiliam nesse processo. Desse modo, o objetivo geral desse trabalho foi identificar e caracterizar por métodos fenotípicos clássicos e genéticos, 37 estirpes candidatas a referência pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*, com potencial atividade entomocida, fungicida e solubilizadora de fósforo. Para a execução do trabalho, todas as estirpes foram retiradas da Coleção de Bactéria de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Assim, inicialmente foram sequenciadas 21 estirpes, os quais foram identificadas como *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. spizizenii*, *Priestia megaterium*, *P. aryabhatai*, *Lysinibacillus capsici* e *Brevibacillus laterosporus*, também foram detectados nos genomas das cepas, genes codificadores de metabólitos secundários. Foram desenvolvidos *primers* específicos para a identificação de 29 espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus*, em que 20 obtiveram bons resultados. Posteriormente os mesmos foram usados na identificação de 600 estirpes, como forma de validação do método. Desse modo, foram identificadas 458 estirpes, em que 80% foram de espécies pertencentes ao grupo *B. cereus*. A caracterização morfológica das 37 estirpes foi realizada seguindo os princípios de Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Por esse método, verificou-se que as cepas apresentaram características morfológicas e citomorfológicas heterogênicas. Na caracterização bioquímica por perfis de resistência à antimicrobianos, foram adotados os métodos de disco-difusão e diluição em ágar com diferentes tipos de antibióticos e concentrações. O teste de resistência a antimicrobianos indicou que 95% dos isolados foram resistentes a pelo menos um ou mais dos 23 antibióticos testados. Todas as cepas pertencentes ao grupo *B. cereus s.l* foram resistentes a antibióticos da classe dos β -lactâmicos. Também foi realizada a identificação das 37 cepas por espectrometria de massa – MALDI TOF, no entanto, apenas uma cepa foi 100% identificada em nível de gênero e espécie, *B. mycoides*, quando utilizado o banco de dados disponível no software MALDI-Biotyper®. O confronto de perfis com o banco de dados suplementar, alimentado pelos espectros das 37 estirpes, resultou na identificação de apenas 9 cepas. Foi avaliado o potencial entomocida das 37 cepas à insetos das ordens Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis includens*), Coleoptera (*Anthonomus grandis*), Diptera (*Aedes aegypti*) e Hemiptera (*Euschistus heros*), e ao nematoide *Caenorhabditis elegans*. Também foi avaliado a ação antagonista dessas cepas contra os fitopatógenos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum* e a solubilização de fósforo. Os resultados indicaram que houve uma diversidade de espécies patogênicas aos insetos da ordem Lepidoptera, incluindo *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens*, com taxa de mortalidade $\geq 80\%$. A espécie de *B. atrophaeus* foi patogênica ao nematoide *C. elegans* (85%). A espécie *Priestia aryabhatai* reduziu a sobrevivência de *E. heros* em 77%. E uma estirpe de *B. subtilis* (S2790) ocasionou 100% da mortalidade de *A. grandis*. Conclui-se que a caracterização fenotípica clássica aliada com a genética produz bons resultados, além disso esse estudo prospectou isolados com grande potencial para biocontrole e biofertilizantes destinados a agricultura sustentável.

Palavras-chaves: Identificação bacteriana, Sequenciamento Genético, qPCR, Antibióticos, MALDI TOF MS, Controle Biológico.

**PHENOTYPIC, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
BACTERIA OF THE GENRES *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* and *Brevibacillus*
WITH POTENTIAL ENTOMOCIDAL, FUNGICIDAL AND PHOSPHATE
SOLUBILIZING ACTIVITY**

ABSTRACT

The correct identification of microorganisms destined to biological products is of paramount importance, since it guarantees the quality of the product produced. Thus, the use of classical techniques, such as morphological and biochemical characteristics, or sophisticated methods, such as NGS genetic sequencing and/or qPCR, help in this process. Thus, the general objective of this work was to identify and characterize, by classical and genetic phenotypic methods, 37 candidate strains for reference belonging to the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* and *Brevibacillus*, with potential entomocidal, fungicidal and phosphorus solubilizing activity. To carry out the work, all strains were taken from the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Thus, initially 21 strains were sequenced, which were identified as *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. spizizenii*, *Priestia megaterium*, *P. aryabhatai*, *Lysinibacillus capsici* and *Brevibacillus laterosporus*, genes encoding secondary metabolites were also detected in the genomes of the strains. Specific primers were developed for the identification of 29 species belonging to the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus*, in which 20 obtained good results. Subsequently, they were used to identify 600 strains, as a way of validating the method. Thus, 458 strains were identified, of which 80% were from species belonging to the *B. cereus* group. The morphological characterization of the 37 strains was performed following the principles of Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. By this method, it was verified that the strains presented heterogeneous morphological and cytological characteristics. In the biochemical characterization by antimicrobial resistance profiles, disk diffusion and agar dilution methods with different types of antibiotics and concentrations were adopted. Antimicrobial resistance testing indicated that 95% of the isolates were resistant to at least one or more of the 23 antibiotics tested. All strains belonging to the *B. cereus s.l* group were resistant to β -lactam antibiotics. The 37 strains were also identified by mass spectrometry - MALDI TOF, however, only one strain was 100% identified at the genus and species level, *B. mycoides*, when using the database available in the MALDI-Biotyper® software. The comparison of profiles with the supplementary database, fed by the spectra of the 37 strains, resulted in the identification of only 9 strains. The entomocidal potential of 37 insect strains of the orders Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis includens*), Coleoptera (*Anthonomus grandis*), Diptera (*Aedes aegypti*) and Hemiptera (*Euschistus heros*), and the nematode *Caenorhabditis elegans* was evaluated. The antagonistic action of these strains against the phytopathogens *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and phosphorus solubilization. The results indicated that there was a diversity of pathogenic species to insects of the order Lepidoptera, including *B. thuringiensis* and *B. amyloliquefaciens*, with a mortality rate $\geq 80\%$. The species of *B. atropaeus* was pathogenic to the nematode *C. elegans* (85%). The species *Priestia aryabhatai* reduced the survival of *E. heros* by 77%. And a strain of *B. subtilis* (S2790) caused 100% of the mortality of *A. grandis*. It is concluded that the classic phenotypic characterization combined with

genetics produces good results, in addition this study prospected isolates with great potential for biocontrol and biofertilizers intended for sustainable agriculture.

Keywords: Bacterial identification, Genetic Sequencing, qPCR, Antibiotics, MALDI TOF MS, Biological Control.

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características gerais do genoma total de seis isolados de *B. cereus sensu lato*. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de sequências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do *contig* mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas..... 59

Tabela 2. Detecção dos genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos no genoma das estirpes pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*. 61

Tabela 3. Detecção de genes codificadores de virulência (enterotoxinas) no genoma das estirpes pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*. 64

Tabela 4. Características gerais do genoma total de 12 isolados de *B. subtilis sensu lato*. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de sequências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do *contig* mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas..... 67

Tabela 5. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do lipopeptídeo bacilomicina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*..... 69

Tabela 6. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do lipopeptídeo surfactina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*..... 71

Tabela 7. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do lipopeptídeo iturina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*. 72

Tabela 8. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese dos lipopeptídeos plipastatina e fengicina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*. 74

Tabela 9. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do antimicrobiano bacilisina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*. 75

Tabela 10. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*. 76

Tabela 11. Características gerais do genoma total dos isolados S1338 e S2538. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de sequências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do contig mais curto para o qual os contigs mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas 79

Tabela 12. Características gerais do genoma total dos isolados S2894 e S1438. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de sequências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do contig mais curto para o qual os contigs mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas. 80

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Sequências dos *primers* e suas respectivas características e genes alvos. As letras "F" e "R" representam os *primers* forward (direto) e reverse (reverso). 104

Tabela 2. Alvos, estirpes de referência e seus respectivos parâmetros após construção da curva padrão..... 110

Tabela 3. Variação média de C_{Ts} em função das diluições do DNA.....105

Tabela 4. Perfil de frequência das espécies identificadas entre as 600 estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados..... 113

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Propriedades morfológicas das colônias das 37 estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* conforme os princípios de Bergy's Manual of Systematic Bacteriology..... 128

Tabela 2. Citomorfologia das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.* e *Brevibacillus spp.* Em que foram avaliados o **CCV** (comprimento da célula vegetativa), **LCV** (largura da célula vegetativa), **ED** (esporângio distendido), **FES** (formato do esporo), **PES** (posição do esporo no esporângio), **IP** (inclusões proteicas), **Mo** (mobilidade). Definição dos esporos: **OV** = ovalado; **ELP** = elipsoides, **ELI** = elíptico, **CI** = cilíndrico, **ESF** = esférico, **C** = central, **PC** = paracentral, **ST** = subterminal, **T** = terminal. + = positive, - = negative. 138

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Perfil de resistência das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* Em que: Amicacina (Ami), Amoxicilina + Ácido clavulânico (Amc), Ampicilina (Amp), Azitromicina (Atm), Cefazolina (Cfz), Cefepima (Com), Ceftazidmia (Caz), Ceftriaxona (Cro), Ciprofloxacino (Cip), Clindamicina (Cli), Cloranfenicol (Clo), Cotrimoxazol (Sut), Eritromicina (Eri), Gentamicina (Gen), Levofloxacino (Lvx), Oxacilina (Oxa), Penicilina (Pen), Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tet), Vancomicina (Van). R = espécies resistentes; - = espécies suscetíveis. 157

Tabela 2. Triagem dos genes de resistência das espécies sequenciadas. 163

CAPÍTULO 5

Tabela 1. Definição dos valores de pontuação (*scores*) atribuídos pelo programa MALDI Biotyper ao ensaio de identificação de bactérias contra a base de dados pré-estabelecida. .. 177

Tabela 2. Identificação dos isolados sob um ou mais cultivos independentes, em um *score* > 2,3..... 182

CAPÍTULO 6

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade nos bioensaios seletivos das cepas *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* contra *H. armigera* (*Ha*), *S. frugiperda* (*Sf*), *C. includedes* (*Ci*), *A. grandis* (*Agr*), *Ae. aegypt* (*Agy*), *E. heros* (*Ehe*) e *C. elegans*. 223

Tabela 2. Distribuição de genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* em estirpes de *Bt*..... 225

Tabela 3. Atividade antagônica das estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* contra os fitopatógenos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em porcentagem de inibição de crescimento..... 232

Tabela 4. Estimativa da solubilização de fósforo nas espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* 237

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Árvore filogenética das 21 estirpes identificadas por análise de genômica comparativa por inferências filogenéticas por ortologia usando o programa OrthoFinder... 58

CAPÍTULO 2

Figura 1. Índice de Simpson e Índice de Shannon – Wiener (Weaver) calculados. 115

CAPÍTULO 3

Figura 1. Esquema visual das formas, elevações e margens das colônias bacterianas. Fonte: CÂMARA, B. (2013).....125

Figura 2. Esquema das variações de endósporos em *Bacillus*. **1** – Endósporo cilíndrico com posição central; **2** – Endósporo elíptico em posição terminal e presença de proteína cristalina; **3** – Endósporo ovalado em posição terminal; **4** – Endósporo elipsoide em posição central; **5** – Endósporo esférico em posição terminal; **6** – Esporo elipsoide em posição lateral. Fonte: Adaptado de German Wikipedia, acervo livre, desenho de Kookaburra, http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bakterien_Sporen.png, acessado em 20 de outubro de 2022.....126

Figura 3. Microscopia de transmissão das colônias das estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, em escala de 2 mm a 5 mm. **A** – *B. amyloliquefaciens* (S2784); **B** - *B. amyloliquefaciens* (S2536); **C** e **D** - *B. amyloliquefaciens* (S2785); **E** - *B. amyloliquefaciens* (S2788); **F** - *B. amyloliquefaciens* (S2791); **G** – *B. subtilis* (S2776); **H** – *B. subtilis* (S2794); **I** – *B. subtilis* (S2796); **J** – *B. subtilis* (S2896); **K** – *B. pumilus* (S2783); **L** - *B. pumilus* (S2795); **M** – *B. atrophaeus* (S2792); **N** – *B. licheniformis* (S2777); **O** – *B. spizizenii* (S2893); **P** – *B. amyloliquefaciens* (S2787)..... 133

Figura 4. Microscopia de transmissão das colônias das estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, em escala de 2 mm a 5 mm. **A** – *B. cereus* (S0167); **B** - *B. thuringiensis* (S2566); **C** *B. cereus* (S0663); **D** - *B. cereus* (S0953); **E** - *B. thuringiensis kurstaki* (S1450); **F** - *B. thuringiensis azawai* (S1576); **G** – *B. thuringiensis sotto* (S0615); **H** – *B. thuringiensis israelensis* (S1989); **I** – *B. thuringiensis israelensis* (S2782); **J** – *B. tropicus* (S0043); **K** – *B. luti* (S1624); **L** - *B. toyonensis* (S1647); **M** – *B. mycoides* (S2786); **N** – *B. paranthracis* (S2781)..... 135

Figura 5. Microscopia de transmissão das colônias das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.* e *Brevibacillus spp.*, em escala de 2 mm a 5 mm. **A** – *Lysinibacillus sphaericus* (S0002); **B** - *Lysinibacillus sphaericus* (S0127); **C** - *Lysinibacillus capsici* (S2894); **D** - *Lysinibacillus capsici* (S2894); **E** – *Brevibacillus laterosporus* (S1438); **F** - *Brevibacillus laterosporus* (S1431); **G** – *P. megaterium* (S1338); **H** – *P. aryabhatai* (S2538).....137

Figura 6. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Bacillus cereus sensu lato*. **A** – *B. cereus* (S0663); **B** – *B. cereus* (S0953), **C** – *B. thuringiensis israelensis* (S1989), **D** – *Bacillus thuringiensis* (S2566), **E** - *B. thuringiensis azawai* (S1576), **F**- *B. mycoides* (S2786), **G** - *B. tropicus* (S0043), **H** - *B. toyonensis* (S1647), **I** – *B. luti* (S1624), **J** – *B. paranthracis* (S2781). (10.000 x amplificação). Escala entre 2 e 5 µm. Esp = esporo, C = cristal, C – Esf = cristal esférico, C – Bp = cristal bipiramidal, C – Cub = cristal cuboide. 141

Figura 7. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Bacillus subtilis sensu lato*. **A** – *B. amyloliquefaciens* (S2787); **B** – *B. amyloliquefaciens* (S2536), **C** – *B. subtilis* (S2796), **D** – *Bacillus subtilis* (S2794), **E** – *B. amyloliquefaciens* (S2784), **F**- *B. amyloliquefaciens* (S2785), **G** - *B. pumilus* (S2795), **H** - *B. licheniformis* (S2777), **I** – *B. spizizenii* (S2893), **J** – *B. atropheus* (S2792). (10.000 x amplificação). Escala entre 2 e 5 µm. Esp = esporo. 143

Figura 8. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Lysinibacillus spp.* **A** – *Lysinibacillus sphaericus* (S0002); **B** – *Lysinibacillus capsici* (S2894). (10.000 x amplificação). Escala entre 2 e 5 µm. 143

Figura 9. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Brevibacillus laterosporus*. **A** – *Brevibacillus laterosporus* (S1438); **B** – *Brevibacillus laterosporus* (S1431). (10.000 x amplificação). Escala de 2 µm. Esp = esporo. 144

Figura 10. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *P. megaterium* e *P. aryabhatai*. **A** – *P. megaterium* (S1338); **B** – *P. aryabhatai* (S2538). (10.000 x amplificação). Escala de 2 e 10 µm. 144

CAPÍTULO 4

Figura 1. Perfil de resistência a antibióticos por disco-difusão de espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* com base no diâmetro da zona de inibição (mm); (azul) resistência, (alaranjado) sensível. 155

CAPÍTULO 5

Figura 1. Panorama do ensaio de cultivo e aquisição dos dados para a montagem das MSPs. Fonte: A autora.....176

Figura 2. Panorama do ensaio de cultivo e aquisição dos dados para a montagem dos espectros_test. Fonte: A autora.....179

Figura 3. Perfil espectrométrico em análise comparativa dos isolados S0043 e S0167. **A** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167. **B** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167 entre as massas de 2 kDa a 4 kDa. **C** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167 entre as massas de 4 kDa a 8 kDa. **D** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167 entre as massas de 8 kDa a 20 kDa.....185

Figura 4. Perfil espectrométrico em análise comparativa dos isolados S2538 e S1338. **A** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538. **B** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538 entre as massas de 2 kDa a 4 kDa. **C** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538 entre as massas de 4 kDa a 8 kDa. **D** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538 entre as massas de 8 kDa a 16 kDa. 187

Figura 5. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do grupo *Bacillus cereus sensu lato* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** – *B. cereus* (S0663); **B** - *B. cereus* (S0167); **C** - *B. cereus* (S0953); **D** - *B. toyonensis* (S1647); **E** - *B. luti* (S1624); **F** – *B. paranthracis* (S2781); **G** – *B. mycoides* (S2786); **H** – *B. thuringiensis sotto* (S0615); **I** – *B. thuringiensis azawai* (S1576); **J** – *B. thuringiensis israelensis* (S1989); **K** - *B. thuringiensis israelensis* (S2782); **L** – *B. thuringiensis* (S2566); **M** – *B. thuringiensis kurstaki* (S1450); **N** - *B. tropicus* (S0043). 193

Figura 6. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do grupo *Bacillus subtilis sensu lato* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** – *B. amyloliquefaciens* (S2536); **B** - *B. amyloliquefaciens* (S2787); **C** – *B. amyloliquefaciens* (S2784); **D** - *B. amyloliquefaciens* (S2785); **E** - *B. amyloliquefaciens* (S2788); **F** - *B. amyloliquefaciens* (S2791); **G** – *B. licheniformis* (S2777); **H** – *B. atrophaeus* (S2792); **I** – *B. pumilus* (S2795); **J** – *B. pumilus* (S2783); **K** – *B. subtilis* (S2790); **L** - *B. subtilis* (S2776); **M** – *B. subtilis* (S2796); **N** – *B. subtilis* (S2794); **O** – *B. spizizenii* (S2893); **P** – *B. subtilis* (S2896). 199

Figura 7. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do gênero *Lysinibacillus* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** e **B** - *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127); **C** – *Lysinibacillus capsici* (S2894). 200

Figura 8. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do gênero *Brevibacillus* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A e B** – *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438)..... 202

Figura 9. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do gênero *Priestia* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** – *Priestia megaterium* (S1338); **B** – *Priestia aryabhatai* (S2538)..... 202

CAPÍTULO 6

Figuras 1. Montagem do bioensaios para insetos da ordem Lepidoptera. **A** - Placa de cultivo de células de 24 poços utilizada para bioensaios de *S. frugiperda*, *H. armigera* e *C. includens*. **B e C** - Lagarta em copos descartáveis utilizados na troca contendo dieta livre de bactérias. Fonte: Autora. 215

Figuras 2. Bioensaio com *Anthonomus grandis*. **A** - Placa de bioensaio contendo dieta com a mistura espora cristal subdividida em quatro quadrantes; **B** - Larva morta com sintomas de bacteriose e larvas vivas. A seta indica a uma larva morta.; **C** -Ovos e larvas neonatas de *A. grandis* utilizadas no bioensaios; **D** – Larvas neonatas de *A. grandis*..... 216

Figuras 3. Bioensaio de *Aedys aegypti*. **A** – Montagem do bioensaio, contendo o copo plástico descartável e as larvas de *Ae. aegypti*. **B** – Larvas de 2º ínstar de *Ae. aegypti*..... 217

Figura 4. Bioensaio de *Euschistus heros*. **A** – Materiais usados para montagem do bioensaio, conforme descrito em metodologia. **B** – Ensaio montado, com dieta artificial e insetos de 2º ínstar de *E. heros*..... 218

Figura 5. Cultura de *Caenorhabditis elegans* observada em microscópio óptico sob amplificação de 4000 X. 219

Figura 6. Teste pareado. As setas indicam a disposição de cada um dos componentes do ensaio. O disco contendo o patógeno foi depositado no centro da placa e a suspensão bacteriana em quatro pontos laterais e equidistantes. Fonte: Montalvão, 2016. 221

Figura 7. Crescimento das colônias fúngicas em ensaio pareado. Figuras de B0 a B5 mostram o crescimento com interferência do antagonista. Fonte: Montalvão, 2016. 221

Figura 8. Atividade antagônica das estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. **A** – *B. thuringiensis* (S1450); **B** – *B. amyloliquefaciens* (S2536); **C** – *B. amyloliquefaciens* (S2785); **D** – *B. amyloliquefaciens* (S2788); **E** – *B. cereus* (S0953); **F** - *B. amyloliquefaciens* (S2784); **G** – *B. subtilis* (S2794); **H** – *B. thuringiensis* (S1989); **I** – *B. pumilus* (S2795); **J** – *L. sphaericus* (S0002); **K** – *Brev. laterosporus* (S1438); **L** – *B. subtilis* (S2796).....225

LISTA DE ABREVIACOES

ANI - Average Nucleotide Identity

CSIs - inseroes e deleoes de assinaturas conservadas

TRIS-HCl - TRIS hydrochloride – TRIS cido clorídrico

EDTA - cido Etilenodiaminotetraacético

SDS - Dodecil sulfato de sodio

UFC - Unidades formadoras de colonias

qPCR - Reaao em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

PCR - Reaao em cadeia da polimerase

dH₂O - gua destilada

dNTP - Deoxinucleotideos

pb - Pares de base

T_m - *Melting* temperature

CXR - Carboxy-X-Rhodamine

CIMs - Concentraoes inibitorias mínimas

MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry

MSP - Main spectra projection

Bt - *Bacillus thuringiensis*

s. l. – *sensu lato*

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1. Objetivo Geral	3
3.2. Objetivos Específicos.....	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4.1. PRODUTOS BIOLÓGICOS	4
4.2. BACTÉRIAS	6
4.2. FILO FIRMICUTES	6
4.2.1. Família Bacillaceae.....	8
4.2.2. Gênero <i>Bacillus</i>	8
4.2.2.1. Grupo <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	10
4.2.2.2. Grupo <i>Bacillus subtilis sensu lato</i>	14
4.2.3. Gênero <i>Lysinibacillus</i>	18
4.2.3.1. <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	18
4.2.4. Gênero <i>Priestia</i>	20
4.2.5. Família Paenibacillaceae.....	21
4.2.5.1. <i>Brevibacillus laterosporus</i>	22
4.3. CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA	23
4.3.1. Caracterização fenotípica clássica: morfológica e bioquímica.....	23
4.3.2. Caracterização bioquímica: Espectrometria de Massa – MALDI-TOF MS.....	24
4.3.3. Caracterização Molecular	25
4.3.3.1. Real Time – PCR	26
4.3.3.2. Sequenciamento Genético	26
4.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

**CAPÍTULO 1 – SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO DE ESTIRPES
PERTENCENTES AOS GÊNERO *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*..... 52**

RESUMO	52
ABSTRACT	53
1.1. INTRODUÇÃO	54
1.2. OBJETIVO GERAL	55
1.3. MATERIAL E MÉTODOS	55
1.3.1. Seleção das estirpes.....	55
1.3.2. Cultivo, preparo e purificação das estirpes.....	55
1.3.3. Extração do DNA genômico.....	55
1.3.4. Sequenciamento do genoma.....	56
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
1.4.1. Grupo <i>Bacillus cereus sensu lato</i>	58
1.4.1.1. Sideróforos	59
1.4.1.2. Genes de virulência	63
1.4.1.3. δ -Endotoxinas	64
1.4.1.4. Genes de resistência a antibióticos.....	65
1.4.2. Grupo <i>Bacillus subtilis sensu lato</i>	66
1.4.2.1. Bacilomicina.....	68
1.4.2.2. Surfactina	70
1.4.2.3. Iturina.....	71
1.4.2.4. Fengicina e Plipastatina	73
1.4.2.5. Bacilisina	74
1.4.2.6. Sideróforos	76
1.4.3. <i>Priestia megaterium</i> (<i>Bacillus megaterium</i>) e <i>Priestia aryabhatai</i> (<i>Bacillus aryabhatai</i>).....	77
1.4.4. Gêneros <i>Lysinibacillus</i> e <i>Brevibacillus</i>	79
1.5. CONCLUSÕES	80
1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE PRIMERS PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* POR PCR EM TEMPO REAL..... 91

RESUMO..... 91

ABSTRACT..... 92

2.1. INTRODUÇÃO..... 92

2.2. OBJETIVO GERAL 94

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 94

2.4. MATERIAL E METÓDOS 95

2.4.1. Espécies de Referência 95

2.4.2. Desenho dos *primers* 95

2.4.3. Ensaios de especificidade, otimização, curva padrão e eficiência dos *primers* ... 96

2.4.4. Seleção de estirpes para validação dos *primers*..... 98

2.4.5. Extração do DNA genômico 98

2.4.6. Ensaios de identificação (detecção) por qPCR 99

2.4.7. Análise Estatística..... 99

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 100

2.5.1. Ensaios de especificidade, curva padrão e eficiência dos *primers* 100

2.5.2. Identificação de estirpes por qPCR 112

2.5.3. Diversidade de espécies 114

2.6. CONCLUSÕES..... 116

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 116

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOMORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Brevibacillus spp.* e *Priestia spp.*. 121

RESUMO..... 121

ABSTRACT..... 122

3.1. INTRODUÇÃO..... 123

3.2. OBJETIVO GERAL 124

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 124

3.4. MATERIAL E MÉTODOS	124
3.4.1. Seleção das estirpes	124
3.4.2. Caracterização morfológica.....	125
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	126
3.6. CONCLUSÕES.....	145
3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

CAPÍTULO 4. RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS COMO UMA CARACTERÍSTICA TAXONÔMICA DAS ESPÉCIES DE <i>Bacillus spp.</i>, <i>Lysinibacillus spp.</i>, <i>Priestia spp.</i> e <i>Brevibacillus spp.</i>.....	148
--	------------

RESUMO.....	148
ABSTRACT.....	149

4.1. INTRODUÇÃO	150
4.2. OBJETIVO GERAL	151
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	151
4.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	152
4.4.1. Seleção, cultivo e preparo das estirpes.....	152
4.4.2. Disco-Difusão.....	152
4.4.3. Diluição em Ágar	153
4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	154
4.5.1. Disco-difusão	154
4.5.2. Diluição em Ágar	160
4.6. CONCLUSÕES	166
4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

CAPÍTULO 5 - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS <i>Bacillus</i>, <i>Lysinibacillus</i>, <i>Priestia</i> e <i>Brevibacillus</i> POR ESPECTROMETRIA DE MASSA - MALDI TOF	170
---	------------

RESUMO.....	170
ABSTRACT.....	171

5.1. INTRODUÇÃO.....	172
5.2. OBJETIVO GERAL	173
5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	173
5.4. MATERIAL E MÉTODOS	173
5.4.1. Cepas Bacterianas e Identificação Molecular.....	173
5.4.2. Cultivo, extração e preparo das amostras para MALDI-TOF/MS	174
5.4.3. Aquisição dos dados para a montagem das MSPs	175
5.4.4. Ensaio de identificação preliminar via confronto com o banco de dados da plataforma Biotyper 3.0.....	176
5.4.5. Montagem dos espectros principais (MSPs) das estirpes	177
5.4.6. Ensaio de identificação via confronto com a biblioteca particular (MSPs)	178
5.4.7. Processamento dos dados.....	179
5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	180
5.6. CONCLUSÕES.....	203
5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	204

CAPÍTULO 6. PROSPECÇÃO DE CEPAS DE <i>Bacillus spp.</i>, <i>Lysinibacillus spp.</i>, <i>Priestia spp.</i> e <i>Brevibacillus spp.</i> COM POTENCIAL ENTOMICIDA, FUNGICIDA E SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO	207
---	------------

RESUMO.....	207
ABSTRACT.....	208

6.1. INTRODUÇÃO.....	209
6.2. OBJETIVO GERAL	211
6.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	211
6.4. MATERIAL E METODOS	211
6.4.1. Seleção de Estirpes	211
6.4.2. Triagem de genes <i>cry</i>, <i>cyt</i>, <i>vip</i> e <i>sip</i> por qPCR	212
6.4.3. Cultivo e preparo das estirpes para os bioensaios seletivos	213
6.4.4. Procedência dos insetos e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	213
6.4.5. Bioensaios Seletivos	214

6.4.5.1. <i>Spodoptera frugiperda</i> JE Smith, 1797, <i>Helicoverpa armigera</i> Hübner, 1809, <i>Chrysodeixis includens</i> Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae)	214
6.4.5.2. <i>Anthonomus grandis</i> Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae)	215
6.4.5.3. <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1772 (Diptera: Culicidae)	216
6.4.5.4. <i>Euschistus heros</i> Fabricius, 1798 (Hemiptera: Pentatomidae).....	217
6.4.5.5. <i>Caenorhabditis elegans</i> Brenner, 1974 (Rhabditida: Rhabditidae).....	218
6.4.6. Análise e interpretação dos resultados de bioensaios seletivos de mortalidade	219
6.4.7. Antagonismo de <i>Bacillus spp.</i> , <i>Lysinibacillus spp.</i> , <i>Brevibacillus spp.</i> e <i>Priestia spp.</i> em <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	220
6.4.8. Solubilização de fósforo	221
6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	222
6.5.1. Bioensaios seletivos insetos e nematoide.....	222
6.5.2. Antagonismo de <i>Bacillus spp.</i> , <i>Lysinibacillus spp.</i> , <i>Priestia spp.</i> e <i>Brevibacillus spp.</i> em <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	231
6.5.3. Solubilização de Fósforo	235
6.6. CONCLUSÕES.....	238
6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	238
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS.....	250
APÊNDICE I – CAPÍTULO 2.....	252
APÊNDICE II – CAPÍTULO 3	263
APÊNDICE III – CAPÍTULO 4.....	266
APÊNDICE IV – CAPÍTULO 5.....	302

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um país de clima tropical, e sua economia está intrinsicamente ligada à agricultura. Assim, a produtividade agrícola é constantemente ameaçada por inúmeros fatores bióticos e abióticos, dentre os quais estão as perdas substanciais na produção alimentar ocasionadas por insetos, fitopatógenos, plantas daninhas, desnutrição vegetal e fatores climáticos (ÂNGELO *et al.*, 2010).

O uso de insumos químicos é a medida protetiva mais utilizada no sistema convencional agrícola. Contudo, devido às aplicações excessivas destes produtos sintéticos, tem-se observado problemas ambientais constantes, que se caracterizam principalmente pela contaminação do solo e da água, bem como a seleção de insetos-praga resistentes (VALICENTE, 2009; CAMPANINI *et al.*, 2012).

É crescente no país a adesão por parte dos produtores rurais, práticas agrícolas ecologicamente e economicamente viáveis, que façam uso de organismos ativos biológicos, como bactérias, vírus, fungos, nematódeos e insetos-predadores (LANNA-FILHO *et al.*, 2010, BRASIL, 2019a). A inserção de microrganismos e sua diversidade metabólica na agricultura vem se destacando ao longo do tempo, uma vez que a microbiota representa o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza (HUNTER-CEVERA, 1998). Enquanto o mercado convencional de defensivos sintéticos tem apresentado sinais de estagnação, houve nos últimos 10 anos um aumento exponencial na venda e no uso de produtos biológicos. Nesse contexto, o mercado de bioprodutos, usados principalmente para o controle de pragas e doenças agrícolas cresceu mais de 70%, movimentando cerca de US\$ 164,9 milhões em 2018 (BRASIL, 2019b).

Um dos grupos de microrganismos frequentemente usados na composição de produtos biológicos são as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* e alguns gêneros correlatos, como *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia*, entre outros. Essas bactérias exibem propriedades fisiológicas bastante diversas, o que as tornam alternativas ecologicamente corretas, saudáveis e viáveis para mitigar o uso excessivo de fertilizantes e pesticidas na agricultura (BACH *et al.*, 2022).

Compreende-se que um dos princípios básicos a serem adotados na produção de bioprodutos, seja em escala comercial ou de forma caseira “*on farm*” é a pesquisa do material biológico a ser multiplicado, mas especificamente a identificação e caracterização do mesmo, com objetivo garantir a segurança da população e do meio ambiente, bem como estabelecer

padrões de qualidade e eficiência dos produtos (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016; CROPLIFE, 2022). Assim, diversos métodos e técnicas são destinados a esse fim, a abordagem polifásica, por exemplo, é usada para distinguir, caracterizar e classificar espécies de bactérias com base em dados morfológicos e bioquímicos suplementados com informações obtidas de técnicas moleculares, como sequenciamento genético e Real time – PCR (COLWELL, 1970).

2. JUSTIFICATIVA

Em um processo de produção de produtos biológicos, seja o mesmo destinado ao registro e comercialização ou por uso próprio na produção “*on farm*”, conhecer o material biológico a ser multiplicado é imprescindível. Assim, realizar a correta e precisa identificação, caracterização e classificação do microrganismo garante um controle de qualidade eficiente do processo, bem como um bioproduto 100% eficaz e livre de quaisquer contaminantes que possam pôr em risco a saúde humana e animal. Desse modo, o uso de técnicas clássicas, como caracterizações fenotípicas por propriedades morfológicas e bioquímicas, e/ou métodos sofisticados, como caracterizações moleculares por sequenciamento genético NGS e qPCR podem auxiliar nesse processo.

Os critérios morfológicos, fisiológicos e bioquímicos são os métodos mais utilizados na caracterização de microrganismos (bactérias), uma vez que são técnicas baratas, fáceis de serem reproduzidas e interpretadas. Além disso, são métodos que auxiliam na compreensão sobre a forma e estrutura dos organismos, bem como sobre a função ecológica e da fisiologia ideal de crescimento dos mesmos. No entanto, as caracterizações fenotípicas clássicas podem gerar identificações simplistas e muitas vezes errôneas, visto que um mesmo microrganismo pode apresentar caracteres fenotípicos diferentes de acordo com as variações das condições de crescimento ou padrões fenotípicos bastante similares em espécies próximas filogeneticamente. Ademais, a interpretação dos resultados nas caracterizações fenotípicas envolve julgamento subjetivo, havendo assim a necessidade de uma padronização constante desses testes.

Por outro lado, as caracterizações baseadas em análises de DNA e RNA permitiram compreender as relações evolutivas e ancestrais de cada microrganismo. O sequenciamento genético baseado em 16S rDNA, por exemplo, ainda é considerado o padrão-ouro da taxonomia bacteriana, por ser um método barato, totalmente reprodutível em laboratórios, não requerente de cultura bacteriana e, e por ser uma molécula universal na identificação de bactérias. Contudo, esse método não garante a distinção coesa de espécies intimamente ligadas, visto que as sequências de espécies muito próximas não apresentam diferenças significativas que possam

ser úteis em suas distinções. Todavia, o sequenciamento do 16S rDNA foi extremamente importante e útil na criação e reclassificação de espécies e gêneros, antes identificados por critérios clássicos.

Além disso, houve uma maior disponibilidade de sequências genéticas em bancos públicos, que junto com o advento da bioinformática auxiliou no surgimento de abordagens genéticas mais complexas, como a genômica comparativa, que foi responsável por analisar o genoma completo das espécies permitindo detectar genes importantes e atuantes em diversas funções, como genes responsáveis pela produção de fenótipos únicos, pela produção de metabolitos secundários e toxinas com capacidade biotecnológica, genes de manutenção e sobrevivência da espécie que são úteis na identificação e classificação microbiana.

Desse modo, o uso de caracterizações fenotípicas clássicas aliadas as genéticas podem acarretar identificações e caracterizações microbianas mais confiáveis, sensíveis, coesas, práticas e de baixo custo, auxiliando assim em um processo de produção de bioprodutos completamente eficiente e de qualidade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar e caracterizar por métodos fenotípicos clássicos e genéticos, 37 estirpes candidatas a referência pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*, com potencial atividade entomocida, fungicida e solubilizadora de fósforo.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificar 21 estirpes pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por sequenciamento de nova geração (NGS). E analisar o genoma dessas cepas, por meio da bioinformática, na busca por genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários importantes;
2. Desenvolver *primers* específicos para qPCR e identificar (detectar) espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*;

3. Caracterizar 37 estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Brevibacillus spp.* e *Priestia spp.* pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por parâmetros morfológicos e citomorfológicos;
4. Determinar o perfil de resistência a antibiótico de 37 cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* como uma premissa de isolamento e característica taxonômica das espécies;
5. Identificar 37 isolados de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*, advindos da Coleção Bacteriana de Invertebrados – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por espectrometria de massa – MALDI TOF MS e abordagem comparativa por MALDI-Biotyper®;
6. Prospecção de cepas de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* solubilizadoras de fósforo e com ação patogênica a pragas e fitopatógenos de importância agrícola e vetores de doenças;
7. Definir se os métodos utilizados são suficientes para identificar e classificar as bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*. E determinar um protocolo de identificação eficaz, prático e funcional para essas espécies.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. PRODUTOS BIOLÓGICOS

A demanda por insumos biológicos, como bioestimulantes, biopesticidas e biofertilizantes tem crescido no Brasil à medida que a agricultura global procura avançar em busca de formas mais sustentáveis para aumentar a produtividade e proteção de cultivos agrícolas (DENT, 2021). Estima-se que o mercado global de biofertilizantes e biopesticidas atingirá US\$ 12 bilhões até 2031, de acordo com sua taxa de crescimento atual (DENT, 2021). No Brasil, de acordo com a CropLife (2021) o mercado de produtos biológicos atingirá em 2030 cerca de R\$ 3,7 bilhões, representando um crescimento de 107% em comparação com a previsão de 2021, de quase R\$ 1,8 bilhão. Grandes culturas como soja, cana-de-açúcar e milho,

representam 75% desse mercado. Somente com a cultura da soja, estima-se uma economia anual de US\$ 15 bilhões pelo uso de produtos biológicos destinados a fixação de nitrogênio (EMBRAPA, 2021).

A expansão do mercado de biológicos no Brasil vem sendo estimulada pela implementação do Programa Nacional de Bioinsumos e pela priorização do tema dentro de organizações como a Embrapa, universidades, outras instituições de pesquisa brasileira e pela iniciativa privada (EMBRAPA, 2021). Além do estímulo para compra e uso de produtos biológicos, existe também um encorajamento para produção nacional desses bioinsumos. Assim, um levantamento internacional realizado em 2018, destacou que o Brasil é o quarto país com melhor desempenho na produção de produtos biológicos, respondendo por 7% da comercialização mundial. Entretanto, o setor biológico é liderado pelos Estados Unidos (37%), Espanha (14%) e Itália (10%) (BRASIL, 2019).

O Brasil é uma referência mundial na utilização de defensivos biológicos. Ao todo, são 552 produtos de baixo impacto registrados pelo MAPA desde o ano de 2000. Esses produtos podem ser usados na agricultura orgânica por possuírem ingredientes ativos biológicos, como microrganismos (bactérias, fungos e vírus), macrorganismos (inimigos naturais), bioquímicos (hormônios e enzimas), semioquímicos (feromônios e aleloquímicos), reguladores de crescimento vegetal e extratos vegetais. Somente para o controle de pragas agrícolas, de janeiro a julho de 2022 foram registrados pelo MAPA 43 novos produtos (BRASIL, 2022).

O aumento de produtos biológicos registrados no Brasil vem crescendo com o passar dos anos, sendo os microrganismos os mais utilizados como base dos bioprodutos. De acordo com CropLife (2022) 64% da produção de produtos biológicos é com microrganismos, sendo 53% destinados ao controle biológico de pragas, como bioinseticidas. Dentre os microrganismos utilizados, os fungos e as bactérias são considerados os principais agentes biológicos para composição de formulações biológicas, visto que os mesmos possuem alto nível de especificidade, afetando apenas os organismos alvos, também são eficazes em dosagens mínimas, possuem baixo nível de resíduo ambiental e, reduzem significativamente o uso de produtos químicos aplicados em larga escala (MALAIKOZHUNDAN *et al.*, 2017).

Ademais, esses produtos são importantes para agricultura não apenas pelo impacto toxicológico e ambiental, mas também por beneficiar as culturas de suporte fitossanitário insuficiente (*minor crops*), visto que os mesmos são registrados por pragas e não por cultura, como acontece com os insumos químicos (BRASIL, 2022).

4.2. BACTÉRIAS

As bactérias constituem-se como o grupo mais diversos e abundante entre os organismos do planeta Terra (WHITMAN *et al.*, 1998). Esses pequenos organismos vivos estão presentes em todos os ambientes terrestres e aquáticos, ocupando e colonizando todos os tipos de nichos ecológicos possíveis, como no interior e nas superfícies de plantas, água, rochas, geleiras e, em ambientes muito quentes, como vulcões. Em outras palavras, as bactérias toleram condições incompatíveis com a vida humana, como temperaturas superiores a 100 °C ou em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes (VIDEIRA *et al.*, 2007; JACOB, 2017; THOMASHOW *et al.*, 2018; WHITE, 2019).

Devido ao aumento das preocupações acerca das questões ambientais, as bactérias passaram a ser estudadas, com o intuito de amenizar os problemas de poluição e degradação do meio ambiente, assim como melhorar a qualidade dos processos e produtos agrícolas e florestais. Estes microrganismos desempenham papel fundamental na natureza, atuando em diversos processos biológicos e químicos dos ecossistemas, principalmente em processos como fotossíntese, decomposição de matéria orgânica, regulação de funções orgânicas em plantas e animais (MERICI *et al.*, 2017).

Assim, muitas bactérias isoladas de diferentes habitats possuem potencial biotecnológico (BROADBENT *et al.*, 2003; CHEMIER *et al.*, 2009), uma vez que determinadas estirpes bacterianas possuem ação entomopatogênica no controle de pragas e doenças, produzem enzimas na biorremediação, e promovem o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos (FELDHAAR, 2011; KAYA *et al.*, 2012; MERICI *et al.*, 2017).

Por anos, as bactérias têm sido descritas e identificadas por metodologias tradicionais, baseadas em características fenotípicas, obtidas através de métodos empíricos e sujeitos a grandes variações. Devido a isto, esta área de pesquisa vem sendo revolucionada pelo uso de novas e eficientes ferramentas para identificar e caracterizar bactérias, especialmente por métodos moleculares que envolvem propriedades genômicas (VIDEIRA *et al.*, 2007).

4.2. FILO FIRMICUTES

O filo Firmicutes consiste em sete classes bacterianas - *Bacilli*, *Clostridia*, *Erysipelotrichia*, *Thermolithobacteria*, *Negativicutes*, *Limnochordia* e *Tissierellia* – dentro das quais estão alocadas pelo menos 45 famílias e 420 gêneros (Listo f approved bacterial names; www.bacterionet.com, 24/07/2022) (FRITZE, 2004; SOKOLOVA *et al.*, 2007; DE VOS *et al.*,

2009; MARCHANDIN *et al.*, 2010; GALPERIN *et al.*; 2013). Uma característica marcante do filo é a presença de parede celular rígida, composta por ácido murâmico e ácido teicóico, em algumas espécies (FRITZE, 2004; SCHLEIFER, 2009; DE VOS *et al.*, 2009; GALPERIN *et al.*; 2013).

O filo também é fenotipicamente diverso, com células esféricas, retas, curvas, bastões, helicoidais ou sarcinas, podendo ou não apresentar flagelos (SCHLEIFER, 2009; LOGAN *et al.*, 2009). Espécies desse filo são aeróbicas, aeróbicas facultativas ou anaeróbicas. Ademais, a maioria dos membros são considerados quimio-organotróficos, outros são foto-heterotróficos anoxigênicos. Em sua maioria são mesófilos, termófilos e/ou halófitos. Crescem em pH neutro, enquanto alguns são acidófilos ou alcalifícos (SCHLEIFER, 2009; LOGAN *et al.*, 2009).

Além disso, as espécies Firmicutes possui como característica diagnóstica o baixo conteúdo de bases citosina (C) e guanina (G), percentual de G+C de <50% no DNA genômico, contudo, existem representantes deste filo que fogem à regra, por apresentarem conteúdo percentual de G+C > 60%, por exemplo *Symbiobacterim thermophilum* (GALPERIN *et al.*, 2013).

A formação de endósporos (esporos) é uma característica exclusiva dos membros Firmicutes. Entretanto, a endoesporulação não constitui uma característica universal do filo, uma vez que as linhagens alocadas na classe Thermolithobacteria são asporogênicas. Nas demais classes, espécies formadoras de endósporos coexistem com não formadoras, sendo que em mesmo gênero pode haver espécies esporulantes e asporogênicas. No entanto, os membros capazes de formar endósporos compartilham um conjunto mínimo de genes homólogos envolvidos na esporulação (FRITZE, 2004; DE VOS *et al.*, 2009; GALPERIN *et al.*, 2013).

No filo Firmicutes, a ordem *Bacillales*, dentro da classe *Bacilli* abriga importantes famílias de bactérias produtoras de endósporos, como Bacillaceae, Alicycobacillaceae, Paenibacillaceae, Pasteuriaceae, Planococcaceae, Sporolactobacillaceae e Thermoactionomycetaceae. Os gêneros pertencentes a essas famílias que acomodam o maior número de espécies são: *Bacillus* (cerca 377 espécies e 8 subespécies), *Paenibacillus* (cerca de 240 espécies e 4 subespécies), *Virgibacillus* (35 espécies), *Lysinibacillus* (cerca de 30 espécies), *Alicyclobacillus* (26 espécies e 2 subespécies), *Halobacillus* (21 espécies), *Geobacillus* (20 espécies e 4 subespécies) e *Brevibacillus* (23 espécies) (FRITZE, 2004; DE VOS *et al.*, 2009; LOGAN *et al.*, 2009).

4.2.1. Família Bacillaceae

A família Bacillaceae abriga gêneros compostos por espécies aeróbias ou aeróbias facultativas, quimiorganotróficas, produtoras de catalase, Gram-positivas e, em maioria, formadoras de esporos. Em décadas passadas, os membros dessa família eram todos alocados no gênero *Bacillus*. No entanto, a partir de 1990, devido as análises baseadas em sequencias de genes de rRNA 16S, diversos novos gêneros foram propostos para realocar essas espécies de maneira adequada (MANDIC-MULEC *et al.*, 2015; DE VOS *et al.*, 2009). Assim, até o ano de 2009 a família Bacillaceae abrigava 30 gêneros (DE VOS *et al.*, 2009), porém, em um estudo recente envolvendo análises filogenômicas e genômicas comparativas, Gupta *et al.* (2020) reclassificaram 148 espécies bacterianas alocadas no gênero *Bacillus*, em 17 novos gêneros. Desse modo, a família Bacillaceae passou a compreender um total de 47 gêneros, incluindo os gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Priestia*.

4.2.2. Gênero *Bacillus*

O gênero bacteriano *Bacillus* possui uma longa e rica história nos anais da microbiologia. Durante a década de 1870, Ferdinand Cohn, isolou uma pequena bactéria móvel e aeróbica de infusões de feno fervido, ao qual denominou-a de *Bacillus subtilis*, posterior, que significa “vara fina”. Nas décadas de 1930 e 1940, o gênero *Bacillus* ganhou uma definição clara de suas espécies, ao qual foram descritas como bactérias em forma de bastonetes capazes de formar aerobicamente endósporos refratários resistentes ao calor, secagem e outras agentes destrutivos (COHN, 1872; GORDON *et al.*, 1973; GALPERIN *et al.*, 2013; ZEIGLER; PERKINS, 2021).

As espécies de *Bacillus* pertencem ao filo Firmicutes, classi *Bacilli*, ordem *Bacillales* e família Bacillaceae (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011). Além disso, esse gênero compreende cerca de 280 (> 390 com sinônimos) espécies, com nomes validamente publicados no site <http://www.bacterio.net/bacillus.html> (PARTE, 2018). Salvo algumas espécies divergentes, esse gênero é composto por dois principais clados de espécies que são filogeneticamente não relacionados. O primeiro é conhecido como “Cereus clade”, que contém várias espécies que são importantes patógenos de humanos, *B. anthracis* e *B. cereus*, e patógenos de insetos, *B. thuringiensis* (DE VOS *et al.*, 2009; BHANDARI *et al.*, 2013). O segundo clado é denominado “Subtilis clade” que contém espécies com importantes aplicações

biotecnológicas e biofarmacêuticas, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, entre outros (ASH *et al.*, 1991; DE VOS *et al.*, 2009; BHANDARI *et al.*, 2013).

As principais características das espécies de *Bacillus* são seu crescimento aeróbio ou anaeróbio, morfologia bacilar, motilidade flagelar, Gram-positivas, tamanho variável (0,5 a 10 µm) e crescimento em pH neutro. Ademais, a maioria das espécies são mesófilas, cuja faixa de temperatura de crescimento varia entre 30 e 45 °C, porém existem também espécies termófilas, que crescem em temperaturas acima de 65 °C (RABINOVITCH *et al.*, 2015; MADIGAN *et al.*, 2016).

Além disso, espécies desse gênero são ubíquas, podendo ser encontradas em regiões e ecossistemas diversificados, devido a sua capacidade de formar endósporos, característica que lhes confere resistência e aumenta seu isolamento em vários habitats, tanto aquáticos quanto terrestres, e até mesmo em ambientes sob condições extremas (TEJERA-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Além do mais, essas bactérias podem ser encontradas em solos com muita acidez, áreas desérticas do Antártico, em animais vertebrados e invertebrados e no ar (EHLING-SCHULZ; MESSELHÄUSSER, 2013; LOGAN; HALKET, 2011; MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011).

Membros desse gênero possuem uma grande diversidade metabólica e funcional dedicados à produção de substâncias reconhecidas em aplicações biotecnológicas e biofarmacêuticas, com propriedades antimicrobianas, surfactantes e promotoras de crescimento vegetal (ONGENA; JACQUES, 2008), como os fitohormônios, para estimular o crescimento de plantas, polissacarídeos para formação de biofilme, sideróforos para solubilização de ferro, enzimas líticas e uma variedade de policetídeos e lipopeptídeos sintetizados não ribossomais com ação patogênica contra fungos, bactérias e insetos (RÜCKERT *et al.*, 2011; HARWOOD *et al.*, 2018). Também atuam na solubilização de fosfato (RAMÍREZ *et al.*, 2014) e, na fixação de nitrogênio pela atividade enzimática da nitrogenase, produzidas por espécies como *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. marisflavi* e *B. alkalidiazotrophicus* (XIE *et al.*, 1998; DING *et al.*, 2005; SOROKIN *et al.*, 2008). Além disso, dentro do gênero *Bacillus* existe espécies promissoras ao controle de pragas agrícolas, denominadas entomopatogênicas, devido a produção de inclusões proteicas (cristais) que são tóxicos a um vasto número de espécies de insetos, uma das espécies mais conhecidas para esse fim é o *Bacillus thuringiensis* (COSTA *et al.*, 2010).

4.2.2.1. Grupo *Bacillus cereus sensu lato*

O grupo *Bacillus cereus sensu lato* (*s.l*) consiste em um complexo de espécies bacterianas, pertencentes ao gênero *Bacillus*, com baixo percentual molecular de GC no seu DNA (32-62%) (PRESCOTT *et al.*, 2008). Essas bactérias são caracterizadas como Gram-positivas, formadoras de esporos, com metabolismo aeróbico ou anaeróbio facultativo (FIRA *et al.*, 2018). Possuem genomas altamente conservados, com tamanhos que variam de 5,2 a 5,9 pb e sequencias genéticas de 16S rRNA muito similares entre si (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2019).

Membros desse grupo são excepcionalmente onipresentes, uma vez que são amplamente distribuídas em uma variedade de nichos ecológicos, estando presentes em solo, água, rizosfera de plantas, e sistemas gastrointestinais de humanos, animais e insetos (OWUSU-KWARTENG *et al.*, 2017). Do ponto de vista biotecnológico, a característica mais importante dessas espécies constitui-se na capacidade de produzir uma grande diversidade de substância antagonistas, com amplo espectro de patogenicidade, altamente divergentes entre si (RASKO *et al.*, 2005; FIRA *et al.*, 2018). Essas propriedades patogênicas também possuem alto potencial inseticida, aos quais proporcionam impactos significativos na saúde humana e na agricultura, principalmente no controle biológico de pragas e doenças (PERALTA; PALMAS, 2017).

O cluster filogenético de *Bacillus cereus s.l* compreende nove espécies, que apresentam relações filogenéticas próximas, porém com alta diversidade ecológica (FAYAD *et al.* 2019). As espécies mais estudadas dentro do grupo são *B. anthracis*, agente etiológico do antraz, descoberto por Robert Koch no século XIX (OKINAKA *et al.*, 1999; TURNBULL, 2002), *B. cereus sensu stricto*, patógeno oportunista causador de infecções gastrointestinais em humanos (SASAHARA *et al.*, 2011), e a espécie *B. thuringiensis*, uma bactéria entomopatogênica, produtora de δ -endotoxinas com ação bioinseticida em diversas ordens de artrópodes (PALMA *et al.*, 2014).

O grupo também compreende espécies com menor importância econômica, como *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*, promotores de crescimento radicular (NAKAMURA, 1998); *B. cytotoxicus*, bactéria com termotolerância e citotoxicidade (GUINEBRETIERE *et al.*, 2013); *B. wehenstephanensis* e *B. wiedmannii*, que possuem psicotolerância e habilidade de deterioração dos alimentos (LECHNER *et al.*, 1998; MILLER *et al.*, 2016) *B. toyonensis*, utilizado na nutrição animal como probiótico. Também foram propostas e validadas para esse grupo espécies como *B. paranthracis*, *B. pacificus*, *B. tropicus*, *B. albus*, *B. mobilis*, *B. luti*, *B. proteolyticus*, *B. nitratireducens* e, *B. paramycoides* (LIU *et al.*, 2017). Além disso,

recentemente foram propostos novos membros plausíveis ao grupo, em torno de 15 espécies, porém não validados (ZERVAS *et al.*, 2020).

Assim, ao longo dos anos, a filogenia do grupo *B. cereus s.l* foi excessivamente analisada por diversos métodos, como observações fenotípicas, hibridação DNA-DNA, análise de sequências de rRNA 16S e 23S e os genes conservados de sobrevivência (housekeeping) (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011; KAMAR *et al.*, 2013). No entanto, a classificação de espécies pertencentes a esse grupo bacteriano é um tanto quanto desafiadora, uma vez que membros deste grupo possuem sequências de rRNA 16S e 23S altamente semelhantes, principalmente entre as espécies de *B. thuringiensis* e *B. cereus* (LIU *et al.*, 2015; PATIÑO-NAVARRET; SANCHIS, 2017).

4.2.2.1.1. *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus sensu stricto (s.s)* é considerada a espécie modelo do grupo *Bacillus cereus s.l*. É uma bactéria ubíqua, Gram-positiva, com pouca mobilidade, aeróbica e/ou aeróbica facultativa. Seus esporos são altamente resistentes ao calor, ácido, UV e dessecação (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2015). Suas células vegetativas são consideradas grandes, medindo de 3 a 5 µm de comprimento e 1µm de largura, e são tipicamente organizadas em cadeias (DROBNIIEWSKI, 1993; CALLEGAN *et al.*, 1999; LOGAN *et al.*, 1999).

A espécie bacteriana foi identificada pela primeira vez em 1906, pelo pesquisador Plazikowski, ao qual associou a bactéria a uma intoxicação alimentar, advindos de alimentos contaminados (JAY *et al.*, 2005). Apesar de ser uma espécie bacteriana que completa seu ciclo de vida saprófito completo, *B. cereus* é considerada a causa mais importante de distúrbios gastrointestinais severos em humanos, assim como patógeno oportunista causador de infecções em lesões epiteliais, sistêmicas e endocardites, sendo que sua patogenicidade está intimamente ligada à sua constituição genética (SCHOENI; WONG, 2005; SASAHARA *et al.*, 2011; EHLING-SCHULZ; MESSELHÄUSSER, 2013).

Essa espécie abriga várias toxinas que estão associadas principalmente a dois tipos de doenças gastrointestinais, a emética e síndrome diarreica. A doença emética é causada pelo dodecadepsipeptídeo cerulide, que é produzido nos alimentos antes da ingestão (AGATA *et al.*, 1995), enquanto a doença diarreica é causada por enterotoxinas produzidas após a ingestão de bactérias viáveis ou esporos (GRANUM *et al.*, 1993; CLAVEL *et al.*, 2007). Essas enterotoxinas são a hemolisina BL de três componentes – HBL (BEECHER *et al.*, 1995), a

enterotoxina não hemolítica de três componentes – Nhe (LUND; GRANUM, 1996) e a proteína única CytK – citotoxina K (LUND *et al.*, 2000).

B. cereus é muito semelhante geneticamente à *B. thuringiensis*. A ausência de genes *cry* em *B. cereus* parece ser a principal diferença entre essas espécies (PERCHAT *et al.*, 2005). No entanto, apesar da ausência de genes codificadores de proteínas Cry em *B. cereus*, algumas estirpes dessa espécie apresentaram segregar uma exotoxina inseticida estável ao calor (KRIEG; LYSENKO, 1979; OHBA *et al.*, 1981). Entretanto, estudos realizados por Castillo-Esparza *et al.* (2021) verificaram a existência de uma proteína semelhante a Cry, em uma cepa de *B. cereus s.s.*, com 41% de identidade e, estrutura tridimensional similar a estrutura das proteínas Cry de três domínio. Todavia, os mesmos autores relataram que, embora esta cepa de *B. cereus* seja capaz de expressar uma proteína similar a Cry, a espécie bacteriana foi incapaz de produzir cristais durante a fase de esporulação, devido possivelmente à ausência do terminal C, ao qual é essencial na cristalização e expressão de várias proteínas Cry.

Existem relatos da patogenicidade de algumas cepas de *B. cereus* à insetos, por infecções naturais ou induzidas na microbiota intestinal de larvas de escaravelhos (SELVAKUMAR *et al.*, 2007), mosquitos anofelinos (CHATTERJEE *et al.*, 2010) e o besouro da farinha, *Tribolium castaneum* (KUMARI; NEELGUND, 1985).

4.2.2.1.2. *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (Bt) é uma espécie Gram-positiva, anaeróbica facultativa, com pouca mobilidade. Possui células vegetativas que ocorrem isoladamente ou em cadeia, e que possuem um comprimento variável de 1,0 a 5,0 μm . A conformação dos esporos é elipsoide, em algumas estirpes cilíndricas, sendo subterminais, paracentrais em esporângios não inchados. Dentro dos esporângios abrigam-se corpos parasporais adjacentes aos esporos, conhecidos principalmente por δ -endotoxinas, aos quais podem ser bipiramidais, cuboides, esféricos a ovoides, plano-retangular, ou de forma heteromórfica (LOGAN, DE VOS *et al.*, 2009).

Devido à sua capacidade de tolerar um amplo espectro de temperatura de crescimento, variando de 10 a 30° C e, no máximo 40 a 45° C (DE VOS *et al.*, 2009), o Bt ocupa diversos ecossistemas, como solo, rizosfera, água, grãos, poeira de silo, filoplano, cadáveres de insetos, crustáceos e anelídeos (HENDRIKSEN *et al.*, 2002; BIZZARRI *et al.*, 2008). Além de possuir alta especificidade aos seus organismos alvos, ausência de toxicidade às plantas, mamíferos e vertebrados. Além disso essa espécie não possui efeito poluente ao meio ambiente (WHITELEY *et al.*, 1986; BRAVO *et al.*, 2005).

A espécie foi identificada pela primeira vez em 1901, pelo bacteriologista japonês Shigetane Ishiwata, em larvas infectadas e mortas de *Bombyx mori*, bicho-da-seda (Lepidoptera: Bombyciidae). Devido ao nome da doença “sotto disease” Ishiwata nomeou a espécie bacteriana como *Bacillus sotto* (AOKI *et al.*, 1915; BEEGLE; YAMAMOTO, 1992). Entretanto, essa nomenclatura foi modificada para *Bacillus thuringiensis* em 1915 por Ernst Berliner, pesquisador do estado alemão de Turíngia, designação para o subnome da espécie “*thuringiensis*”, em larvas mortas de *Ephestia kuhniella*, traça da farinha (Lepidoptera: Pyralidae) (MILNER, 1994; FEDERICI *et al.*, 2010).

O primeiro registro de sua aplicação no controle de insetos ocorreu na Hungria no final de 1920, e na Iugoslávia no início da década de 1930, sendo usado no controle da broca do milho europeu (LORD, 2005). No entanto, o primeiro pesticida comercial à base de Bt, produzido para controlar traças da farinha foi desenvolvido em 1938 na França, sendo denominado como Sporinge (QAIM *et al.*, 2003; KLETER *et al.*, 2007).

Como importante agente biológico e/ou como componente genético em culturas transgênicas, o *B. thuringiensis* tem sido mundialmente utilizado para o controle de pragas e doenças por várias décadas, mostrando-se bastante eficiente e útil na redução do uso de inseticidas químicos, uma vez que essa espécie bacteriana é ativa contra mais de 150 espécies de pragas de insetos (JISHA *et al.*, 2013). A atividade inseticida de *B. thuringiensis* é atribuída, em grande parte, aos cristais parasporais, aos quais são formados no início do processo de esporulação. Entende-se que produção de proteínas cristalinas por Bt, no início do processo de esporulação e durante a fase de crescimento estacionária é caracterizada como um fenômeno biológico, regulado geneticamente, e sendo condicionado a um estado compensativo ao estresse físico ocasionado na bactéria, decorrente da perda de água durante a formação de esporos. Esse processo pode oferecer uma vantagem adicional de sobrevivência à bactéria, além de exercer ação letal contra insetos pragas (IBRAHIM *et al.*, 2010).

O Bt pode produzir um ou mais tipos de proteínas cristalinas parasporais, concomitantemente com a esporulação (JISHA *et al.*, 2013). As inclusões proteicas cristalinas (Cry) ou citolíticas (Cyt) isoladamente ou em combinação constituem as δ -endotoxinas (BULLA *et al.*, 1980; ASANO *et al.*, 1997; PALMA *et al.*, 2014). As proteínas Cry exibem efeito tóxico experimentalmente verificável para um organismo alvo ou têm similaridade de sequência significativa com uma proteína Cry conhecida. As proteínas Cyt exibem atividade hemolítica com semelhança de sequência óbvia com uma proteína Cyt conhecida. Além disso

essas proteínas são codificadas principalmente por genes extracromossômicos localizados nos plasmídeos. E as proteínas cristalinas liberadas durante a fase estacionária (senescência) do seu ciclo de crescimento representam 20% - 30% do peso seco das células dessa fase (AGAISSÉ; LERECLUS, 1995; JISHA *et al.*, 2013).

As δ -endotoxinas atuam como agentes de controle biológico em uma larga escala de pragas, principalmente nas ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hemiptera, além de alguns nematoides, protozoários e ácaros (PRAÇA *et al.*, 2004; BRAR *et al.*, 2006; MELATTI *et al.*, 2010). Estes cristais ao serem ingeridos pelos insetos são solubilizados no intestino médio, as toxinas são então ativadas proteoliticamente pelas proteases do intestino médio, e se ligam a receptores específicos localizados na membrana celular do mesmo, levando à ruptura celular e morte do inseto (SCHNEPF *et al.*, 1998; POLANCZYK *et al.*, 2004; BRAVO *et al.*, 2007).

Além das proteínas cristalinas, o Bt é capaz de produzir toxinas inseticidas durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria, estes são posteriormente secretados no meio de cultura e foram designados como proteínas inseticidas vegetativas (Vip) (ESTRUCH *et al.*, 1996; WARREN *et al.*, 1997) e proteína inseticida secretada (Sip) (DONOVAN *et al.* 2006). As toxinas Vip não possuem a forma de corpos de inclusão parasporais, mas são produzidas e secretadas durante a fase de crescimento vegetativo do Bt e sua expressão termina antes do início da fase de esporulação. Essas toxinas inseticidas foram caracterizadas como Vip1, Vip2, Vip3 e Vip4 e, possuem atividade entomopatogênica para insetos coleópteros e lepidópteros (PALMA *et al.*, 2014). As toxinas Sip possuem atividade inseticida contra Coleópteros como *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi* e *Diabrotica virgifera virgifera* (DONOVAN *et al.* 2006).

4.2.2.2. Grupo *Bacillus subtilis sensu lato*

A maioria das espécies amplamente exploradas para aplicações biotecnológicas são as espécies pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato* “Subtilis clade” (PÉREZ-GARCÍA *et al.*, 2011), uma vez que membros desse grupo são consideradas fábricas microbianas para produção de uma vasta gama de moléculas biologicamente ativas e potencialmente inibitórias ao crescimento de fitopatógenos (PALAZZINI *et al.*, 2016). As espécies que compõem o complexo *B. subtilis s.l* são intimamente ligadas em decorrência da análise de alinhamento pareado das sequências do gene 16S rRNA (HUTSEBAUT *et al.*, 2006). Além disso, membros desse grupo possuem características celulares semelhantes, como células vegetativas com comprimento de 0.5 a 1 μm e largura < 1 μm , móveis, esporos cilíndricos ou elipsoidais,

esporângios não inchados. Geralmente são espécies mesófilas e neutrófilas, embora algumas espécies pertencentes a este grupo sejam psicrotolerantes ou tolerantes a níveis altos de temperatura e de pH (FRITZE, 2004).

Os representantes originais desse grupo, *B. subtilis* (COHN, 1872), *B. amyloliquefaciens* (PRIEST *et al.*, 1987), *B. licheniformis* e *B. pumilus* (GORDON *et al.*, 1973) compartilham alto nível de similaridade de sequência 16S rRNA (99% ou mais) (FRITZE, 2004) e foram descobertas há mais de 40 anos. Desde então, a evolução de suas características moleculares, quimiotaconômicas e fisiológicas levou a reclassificação e descrição de novas espécies e subespécies (FAN *et al.*, 2017).

Assim, várias outras espécies foram alocadas dentro desse grupo, como *Bacillus atrophaeus* (NAKAMURA, 1989), *Bacillus mojavensis* (ROBERTS *et al.*, 1994), *Bacillus vallismortis* (ROBERTS *et al.*, 1996), *Bacillus sonorensis* (PALMISANO *et al.*, 2001), *Bacillus velezensis* (RUIZ-GARCÍA *et al.*, 2005), *Bacillus axarquiensis* (RUIZ-GARCÍA *et al.*, 2005), *Bacillus tequilensis* (GATSON *et al.*, 2006), *Bacillus aerius*, *Bacillus aerophilus*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus altitudinis* (SHIVAJI *et al.*, 2006), *Bacillus safensis* (SATOMI *et al.*, 2006), *Bacillus methylotrophicus* (MADHAIYAN *et al.*, 2010), *Bacillus siamensis* (SUMPAPAPOL *et al.*, 2010), *Bacillus xiamenensis* (LAI *et al.*, 2014), *Bacillus vanillea* (CHEN *et al.*, 2015), *Bacillus paralicheniformis* (DUNLAP *et al.*, 2015), *Bacillus glycinifermentas* (KIM *et al.*, 2015), *Bacillus oryzicola* (CHUNG *et al.*, 2015), *Bacillus gobiensis* (LIU *et al.*, 2016) e *Bacillus nakamurai* (DUNLAP *et al.*, 2016).

As bactérias do grupo *B. subtilis s.l* possuem grande relevância industrial, principalmente para a produção de substâncias químicas, como enzimas, componentes de antibióticos e/ou probióticos, na produção de substâncias antagonistas ou surfactantes, degradação dos xenobióticos, biofertilizantes, agentes de biocontrole na agricultura, além da produção de alimentos fermentados e suplementos vitamínicos (FRITZE, 2004; JEYARAM *et al.*, 2011; BORRISS, 2011).

4.2.2.2.1. *Bacillus subtilis*

Originalmente denominada como *Vibrio subtilis*, em 1835 pelo pesquisador Christian Gottfried Ehrenberg, e posteriormente renomeada para *Bacillus subtilis* por Ferdinand Cohn em 1872 (HARWOOD, 1989). *B. subtilis sensu stricto* tornou-se uma das espécies mais estudadas do gênero *Bacillus*, devido à sua competência natural para captação de DNA extracelular que facilita a modificação genética simples, e pela ocorrência de esporulação

(ERRINGTON, 2003). Os esporos dessa bactéria podem sobreviver a altas temperaturas, dessecação, UV e radiação, predação por microrganismos e macroorganismos, ou mesmo condições extremas. *B. subtilis* é ubíqua, podendo ser isolada de vários habitats, e devido a isso, essa espécie é utilizada em várias aplicações biotecnológicas, que vão desde a produção de enzimas e fermentação de alimentos até o biocontrole de plantas (ERRINGTON, 2003; KOVÁCS, 2019).

Essa espécie bacteriana é um microrganismo modelo em estudos sobre divisão celular, secreção de proteínas, motilidade superficial, desenvolvimento de biofilme, fixação à raiz de planta ou hifas fúngicas, produção de metabólitos secundários, troca de citoplasma via nanotubos intercelulares, liberação de vesícula extracelular e discriminação de parentesco (KEARNS; LOSICK, 2003; TJALSMA *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005; DUBEY; BEM-YEHUDA, 2011; VLAMKIS *et al.*, 2013; BEAUREGARD *et al.*, 2013; STEFANIC *et al.*, 2015).

Como características morfológicas, constitui-se como Gram-positiva, móvel, com esporos no formato elipsoidais a cilíndricos, situados centralmente, paracentralmente e subterminalmente em esporângios não inchados. As células vegetativas de *B. subtilis* podem ocorrer de forma isolada ou em pares, raramente em cadeias, e possuem comprimento de 0,7 a 1 µm (LOGAN, DE VOS *et al.*, 2009). As colônias de *B. subtilis* são variáveis a depender do substrato de crescimento utilizando, assim os formatos podem variar de circular a irregular, com margens lobuladas a fimbriar, com superfícies rugosas, úmidas ou mucoides. Por ser uma espécie mesófila, a temperatura ideal de crescimento é de 28 a 30 °C, com temperatura mínima de 5 a 20 °C (DE VOS *et al.*, 2009).

É uma espécie capaz de produzir diferentes metabólitos secundários na forma de lipopetídeos cíclicos, polipeptídeos, proteínas e produtos não peptídicos (VOLPON *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2015). As estirpes de *B. subtilis* possuem um sistema secretório bem desenvolvido, responsável por liberar diferentes metabólitos secundários, com ação antibiótica de largo espectro, de grande valia para a agricultura e medicina (MUKHERJ *et al.*, 2006).

4.2.2.2.2. *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens foi descrita pela primeira vez por Fukumoto, em 1943, porém foi somente em 1980 que a espécie foi validada e registrada na "Lists of Bacterial Names". Devido às semelhanças com *B. subtilis*, o *B. amyloliquefaciens* recebeu o status de subespécie, sendo classificado como *B. subtilis* subsp. *amyloliquefaciens* (GORDON *et al.*,

1973). No entanto, em 1987, *B. amyloliquefaciens* foi reconhecida como uma espécie distinta de *B. subtilis*, sendo sua separação baseada em experimentos de hibridação DNA-DNA (DDH), cujos valores foram significativamente baixos em comparação ao DNA genômico de cepas de *B. subtilis* (25%), *B. licheniformis* (13%) e *B. pumilus* (5%) (PRIEST *et al.*, 1987). Além disso, a espécie *B. amyloliquefaciens* pode ser distinguida de *B. subtilis* por possuir uma porcentagem molecular de GC% ligeiramente maior em seu DNA, sendo de 43,5 a 44,9% contra 41,5 a 43,5% (YOSHIDA *et al.* 2001).

Através da genômica comparativa e com o aumento na disponibilidade de um elevado número de sequências do genoma inteiro de diversos isolados bacterianos, tornou-se possível distinguir duas variedades de *B. amyloliquefaciens*, como *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (cepa tipo DSM7) e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (tipo cepa: FZB42) (BORRISS *et al.*, 2011). Todavia, estudos recentes demonstraram que a espécie *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* seria nada mais que um sinônimo heterotípico posterior de *B. methylotrophicus* (DUNLAP *et al.*, 2015; FAN *et al.*, 2017). E recentemente, essas duas espécies passaram a ser sinônimos heterotípicos posteriores de *Bacillus velezensis* (DUNLAP *et al.*, 2016).

As principais características da espécie bacteriana são Gram-positiva, aeróbica, com células vegetativas em cadeias, com comprimento de 0,7 a 1,0 µm. Seus esporos são elipsoidais ou cilíndricos, localizados de forma central, paracentral e subterminalmente no esporângio. O crescimento da espécie ocorre principalmente em temperaturas de 30 a 40 °C (DE VOS *et al.*, 2009).

B. amyloliquefaciens tem sido explorada como um agente não tóxico e ecologicamente correto para estimular o crescimento das plantas (CHEN *et al.*, 2007; QIAO *et al.*, 2014). Como uma das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), o *B. amyloliquefaciens* é considerado um excelente agente para exploração de biofertilizantes e biocontrole na agricultura. Essa espécie também é usada para melhorar a tolerância das plantas contra estresses bióticos e abióticos (GAMEZ *et al.*, 2019; DIMOPOULOU *et al.*, 2021; KAZEROONI *et al.*, 2021). Além disso, cepas de *B. amyloliquefaciens* podem melhorar a qualidade do solo, aumentando a disponibilidade de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio (solubilização), e ferro, pela produção de sideróforos. Essa espécie também pode secretar hormônios e compostos orgânicos voláteis (VOCs), que estão associados ao crescimento de células vegetais e desenvolvimento de raízes (LUO *et al.*, 2022). Ademais, cepas de *B. amyloliquefaciens*

possuem muitos genes dedicados a produção de uma variedade de policetídeos e lipopeptídeos, aos quais são supressores de fitopatógenos (KÜCHERT *et al.*, 2011).

Além dessas funcionalidades, *B. amyloliquefaciens* é um potente produtor de liquefação de amilase e outras enzimas extracelulares de importância industrial (FUKUMOTO, 1943), podendo ser isolado em uma ampla gama de ambientes, incluindo fermentações industriais de amilase, alimentos, solo e em tecidos vegetais (DE VOS *et al.*, 2009).

4.2.3. Gênero *Lysinibacillus*

Membros desse gênero são móveis, produtoras de esporos com formato elipsoidal ou esféricos, localizados em posição terminal de um esporângio inchado (deformado). São catalase e indol positivos e produzem H₂S. Apresentam L-lisina e ácido aspártico, como terceiro resíduo de aminoácido na peptideoglicana da parede celular, característica essa que levou a diferenciação do grupo e a criação de um novo gênero, denominado *Lysinibacillus* por Ahmed e colaboradores em 2007 (AHMED *et al.*, 2007; NAM *et al.*, 2012). Possuem células vegetativas com comprimento médio de 3,0 e 5,0 µm, colônias circulares com margens lisas e inteiras, elevação plana e coloração opaca. A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, em pH 7,5 (AHMED *et al.*, 2007).

Assim como o gênero *Bacillus*, bactérias do gênero *Lysinibacillus* são isoladas de diversos ambientes, como solo, superfícies aquáticas e alimentos fermentados (AHMED *et al.*, 2007). Existem espécies dentro do gênero que são tolerantes a altas dosagens de boro, como a espécie modelo *L. boronitolerans*, produtoras de cristal parasporal com ação entomocida a insetos da ordem Diptera, *L. sphaericus*, e produtoras de lipopeptídeos, *L. chungkukjangi*. Além disso, algumas cepas do gênero são produtoras de enzimas de interesse industrial como quitinases, proteases, lipases e celulasas extracelulares (MECHRI *et al.*, 2017; NAUREEN *et al.*, 2017).

4.2.3.1. *Lysinibacillus sphaericus*

Lysinibacillus sphaericus, anteriormente conhecida como *Bacillus sphaericus* é considerada uma espécie aeróbica, Gram-positiva, móvel, com esporos em formato esféricos, que se localizam terminalmente em esporângios inchados. O comprimento das células vegetativas da bactéria varia de 1,0 a 5,0 µm. A morfologia das colônias caracteriza-se como opaca, de aspecto liso e de superfície brilhante. Tem seu crescimento condicionado a uma faixa

de temperatura ampla, variando de 10 a 45°C, e pH que varia de 6,0 a 9,5 (DE VOS *et al.*, 2009). A conformação da parede celular de *L. sphaericus* é do tipo L-Lys-D-Asp, o que levou a transferência da espécie a um novo gênero, *Lysinibacillus* (AHMED *et al.* 2007). Ademais, essa espécie bacteriana possui a incapacidade de fermentar açúcares, exceto N-acetilglicosamina. Assim, as fontes alternativas utilizadas pela bactéria são os compostos orgânicos e aminoácidos (CLAUS; BERKELEY, 1986).

L. sphaericus é amplamente utilizada no controle biológico de mosquitos devido à sua toxicidade contra algumas larvas de culicídeos (FERREIRA *et al.*, 2014). O primeiro registro da patogenicidade da bactéria foi em 1935, em larvas de *Culiseta incidens* (Diptera: Culicidae), em que as linhagens patogênicas identificadas foram posteriormente denominadas como K e Q (KELLEN *et al.*, 1965). Os principais fatores de toxicidade de *L. sphaericus* são as toxinas binárias (Bin), toxinas Mtx e proteína de camada S (ROJAS-PINZÓN; DUSSÁN, 2017).

A toxina Bin é produzida nos últimos estágios da esporulação (TANGSONGCHAROEN *et al.*, 2015) e é a proteína mais tóxica de *L. sphaericus* até agora conhecida. Essa toxina compreende duas subunidades de 42 kDa (BinA) e 51 kDa (BinB) (BROADWELL *et al.*, 1990; BAUMANN *et al.*, 1991). Assim, após a ingestão dos cristais proteicos pelas larvas, a toxina é solubilizada (pH alcalino) e ligada a um receptor específico presente no epitélio intestinal do inseto, onde posteriormente ocorre efeitos citopatológicos (BAUMANN *et al.*, 1985; BROADWELL; BAUMANN, 1987; BAUMANN *et al.*, 1988; BROADWELL *et al.*, 1990). O modo de ação dessa proteína tóxica é bem conhecido para *Culex quinquefasciatus* (COKMUS *et al.*, 1997; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003) e *Anopheles gambiae* (OPOTA *et al.*, 2008), no entanto *Aedes aegypti* é resistente a essa proteína (FERREIRA *et al.*, 2010).

As toxinas Mtx (1,2 e 3), a proteína da camada S e a esfaericolisina são produzidas nas células vegetativas. No entanto, as toxinas Mtx são degradadas por proteases na fase logarítmica tardia (THANABALU; PORTER, 1995). Todavia, essas toxinas são extremamente importantes, uma vez que a Mtx1 e Mtx2 são capazes de atuar em sinergismo com a toxina Bin contra larvas de *Ae. aegypti* (WIRTH *et al.*, 2007; RUNGROD *et al.*, 2009). Separadamente, a proteína da camada S é uma matriz paracristalina que está localizada na célula vegetativa ou dentro do esporo (PEÑA *et al.*, 2006). Além de sua função na manutenção da forma das células vegetativas, essa proteína purificada apresenta atividade entomopatogênica contra larvas de *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti* (LOZANO *et al.*, 2011; ALLIEVI *et al.*, 2014).

Além da toxicidade a mosquitos, algumas cepas de *L. sphaericus* apresentaram atividade entomocida contra outras espécies, como o nematoide *Trichostrongylus colubriformis* (BONE; TINELLI, 1987), camarão-da-terra *Palaemonetes pugio* (KEY; SCOTT, 1992), larvas de *Chironomus riparius* (PARTRIDGE; BERRY, 2002), barata alemã *Blattella germanica* e na lagarta *Spodoptera litura* (NISHIWAKI *et al.*, 2007). Ademais, muitas cepas de *L. sphaericus* produzem bacteriocinas, antibióticos proteicos que são eficazes contra outras cepas da mesma espécie (COKMUS; YOUSTEN, 1993).

Entretanto, é importante ressaltar que nem todas as cepas de *L. sphaericus* são patogênicas a insetos (MONNERAT *et al.*, 2004) e nem todas são tóxicas a mosquitos (GÓMEZ-GAZÓN *et al.*, 2016).

4.2.4. Gênero *Priestia*

O gênero *Bacillus* há muito é reconhecido como uma anomalia taxonômica e filogenética, uma vez que diferentes membros pertencentes ao gênero exibem extensa polifilia, ou seja, não compartilham um ancestral comum entre todos os indivíduos, e compartilham muito pouco em comum uns com os outros (LOGAN *et al.*, 2009; BHANDARI *et al.*, 2013). Assim, estudos revelam que grande parte dessas espécies que atualmente fazem parte do gênero *Bacillus* precisam ser reclassificadas em outros gêneros para alcançar coerência filogenética e taxonômica (ASH *et al.* 1991; LOGAN *et al.*, 2009; BHANDARI *et al.*, 2013).

Desse modo, em 2020, Gupta e colaboradores observaram que muitas espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*, além dos clados “*Subtilis* e *Cereus*”, constituíam um total de 17 novos clados baseados em inserções e deleções (indels) de assinatura conservados (CSIs). As CSIs em genes/proteínas são compartilhadas exclusivamente por um grupo de organismos evolutivamente relacionados, e fornecem uma importante classe de marcadores moleculares para estudos evolutivos e taxonômicos (GUPTA, 2014; ADEOLU *et al.*, 2016; GUPTA; PATEL, 2019; PATEL; GUPTA, 2018, 2020). Além disso, os CSIs em sequências de genes/proteínas resultam de raras alterações genéticas, essa mudança genética deu origem ao CSI em um ancestral comum, do grupo indicado, e que posteriormente foi herdado pelos outros membros do grupo (BALDAUF; PALMER, 1993; NAUSHAD *et al.*, 2014).

Assim, Gupta *et al.* (2020) após realizarem análises filogenômicas e análises comparativas propuseram que esses clados fossem reconhecidos como novos gêneros, e a partir de então, o novo gênero *Priestia* foi proposto e criado, devido a dez espécies possuírem e compartilharem duas inserções e deleções de assinaturas conservadas (CSIs), nas proteínas

oligoribonuclease NrnB ou cAMP/cGMP fosfodiesterase, proteínas da superfamília DHH, que as diferiam das outras espécies de *Bacillus*. As espécies reclassificadas foram *Priestia megaterium* (*Bacillus megaterium*), *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*), *Priestia abyssalis* (*B. abyssalis*), *Priestia endophyticus* (*B. endophyticus*), *Priestia filamentosus* (*B. filamentosus*), *Priestia flexus* (*B. flexus*), *Priestia koreensis* (*B. koreensis*), *Priestia paraflexus* (*B. paraflexus*), *Priestia qingshengii* (*B. qingshengii*), *Priestia taiwanensis* (*B. taiwanensis*) (GUPTA *et al.*, 2020).

A espécie modelo *Priestia megaterium* (*B. megaterium*) é uma espécie Gram-positiva, aeróbica, com células vegetativas grandes e móveis, com comprimento de 1,2 – 1,5 µm. Esporos elipsoidais, as vezes esféricos, localizados centralmente ou paracentralmente nos esporângios. A temperatura de crescimento varia de 3 a 45 ° C, e acima de 10% de NaCl nenhuma cepa da espécie cresce. O Teor de DNA GC% varia de 37 a 38%. Essa espécie fornece uma poderosa fábrica de células para biotecnologia, com inúmeras patentes e aplicações industriais. Além disso, essa bactéria serve como organismo modelo para estudos genéticos e produção de proteínas recombinantes (VARY, 1992; 1994). *Priestia megaterium* também é considerada uma excelente bactéria rizosférica solubilizadora de fosfato (SAEID *et al.*, 2018).

Priestia aryabhatai (*B. aryabhatai*) é considerada por alguns autores como sendo um sinônimo heterotípico posterior de *B. megaterium* (*Priestia megaterium*), uma vez que essas espécies compartilham características morfológicas semelhantes, e identidades de ANIb e ANIm próximas de 95,73% e 95,49% (RAO *et al.*, 2019; BACH *et al.*, 2022). Além disso, estudos recentes constataram que *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*) é um excelente bioinoculante, uma vez que a bactéria pode induzir resistência de espécies vegetais à estresses abióticos, como a seca (MAY *et al.*, 2019).

4.2.5. Família Paenibacillaceae

A família Paenibacillaceae está distribuída entre dois agrupamentos filogenéticos. *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella* e *Thermobacillus* são monofiléticos e representam o primeiro grupo. O segundo grupo também de monofiléticos compreende os gêneros *Aneurinibacillus*, *Ammoniphilus* e *Oxalophagus*. Membros dessa família possuem células vegetativas retas e curvas, geralmente com comprimento de 0,5- 1,0 x 2-6 µm. Além disso, são Gram-positivas, com ácido mesodiaminopimílico na composição da parede, porém existem espécies Gram-negativas ou Gram-variáveis. Os endósporos são ovais ou elipsoidais,

localizados centralmente ou paracentralmente em esporângios inchados. Existe motilidade com flagelação peritríquida, porém algumas espécies podem ser imóveis. São aeróbios, microaerófilos, aeróbios facultativos ou anaeróbios obrigatórios. Algumas espécies Paenibacillaceae utilizam apenas o ácido oxálico como fonte de carbono e energia, no entanto, a maioria é organoheterotrófica, utilizando meios complexos, como carboidratos e aminoácidos para o seu crescimento. São bactérias mesofílicas, termofílicas, neutrofílicas e alcalifílicas. E podem ser isoladas de solo, raízes, fezes, sangue e outras fontes. O teor de DNA GC% varia de 36-59% (DE VOS *et al.*, 2009).

4.2.5.1. *Brevibacillus laterosporus*

A espécie *Brevibacillus laterosporus* Laubach, anteriormente classificada como *Bacillus laterosporus* (LAUBACH, 1916) é uma bactéria com células vegetativas arredondadas, que ocorrem isoladamente, em pares e/ou em cadeias, com comprimento de 0,5-0,9 µm e largura de 2-5 µm. Os esporos são elipsoidais e são posicionados centralmente, paracentralmente e subterminalmente em esporângios levemente inchados. Crescem em uma faixa de temperatura de 15 e 50 °C, porém com ótimo crescimento em 30 °C. Tem seu crescimento inibido a 5% de NaCl, com pH ideal de 7,0. (LOGAN; DE VOS *et al.*, 2009).

Essa espécie é formadora de endósporos, e caracteriza-se pela produção de uma inclusão parasporal lamelar em formato de canoa (CSPB), firme e adjacente à lateral do esporo (Figura 3). Além disso, algumas cepas de *Brevibacillus laterosporus* produzem inclusões cristalinas de diferentes formas e tamanhos, liberadas durante a lise celular do esporângio (OLIVEIRA *et al.*, 2004)

É uma bactéria onipresente que foi isolada de ampla gama de materiais, incluindo solo, pedras, água doce e salgada, corpos de insetos, folhas, compostos, leite, queijo, mel, alimentos, couro e lã de animais, entre outros (WHITE, 1912; LAUBACH, 1916, OLIVERIA *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2006; DE VOS *et al.*, 2009, RUIU, 2013).

O potencial de biocontrole dessa espécie tem sido relatado contra insetos de diferentes ordens, incluindo Coleoptera, Lepidoptera e Diptera, além de nematoides e moluscos (RUIU, 2013). Possuem atividade entomocida comprovada para larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (ORLOVA *et al.*, 1998), porém outros estudos indicam que esta atividade larvicida é 1000 vezes menor do que a estirpe padrão de *Bacillus thuringiensis var. israelenses* (FAVRET; YOUSTEN, 1985; RIVERS *et al.*, 1991). Possui também ação entomopatogênica a larvas e

adultos de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) (PEREIRA *et al.*, 2018), larvas de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) (FERREIRA *et al.*, 2016).

Brevibacillus laterosporus também possui atividades antifúngicas, associadas à produção de peptídeos antimicrobianos (IDRIS *et al.*, 2008). Também atua eficientemente na promoção de crescimento das plantas, como no caso de hortaliças (ZHANG *et al.*, 2001; YOBO *et al.*, 2004).

4.3. CARACTERIZAÇÃO BACTERIANA

Compreende-se que as bactérias podem fornecer repostas para os diversos problemas mundiais, como em alimentação, meio ambiente e saúde pública (POINTING; HYDE, 2001). Além disso, diversas espécies de bactérias são importantes e benéficas aos ecossistemas, a saúde humana, e a agricultura e meio ambiente, sendo ferramentas essenciais na composição de múltiplos produtos industriais, como por exemplo os produtos biológicos destinados a agricultura (SMITH, 2003; SETTE, 2005).

Assim, para que haja uma produção responsável de moléculas industrialmente importantes destinadas a biofertilização de solos agrícolas e biocontrole de insetos e fitopatógenos, a identificação, a caracterização e classificação de cepas e espécies bacterianas devem ser feitas de forma adequada e precisa (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011), a fim garantir a qualidade do produto, evitando possíveis patógenos oportunistas que reduziriam a eficácia do bioinsumo e/ou causaria infecções graves a saúde humana e animal (CROPLIFE, 2022).

Dessa forma, a caracterização tem por intuito encontrar um sistema de classificação eficaz e adequado, que agregue as informações de dados fenotípicos aos dados moleculares, com fins de alcançar uma classificação com sentido biológico (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011).

4.3.1. Caracterização fenotípica clássica: morfológica e bioquímica

No século 20, o estudo sobre as bactérias evoluiu de simples observações microscópicas para o estudo detalhado da estrutura e fisiologia celular. Além de fornecer o primeiro indício sobre a biologia molecular da bactéria, esses estudos permitiram a caracterização de qualquer cultura bacteriana utilizando-se de uma série de teste bioquímicos, fisiológicos e morfológicos (DE VOS *et al.*, 2009).

A caracterização morfológica e citomorfológica das espécies bacterianas fornece um vislumbre inicial sobre os aspectos da cultura, como composição da parede (coloração de Gram), inclusões citoplasmáticas, mobilidade, descrições de diâmetro, forma, elevação, textura da superfície, cor, consistência e forma de adesão das colônias. Também pode apresentar características microscópicas da bactéria, como o formato dos esporos (esféricos, elípticos, cilíndricos e, ovalados), a localização do mesmo (central, subterminal, terminal ou lateral), e o tamanho das células vegetativas (DE VOS *et al.*, 2009; RABINOVITCH *et al.*, 2017). No entanto, métodos fenotípicos são condicionados a expressão gênica, em que o mesmo organismo pode apresentar caracteres fenotípicos distintos de acordo com as variações de cultivo ou das condições ambientais. Portanto, a identificação fenotípica tradicional, baseada somente na caracterização morfológica é complexa, lenta e imprevisível (STAGER; DAVIS, 1992).

As caracterizações bioquímicas envolvem dados sobre o crescimento da bactéria em diferentes temperaturas, valores de pH, concentrações de sal, crescimento na presença de várias substâncias, como agentes antimicrobianos e dados sobre a presença ou atividade de várias enzimas, metabolização e solubilização de compostos, e ensaios de virulência (TINDALL *et al.*, 2010; HUSSAIN *et al.*, 2013). Esses métodos possuem abordagens de identificação relativamente simples, práticas e funcionais. Testes de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados bacterianos, por exemplo, são importantes provas bioquímicas para isolar, selecionar, erradicar ou limitar o crescimento de uma estirpe (SEJAS *et al.*, 2003; TOLEDO, 2011, FOX, 2016). De fato, os testes bioquímicos clássicos são uma ferramenta muito útil e que fornece detalhes inestimáveis sobre a função e a ecologia bacteriana, porém alguns desses testes são difíceis de padronizar entre os laboratórios e só podem ser realizados em bactérias com crescimento em condições normais, sem muita exigência (MAUGHAN; VAN DER AUWERA, 2011).

Assim, os métodos de caracterização fenotípica usados para identificar uma espécie ou uma nova espécie devem ser sempre padronizados, uma vez que os resultados dos testes fenotípicos podem variar com a metodologia (LI *et al.*, 2016). E, combinar os métodos de identificação, bioquímico e morfológico, possibilitam a identificação correta do microrganismo.

4.3.2. Caracterização bioquímica: Espectrometria de Massa – MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa é uma técnica analítica desenvolvida para analisar a relação massa e carga (m/z) de diferentes tipos de compostos químicos (CARBONNELLE *et al.*, 2010; SINGHAL *et al.*, 2015). Uma das maiores vantagens desse método para identificação bacteriana é o curto tempo de execução e obtenção de resultados, que pode ser reduzido de 24 a 48 horas para menos de uma hora, quando comparados aos demais testes fenotípicos (BIZZINI *et al.*, 2011).

É o método mais amplamente utilizado até o momento para a análise de biomoléculas. A espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) baseia-se na ionização de um material cocristalizado por pulsos de laser curtos, que convertem os constituintes das bactérias, principalmente as proteínas ribossomais, em íons de fase gasosa. Esses íons formados são acelerados e impulsionados por um campo eletromagnético dentro de um tubo a vácuo (Time-of-flight-TOF). Por meio de um detector acoplado no equipamento, os íons gerados são detectados, separados e identificados de acordo com sua relação massa/carga (WIESER *et al.*, 2012). Assim, esse método detecta a razão massa e carga (m/z) de um bioanalítico, fornecendo espectros em minutos.

Através dos espectros adquiridos, o MALDI-TOF-MS fornece uma impressão digital das amostras microbiológicas analisadas. Cada microrganismo possui uma impressão bioquímica exclusiva, contudo, uma mesma espécie pode apresentar espectros de massa divergentes entre si. Isto ocorre devido ao protocolo de extração de proteína adotado ou pelas diferentes condições de crescimento submetidas ao organismo antes da análise (CARBONNELLE *et al.*, 2011).

Assim, o microrganismo é identificado e seu padrão espectral é comparado ao um banco de dados de referência. Usualmente, para a identificação destes microrganismos são usados bancos de dados, como o software Biotyper (Brucker Daltonics) e o Spectral Archive and Microbial Identification System (SARAMIS – AnagnosTec GmbH) (WIESER *et al.*, 2012).

4.3.3. Caracterização Molecular

Nas últimas duas décadas, as abordagens moleculares independentes de cultura passaram por um desenvolvimento considerável na ecologia microbiana. As técnicas desenvolvidas melhoraram muito a compreensão da composição, dinâmica e atividade dos microrganismos (WILMES; BOND, 2009). Assim, os métodos moleculares foram essenciais na taxonomia microbiana, devido ao alto nível de confiabilidade em seus resultados, seja por

hibridização DNA-DNA para delimitação de espécies e suas similaridades, e/ou por sequência do gene 16S rRNA para determinação da distância genética entre as estirpes (WAYNE *et al.*, 1987, STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994).

4.3.3.1. Real Time – PCR

Uma tecnologia eficiente aplicada na identificação de bactérias é a reação em cadeia da polimerase – PCR (REIS *et al.*, 2002). Esse método é utilizado predominantemente para detectar, identificar e quantificar patógenos ou populações microbianas benéficas (MASCO *et al.*, 2007; MALORNY *et al.*, 2008; LE DRÉAN *et al.*, 2010). Em comparação com os métodos baseados em cultura, a PCR é mais rápida, mais sensível e mais específica, permitindo a detecção de populações subdominantes, mesmo na ausência de um meio de enriquecimento seletivo e na presença de outras populações dominantes. Além disso, o isolamento de ácidos nucleicos e a preparação da qPCR podem ser automatizados e realizados de forma prática e rápida, e dependendo do sistema de detecção, a técnica molecular pode ser relativamente barata e adequada para análises de rotina. Nesse método também há redução no risco de contaminações, uma vez que não é necessário realizar quaisquer manipulações pós-amplificações no produto (POSTOLLEC *et al.*, 2011).

4.3.3.2. Sequenciamento Genético

O sequenciamento genético teve um impacto profundo no avanço da biologia molecular. Nos últimos 30 anos, esse método tem sido utilizado para identificar centenas ou milhares de espécies, uma vez que foi considerado uma técnica relativamente barata, totalmente reprodutível entre laboratórios, e não requerente de cultura da bactéria. Ademais, esse método também auxilia no mapeamento das vias evolutivas de comunidades microbianas inteiras (SHARMA; SATYANARAYANA, 2013).

O sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing* ou NGS) revolucionou a genética microbiana, uma vez que essa ferramenta permitiu a análise simultânea de diferentes regiões genômicas (METZKER, 2010; GOLDSTEIN *et al.*, 2013). Caracterizado como um sequenciamento automatizado, paralelo e de alto rendimento, o NGS pode ser usado para construir um novo genoma de um organismo desconhecido; avaliar a variação genética de um organismo contra um genoma de referência existente; analisar globalmente a transcrição de um organismo ou célula a partir do DNA complementar; estudar epigenoma e mecanismos

regulatórios de um organismo e, investigar a diversidade microbiana de amostras ambientais a partir de amostras ambientais não cultiváveis (PARK; KIM, 2016). Em resumo, o NGS pode ser aplicado em grandes áreas, como expressão gênica, biologia do RNA, regulação do genoma, sequenciamento do genoma, organização do genoma, transcrição, replicação, tradução e outras, sendo esses os motivos que possibilitaram a diminuição dos custos de sequenciamento (REUTER *et al.*, 2016; VAN NIMWEGEN *et al.*, 2016).

Além disso, o NGS juntamente com a bioinformática possibilitou a concretização da análise genômica comparativa, que auxiliou na compreensão acerca das funcionalidades comuns e específicas que cada organismo possui. Desse modo, a genômica comparativa teve como base a detecção de similaridades e diferenças entre genomas completos; a identificação de genes ou grupos de genes envolvidos em diversas funções, como por exemplo na produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica, antibacteriana e inseticida; identificação de genes ou grupo de genes responsáveis por características fenotípicas exclusivas a um genoma particular; identificação de genes homólogos; e inferência de relações filogenéticas entre os organismos (VIANA, 2006).

4.4. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

A aplicação de microrganismos como agentes de biocontrole e biofertilizantes tem sido reconhecida e recomendada como sendo uma estratégia para manter a produtividade agrícola segura e sustentável, reduzindo assim a aplicação excessiva de fertilizantes e inseticidas químicos no meio ambiente (SHARMA *et al.*, 2020, PIRTTILÄ *et al.*, 2021).

Devido à alta diversidade ecológica, fenotípica e genotípica, as bactérias formadoras de esporos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* veem sendo amplamente exploradas como agentes de biocontrole e biofertilizantes na agricultura. Essas bactérias possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, substâncias antagônicas estruturalmente diferentes e corpos de inclusões proteicas com atividade entomocida contra pragas e doenças (FIRA *et al.*, 2018).

No controle biológico de pragas, o gênero *Bacillus* é mais explorado na biotecnologia agrícola, com 85% de produtos bacterianos registrados, devido à sua versatilidade metabólica que lhe permite realizar um biocontrole de pragas e doenças através de diversos mecanismos (ONGENA; JAQUES, 2008). Um dos mecanismos de controle biológico mais explorado no mercado de biopesticidas é a capacidade do gênero *Bacillus* em produzir δ -endotoxinas. Esse

mecanismo foi o marco no desenvolvimento do primeiro bioinseticida microbiano para o controle de lepidópteros, produzido a partir de *B. thuringiensis*. Os produtos à base de *B. thuringiensis* respondem por 75% dos biopesticidas vendidos globalmente (OLSON, 2015). Essa espécie possui a capacidade de produzir proteínas Cry (δ -endotoxinas) durante a fase de esporulação, que são capazes de ocasionar lise em células do trato digestivo de insetos suscetíveis (HÖFTE; WHITELEY, 1989; SAUKA; BENINTENDE, 2008).

Além das proteínas Cry, aos quais são tóxicas para diversas espécies de insetos, de diferentes ordens, como Lepidoptera, Hemiptera e Coleoptera, as espécies de *B. thuringiensis* possuem a capacidade de produzir outras endotoxinas e toxinas, como por exemplo, as proteínas Cyt (citólíticas), aos quais apresentam atividade entomocida a insetos da ordem Diptera (CRICKMORE *et al.*, 2021). Também, as toxinas Vips e Sips que apresentam toxicidade para pragas pertencentes às ordens Hemiptera, Coleoptera e Lepidoptera (DONOVAN *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2021).

Outra espécie que possui a capacidade de produzir cristais parasporais com ação entomopatogênica é a espécie *Lysinibacillus sphaericus*. Essa espécie possui propriedades larvicidas capazes de controlar vetores de doenças com grande importância na saúde humana, como *Culex quinquefasciatus* (COKMUS *et al.*, 1997; SILVA-FILHA; PEIXOTO, 2003), *Anopheles gambiae* (OPOTA *et al.*, 2008) e *Aedes aegypti* (FERREIRA *et al.*, 2010).

Além do controle biológico de insetos-pragas, outras espécies do gênero *Bacillus*, tais como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* destacam-se por sua implementação bem-sucedida em formulações comerciais para o controle de doenças fúngicas. Essas espécies possuem a capacidade de produzirem uma variedade de metabolitos secundários, de grande interesse biotecnológico, como iturinas, fengicinas, plipastatina, bacilomicina, surfactina, bacilisina, entre outros, que possuem ação antibacteriana e antifúngica (VILLAREAL-DELEGADO *et al.*, 2018).

Ademais, as características benéficas dessas espécies bacterianas não se limitam a apenas ao controle de pragas e doenças. Isolados pertencentes aos gêneros *Priestia* e *Bacillus* tornaram-se componentes importantes em formulações destinadas a prevenir o estresse de estímulos abióticos, como por exemplo salinidade, metais pesados e seca e, a impactar no crescimento de plantas, pelo fornecimento de nutrientes essenciais, na síntetização de fitohormônios, e na quelação de ferro, sideróforos e enzimas, aos quais são importantes na defesa da planta contra o ataque de patógenos (SHAHID *et al.*, 2022).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAISSE, H.; LERECLUS, D. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 21, p. 6027-6032, 1995.

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, 2016.

AGATA, N.; OHTA, M.; MORI, M.; ISOBE, M. A novel dodecadeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. **FEMS microbiology letters**, v. 129, n. 1, p. 17-19, 1995.

AHMED, I.; YOKOTA, A.; YAMAZOE, A.; FUJIWARA, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 1117-1125, 2007.

ALLIEVI, M. C.; PALOMINO, M. M.; PRADO ACOSTA, M.; LANATI, L.; RUZAL, S. M.; SÁNCHEZ-RIVAS, C. Contribution of S-layer proteins to the mosquitocidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111114, 2014.

ÂNGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T., & CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

AOKI, K. Uber Die Pathogenität der sog. Sotto-Bacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen. **Mitt. med. Fak. Kais. Univ. Tokyo**, v. 13, p. 419-440, 1915.

ASANO, S. I.; NUKUMIZU, Y.; BANDO, H.; IIZUKA, T.; YAMAMOTO, T. Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1054-1057, 1997.

ASH, C.; FARROW, J. A. E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M. D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 202-206, 1991.

BACH, E.; RANGEL, C. P.; RIBEIRO, I. D. A.; PASSAGLIA, L. M. P. Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 1-17, 2022.

BALDAUF, S. L.; PALMER, J. D. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 24, p. 11558-11562, 1993.

BAUMANN, L. I. N. D. A.; BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. A. U. L. Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. **Journal of bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2045-2050, 1988.

BAUMANN, L.; BAUMANN, P. Effects of components of the *Bacillus sphaericus* toxin on mosquito larvae and mosquito-derived tissue culture-grown cells. **Current Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 51-57, 1991.

BAUMANN, P. A. U. L.; CLARK, M. A.; BAUMANN, L. I. N. D. A.; BROADWELL, A. H. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 55, n. 3, p. 425-436, 1991.

BAUMANN, P.; UNTERMAN, B. M.; BAUMANN, L.; BROADWELL, A. H.; ABBENE, S. J.; BOWDITCH, R. D. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 163, n. 2, p. 738-747, 1985.

BEAUREGARD, P. B.; CHAI, Y.; VLAMAKIS, H.; LOSICK, R.; KOLTER, R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. E1621-E1630, 2013.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and immunity**, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, 1995.

BEEGLE, C. C.; YAMAMOTO, T. Invitation paper (CP Alexander Fund): history of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. **The Canadian Entomologist**, v. 124, n. 4, p. 587-616, 1992.

BHANDARI, V.; AHMOD, N. Z.; SHAH, H. N.; GUPTA, R. S. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt_7, p. 2712-2726, 2013.

BIZZARRI, M. F.; BISHOP, A. H. The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 1, p. 133-139, 2008.

BIZZINI, A.; JATON, K.; ROMO, D.; BILLE, J.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 2, p. 693-696, 2011.

BONE, L. W.; TINELLI, R. *Trichostrongylus colubriformis*: larvicidal activity of toxic extracts from *Bacillus sphaericus* (strain 1593) spores. **Experimental parasitology**, v. 64, n. 3, p. 514-516, 1987.

BORRIS, R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: **Bacteria in agrobiolgy: Plant growth responses**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 41-76.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; VALÉRO J. R. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*, New York, v. 41, n. 2, p. 323-342, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Mercado de bio defensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano**. Brasília, DF, 2019b. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/feffmercado-de-bio defensivos-cresce-em-mais-de-50no-brasil>. Acesso em: 28 de dezembro de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Produtores rurais buscam bio insumos para reduzir custo da produção e aumentar rentabilidade**. Brasília, 2019a. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/produtores-rurais-buscam-bio insumospara-reduzir-custo-da-producao-e-aumentar-rentabilidade> . Acesso em: 28 de dezembro de 2019.

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. ***Bacillus thuringiensis* Mechanisms And Use**. In: Gilbert, L.I.; Iatrou, K.; Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, v. 6, Elsevier, New York, Ny, Usa. 2005, p. 175-206.

BRAVO, A.; GILLB, S. S.; SOBERÓN, M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon**, Amsterdam, v. 49, n. 4, p. 423-435, 2007.

BROADBENT, J. R.; MCMAHON, D. J.; WELKER, D. L.; OBERG, C. J.; MOINEAU, S. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 407-423, 2003.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, L.; BAUMANN, P. The 42-and 51-kilodalton mosquitocidal proteins of *Bacillus sphaericus* 2362: construction of recombinants with enhanced expression and in vivo studies of processing and toxicity. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 5, p. 2217-2223, 1990.

BROADWELL, A. H.; BAUMANN, P. Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 53, n. 6, p. 1333-1337, 1987.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 573-606, 2000.

BULLA, L. A.; BECHTEL, D. B.; KRAMER, K. J.; SHETHNA, Y. I.; ARONSON, A. I.; FITZ-JAMES, P. C. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 147-204, 1980.

CALLEGAN, M.C.; BOOTH, M.C.; JETT, B.D.; GILMORE, M.S. Pathogenesis of grampositive bacterial endophthalmitis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3348-3356, 1999.

CAMPANINI, E. B.; DAVOLOS, C. C.; CUNHA, E. C. A.; LEMOS, M. V. F. Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. **Bragantia**, v. 71, n. 3, p. 362-369, 2012.

CARBONNELLE, E.; MESQUITA, C.; BILLE, E.; DAY, N.; DAUPHIN, B.; BERETTI, J. L.; NASSIF, X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 104-109, 2011.

CASTILLO-ESPARZA, J. F.; LUÉVANO-BORROEL, J.; IBARRA, J E. Identification and characterization of a new cry-like gene found in a *Bacillus cereus* strain. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 114, n. 11, p. 1759-1770, 2021.

CHATTERJEE, S.; GHOSH, T. S.; DAS, S. Virulence of *Bacillus cereus* as natural facultative pathogen of *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae) larvae in submerged rice-fields and shallow ponds. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 41, p. 6983-6987, 2010.

CHEMIER, J. A.; FOWLER, Z. L.; KOFFAS, M. A.; LEONARD, E. Trends in microbial synthesis of natural products and biofuels. **Advances in Enzymology: Related Areas of Molecular Biology**, v. 76, p. 151-217, 2009.

CHEN, I.; CHRISTIE, P. J.; DUBNAU, D. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. **Science**, v. 310, n. 5753, p. 1456-1460, 2005.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; EISENREICH, A.; SCHNEIDER, K.; HEINEMEYER, I.; JUNGE, H. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1007, 2007.

CHEN, Y. G.; GU, F. L.; LI, J. H.; XU, F.; HE, S. Z.; FANG, Y. M. *Bacillus vanillea* sp. nov., isolated from the cured vanilla bean. **Current Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 235-239, 2015.

CHUNG, E. J.; HOSSAIN, M. T.; KHAN, A., KIM, K. H., JEON, C. O., & CHUNG, Y. R. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. **The plant pathology journal**, v. 31, n. 2, p. 152, 2015.

CLAUS D, BERKELEY RCW. **Genus *Bacillus* Cohn 1872**. In: P.H.A. SNEATH, N.S. MAIR, M.E. SHARPE and J.G. HOLT (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, The Williams; Wilkins Co., Baltimore, 1986. p. 1105-1139.

CLAVEL, T.; CARLIN, F.; DARGAIGNARATZ, C.; LAIRON, D.; NGUYEN-THE, C.; SCHMITT, P. Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. **Journal of applied microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1568-1575, 2007.

- COHN, F. Untersuchungen über Bakterien. *Beitr. Biol. Pflanz.* Ed. 1, 1872, p. 127-224.
- COKMUS, C.; DAVIDSON, E. W.; COOPER, K. Electrophysiological Effects of *Bacillus sphaericus* Binary Toxin on Cultured Mosquito Cells. **Journal of invertebrate pathology**, v. 69, n. 3, p. 197-204, 1997.
- COKMUS, C.; YOUSTEN, A. A. Bacteriocin production by *Bacillus sphaericus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, n. 3, p. 323-325, 1993.
- COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v. 104, n. 1, p. 410-433, 1970.
- COSTA, E. L. N.; LUCHO, A. P. R.; FRITZ, L. L.; FIUZA, L. M. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n 38, p. 4-74, 2010.
- CROPLIFE. Produção on farm de insumos biológicos e seus riscos além do campo. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/riscos-da-producao-on-farm/#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20on%20farm%2C%20tamb%C3%A9m,da%20propriedade%2C%20para%20uso%20pr%C3%B3prio>. Acesso em 24 de julho de 2022.
- CRICKMORE, N.; BERRY, C.; PANNEERSELVAM, S.; MISHRA, R.; CONNOR, T. R.; BONNING, B. C. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 186, p. 107438, 2021.
- CROPLIFE. Produtos biológicos registrados. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/publicacoes/produtos-biologicos-registrados/>. Acesso em 24 de outubro de 2002.
- CROPLIFE. Descubra como os microrganismos se tornaram fontes de biotecnologia. Disponível em: <https://croplifebrasil.org/noticias/microrganismos-sao-fontes-de-tecnologia/>. Acesso em 20 de outubro de 2002.
- DE VOS, P; GARRITY, G.M; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHELEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3: **The Firmicutes**. Springer Science, Business Media, 2009.
- DIMOPOULOU, A.; THEOLOGIDIS, I.; BENAKI, D.; KOUKOUNIA, M.; ZERVAKOU, A.; TZIMA, A.; SKANDALIS, N. Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. **Mosphere**, v. 6, n. 4, p. e00376-21, 2021.
- DING, Y. Q.; WANG, J. P.; LIU, Y.; CHEN, S. F. Isolation and identification of nitrogenfixing bacilli from plant rhizosphere in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 5, p. 1271-1281, 2005.
- DONOVAN, W.P.; ENGLEMAN, J.T.; DONOVAN, J.C.; BAUM, J.A.; BUNKERS, G.J.; CHI, D.J.; CLINTON, W.P.; ENGLISH, L.; HECK, G.R.; ILAGAN, O.M.; *et al.* Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with

activity against coleopteran larvae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 4, p. 713-719, 2006.

DROBNIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

DUBEY, G. P.; BEN-YEHUDA, S. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. **Cell**, v. 144, n. 4, p. 590-600, 2011.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. Pt_7, p. 2104-2109, 2015.

DUNLAP, C. A.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P.; KIM, S. J. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 3487-3492, 2015.

DUNLAP, C. A.; SAUNDERS, L. P.; SCHISLER, D. A.; LEATHERS, T. D.; NAEEM, N.; COHAN, F. M.; ROONEY, A. P. *Bacillus nakamura* sp. nov., a black-pigment-producing strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2987-2991, 2016.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1212-1217, 2016.

EHLING-SCHULZ, M.; FRENZEL, E.; GOHAR, M. Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 704, 2015.

EHLING-SCHULZ, M.; KOEHLER, T. M.; LERECLUS, D. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 3, p. 1-60, 2019.

EHLING-SCHULZ, M.; MESSELHÄUSSER, U. *Bacillus* “next generation” diagnostics: moving from detection toward subtyping and risk-related strain profiling. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 32, p. 1-8, 2013.

ERRINGTON, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 117-126, 2003.

ESTRUCH, J.J.; WARREN, G.W.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CRAIG, J.A.; KOZIEL, M.G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRIS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

FAVRET M. E.; YOUSSTEN A. A. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 45, n. 2, p. 195-203, 1985.

FAYAD, N.; KALLASSY AWAD, M.; MAHILLON, J. Diversity of *Bacillus cereus sensu lato* mobilome. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2019.

FEDERICI, B. A.; PARK, H. W.; BIDESHI, D. K. Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control. **Open Toxinology Journal**, v. 3, n. 2, p. 83-100, 2010.

FELDHAAR, H. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. **Ecological Entomology**, v. 36, n. 5, p. 533-543, 2011.

FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; DE-MELO-NETO, O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. The orthologue to the Cpm1/Cqm1 receptor in *Aedes aegypti* is expressed as a midgut GPI-anchored α -glucosidase, which does not bind to the insecticidal binary toxin. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 40, n. 8, p. 604-610, 2010.

FERREIRA, L. M.; ROMÃO, T. P.; DO NASCIMENTO, N. A.; REZENDE, A. M.; DE-MELO-NETO; O. P.; SILVA-FILHA, M. H. N. L. Non conserved residues between Cqm1 and Aam1 mosquito α -glucosidases are critical for the capacity of Cqm1 to bind the Binary toxin from *Lysinibacillus sphaericus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 50, p. 34-42, 2014.

FERREIRA, V.; BARCELLOS, I. D. S.; CARRAMASCHI, I. N.; SANTOS-MALLET, J. R.; QUEIROZ, M. M.; ZAHNER, V. Larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), treated with *Brevibacillus laterosporus* (Laubach) spore suspensions. **Journal of invertebrate pathology**, v. 137, p. 54-57, 2016.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FOX, A. Antibiotics that affect the cell envelope. 2015. Disponível em: <https://www.microbiologybook.org/fox/antibiotics1.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1245-1248, 2004.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 19, p. 487503, 1943.

GALPERIN, M. Y. Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*. **Microbiology Spectrum**, v. 1, n. 2, p. TBS-0015-2012, 2013.

GAMEZ, R.; CARDINALE, M.; MONTES, M.; RAMIREZ, S.; SCHNELL, S.; RODRIGUEZ, F. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). **Microbiological research**, v. 220, p. 12-20, 2019.

GATSON, J. W.; BENZ, B. F.; CHANDRASEKARAN, C.; SATOMI, M.; Gibbons and Murray 1978, 5). In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Springer, New York, NY, 2009. p. 19-1317.

GOLDSTEIN, D. B.; ALLEN, A.; KEEBLER, J.; MARGULIES, E. H.; PETROU, S.; PETROVSKI, S.; SUNYAEV, S. Sequencing studies in human genetics: design and interpretation. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 7, p. 460-470, 2013.

GÓMEZ-GARZÓN, C.; HERNÁNDEZ-SANTANA, A.; DUSSÁN, J. Comparative genomics reveals *Lysinibacillus sphaericus* group comprises a novel species. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 709, 2016.

GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. N. **The genus *Bacillus***. Agricultural research service, US Department of Agriculture, 1973. 157 p.

GRANUM, P. E.; BRYNESTAD, S.; KRAMER, J. M. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. **International journal of food microbiology**, v. 17, n. 4, p. 269-279, 1993.

GUINEBRETIERE, M. H.; AUGER, S.; GALLERON, N.; CONTZEN, M.; DE SARRAU, B.; DE BUYSER, M. L.; LAMBERET, G.; FAGERLUND, A. GRANUM, P. E.; LERECLUS, D.; DE VOS P.; NGUYEN-THE, C.; SOROKIN A. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 31-40, 2013.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020.

GUPTA, R. S.; PATEL, S. Robust demarcation of the family *Caryophanaceae* (*Planococcaceae*) and its different genera including three novel genera based on phylogenomics and highly specific molecular signatures. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2821, 2020.

GUPTA, R. S. Identification of conserved indels that are useful for classification and evolutionary studies. In: **Methods in microbiology**. Academic Press, p. 153-182, 2014.

HALFELD-VIEIRA, B. D. A.; MARINHO-PRADO, J. S.; NECHET, K. D. L.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Defensivos agrícolas naturais, uso e perspectivas**. 1 ed. Brasília, 2016.

HARWOOD, C. R. *Biotechnology Handbooks 2: Bacillus*. Biotechnology handbooks. Plenum Press, New York, 1989. 424p.

HARWOOD, C. R.; MOUILLON, J. M.; POHL, S.; ARNAU, J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HENDRIKSEN, N. B.; HANSEN, B. M. Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 256-261, 2002.

HÖFTE, H.; WHITELEY, H. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 242-255, 1989.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 278-285, 1998.

HUSSAIN, T.; ROOHI, A.; MUNIR, S.; AHMED, I.; KHAN, J.; EDEL-HERMANN, V.; ANEES, M. Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 16, p. 1579-1590, 2013.

HUTSEBAUT, D.; VANDROEMME, J.; HEYRMAN, J.; DAWYNDT, P.; IBRAHIM, M. A.; GRIKO, N.; JUNKER, M.; BULLA, L. A. *Bacillus thuringiensis*, **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 1, p. 31-50, 2010.

IDRIS, HA; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. **Biological Control**, v. 45, n. 1, p. 72-84, 2008.

JACOBY, R.; PEUKERT, M.; SUCCURRO, A.; KOPRIVOVA, A.; KOPRIVA, S. THE role of soil microorganisms in plant mineral nutrition—current knowledge and future directions. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1617, 2017.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. Springer Science, New York, NY, 2005, 747p.

JEYARAM, K.; ROMI, W.; SINGH, T. A.; ADEWUMI, G. A.; BASANTI, K.; OGUNTOYINBO, F. A. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. **Journal of microbiological methods**, v. 87, n. 2, p. 161-164, 2011.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; BENJAMIN, S. An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology**, v. 3, n. 05, p. 462, 2013.

KAMAR, R.; GOHAR, M.; JÉHANNO, I.; RÉJASSE, A.; KALLASSY, M.; LERECLUS, D.; RAMARAO, N. Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 320-323, 2013.

KAYA, H. K.; VEGA, F. E. **Insect Pathology**. 2nd Ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA, 2012, 508 p.

KAZEROONI, E. A.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S.; ADHIKARI, A.; AL-SADI, A. M.; KANG, S. M.; KIM, L. R.; LEE, I. J. Rhizospheric *Bacillus amyloliquefaciens* protects *Capsicum annuum* cv. Geumsugangsan from multiple abiotic stresses via multifarious plant growth-promoting attributes. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 669693, 2021.

KEARNS, D. B.; LOSICK, R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 49, n. 3, p. 581-590, 2003.

KEY, P. B.; SCOTT, G. I. Acute toxicity of the mosquito larvicide, *Bacillus sphaericus*, to the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, and mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 49, n. 3, p. 425-430, 1992.

KELLEN, W. R.; CLARK, T. B.; LINDEGREN, J. E.; HO, B. C.; ROGOFF, M. H.; SINGER, S. *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. **Journal of invertebrate pathology**, v. 7, n. 4, p. 442-448, 1965.

KIM, S. J.; DUNLAP, C. A.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. *Bacillus glycinifermentans* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 10, p. 3586-3590, 2015.

KLETER, G. A.; BHULA, R.; BODNARUK, K.; CARAZO, E.; FELSOT, A. S.; HARRIS, C. A.; SHEVAH, Y. Altered pesticide use on transgenic crops and the associated general impact from an environmental perspective. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 63, n. 11, p. 1107-1115, 2007.

KOVÁCS, Á. T. *Bacillus subtilis*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 724-725, 2019.

KRIEG, A.; LYSSENKO, O. Toxine und Enzyme bei einigen *Bacillus*-Arten unter besonderer Berücksichtigung der *B. cereus-thuringiensis*-Gruppe. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes**, v. 134, n. 1, p. 70-88, 1979.

KUMARI, S. M.; NEELGUND, Y. F. Preliminary infectivity tests using six bacterial formulations against the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of invertebrate pathology (Print)**, v. 46, n. 2, p. 198-199, 1985.

LAI, Q.; LIU, Y.; SHAO, Z. *Bacillus xiamenensis* sp. nov., isolated from intestinal tract contents of a flathead mullet (*Mugil cephalus*). **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 1, p. 99107, 2014.

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

LAUBACH, A.C. Studies on aerobic, sporebearing, non-pathogenic bacteria. Spore bearing organism in water. **Journal of bacteriology**, v. 1, n. 5, p. 493, 1916.

LE DREAN, G.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; ARZUR, D.; HABRYLO, O.; BARBIER, G. Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. **International journal of food microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 100-107, 2010.

LECHNER, S.; MAYR, R.; FRANCIS, K. P.; PRÜSS, B. M.; KAPLAN, T.; WIESSNER-GUNKEL, E.; STEWART, G. S.; SCHERER S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1373-1382, 1998.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Cultural, physiological, and biochemical identification of actinobacteria. **Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications**, p. 87-111, 2016.

LIU, B.; LIU, G. H.; CETIN, S.; SCHUMANN, P.; PAN, Z. Z.; CHEN, Q. Q. *Bacillus gobiensis* sp. nov., isolated from a soil sample. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 379-384, 2016.

LIU, Y.; DU, J.; LAI, Q.; ZENG, R.; YE, D.; XU, J.; SHAO, Z. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 8, p. 2499-2508, 2017.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WANG, M; SUN, Y.; WANG, L.; SHAO Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific reports**, v. 5, p. 14082, 2015.

LOGAN, N. A.; BERGE, O.; BISHOP, A. H.; BUSSE, H.-J.; DE VOS, P.; FRITZE, D.; HEYNDRIKX, M.; KÄMPFER, P.; RABINOVITCH, L.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; SELDIN, L; VENTOSA, A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2114-2121, 2009.

LOGAN, N. A.; HALKET, G. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. In: LOGAN, N. A.; DE VOS, PAUL. **Endospore-forming Soil Bacteria**. Soil Biology, Springer, Berlin, Heidelberg, vol. 27, p. 1-29, 2011.

LORD, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of invertebrate pathology**, v. 89, n. 1, p. 19-29, 2005.

LOZANO, L. C.; AYALA, J. A.; DUSSÁN, J. *Lysinibacillus sphaericus* S-layer protein toxicity against *Culex quinquefasciatus*. **Biotechnology letters**, v. 33, n. 10, p. 2037-2041, 2011.

LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2000.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS microbiology letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, 1996

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

MALAIKOZHUNDAN, B.; VINODHINI, J. Biological control of the Pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* in stored grains using the entomopathogenic bacteria, *Bacillus thuringiensis*. **Microbial pathogenesis**, v. 114, p. 139-146, 2017.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S. W.; SA, T. M. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 2490-2495, 2010.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. **Microbiologia de Brock**, 14^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 960 p.

MALORNY, B.; LÖFSTRÖM, C.; WAGNER, M.; KRÄMER, N.; HOORFAR, J. Enumeration of Salmonella bacteria in food and feed samples by real-time PCR for quantitative microbial risk assessment. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1299-1304, 2008.

MANDIC-MULEC, I.; STEFANIC, P.; VAN ELSAS, J.D. Ecology of Bacillaceae. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 1, p. 59-85, 2015.

MARCHANDIN, H.; TEYSSIER, C.; CAMPOS, J.; JEAN-PIERRE, H.; ROGER, F.; GAY, B.; CARLIER, J. P.; JUMAS-BILAK E. *Negativicoccus succinicivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human clinical samples, emended description of the family Veillonellaceae and description of *Negativicutes* classis nov., *Selenomonadales* ord. nov. and *Acidaminococcaceae* fam. nov. in the bacterial phylum Firmicutes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1271-1279, 2010.

MASCO, L.; VANHOUTTE, T.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of real-time PCR targeting the 16S rRNA and recA genes for the enumeration of bifidobacteria in

probiotic products. **International journal of food microbiology**, v. 113, n. 3, p. 351-357, 2007.

MAUGHAN, H.; VAN DER AUWERA, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 789-797, 2011.

MAY, A.; MOREIRA, B. R. A.; MASCARIN, G. M.; VIANA, R. S.; SANTOS, M. S.; SILVA, E. H. F. M.; DE MELO, I. S. Induction of drought tolerance by inoculation of *Bacillus aryabhatai* on sugarcane seedlings. **Científica**, v. 47, n. 4, p. 400-410, 2019.

MECHRI, S.; KRIAA, M.; BERROUINA, M. B. E.; BENMRAD, M. O.; JAOUADI, N. Z.; REKIK, H.; JAOUADI, B. Optimized production and characterization of a detergent-stable protease from *Lysinibacillus fusiformis* C250R. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 383-397, 2017.

MELATTI, V. M.; PRAÇA, L. B.; MARTINS, E. S.; SUJII, E.; BERRY, C.; DE PONTES, R. G. M. S. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic against cotton aphid, *Aphis gossypii* glover (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 5, n. 2, p. 1-4, 2010.

MERICI, T. A.; SARAIVA, V. B.; DO CARMO, A. P. Metodologia para identificação de bactérias do solo através da manipulação de cores primárias. **Revista Internacional de Ciências**, v. 7, n. 2, p. 180-201, 2017.

MILLER, R. A.; BENO, S. M.; KENT, D. J.; CARROLL, L. M.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; KOVAC, J. *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4744, 2016.

MILNER, R. J. History of *Bacillus thuringiensis*. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 49, n. 1, p. 9-13, 1994.

MONNERAT, R.; DA SILVA, S. F.; DIAS, D. S.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; JONES, G. W.; SOARES, C. M.; DIAS, J. M. C. S.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus sphaericus* strains for high toxicity against *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. **Journal of applied entomology**, v. 128, n. 7, p. 469-473, 2004.

MUKHERJ, S.; DAS, P.; SEM, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

NAKAMURA, L. K. *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 1031-1035, 1998.

NAKAMURA, L. K. Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 295-300, 1989.

NAM, Y. D.; SEO, M. J.; LIM, S. I.; LEE, S. Y. Genome sequence of *Lysinibacillus boronitolerans* F1182, isolated from a traditional Korean fermented soybean product. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 21, 2012.

NAUSHAD, H. S.; LEE, B.; GUPTA, R. S. Conserved signature indels and signature proteins as novel tools for understanding microbial phylogeny and systematics: identification of molecular signatures that are specific for the phytopathogenic genera *Dickeya*, *Pectobacterium* and *Brenneria*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, n. Pt_2, p. 366-383, 2014.

NAUREEN, Z.; REHMAN, N. U.; HUSSAIN, H.; HUSSAIN, J.; GILANI, S. A.; AL HOUSNI, S. K.; HARRASI, A. A. Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1477, 2017.

NISHIWAKI, H.; NAKASHIMA, K.; ISHIDA, C.; KAWAMURA, T.; MATSUDA, K. Cloning, functional characterization, and mode of action of a novel insecticidal pore-forming toxin, sphaericolysin, produced by *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3404-3411, 2007.

OHBA, M.; TANTICHODOK, A.; AIZAWA, K. Production of heat-stable exotoxin by *Bacillus thuringiensis* and related bacteria. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 38, n. 1, p. 26-32, 1981.

OKINAKA, R. T.; CLOUD, K.; HAMPTON, O.; HOFFMASTER, A. R.; HILL, K. K.; KEIM, P.; MANTER, D. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6509-6515, 1999.

OLIVEIRA, E. J.; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R. G.; PASSOS, L. K. J.; ZAHNER, V. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 11, p. 6657-6664, 2004.

OLSON, S. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. **Outlooks on pest management**, v. 26, n. 5, p. 203-206, 2015.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

OPOTA, O.; CHARLES, J. F.; WAROT, S.; PAURON, D.; DARBOUX, I. Identification and characterization of the receptor for the *Bacillus sphaericus* binary toxin in the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 149, n. 3, p. 419-427, 2008.

ORLOVA M. V.; SMIRNOVA T. A.; GANUSHKINA L. A.; YACUBOVICH V. Y.; AZIZBEKYAN R. R. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 7, p. 2723-2725, 1998.

OWUSU-KWARTENG, J.; WUNI, A., AKABANDA, F.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus sensu lato* isolated from dairy farms and traditional dairy products. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

PALAZZINI, J. M.; DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; CHULZE, S. N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite *cluster* profiles. **Microbiological research**, v. 192, p. 30-36, 2016.

PALMA, L.; MUÑOZ, D.; BERRY, C.; MURILLO, J.; CABALLERO, P. *Bacillus thuringiensis* toxins: an overview of their biocidal activity. **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 3296-3325, 2014.

PARK, S. T.; KIM, J. Trends in next-generation sequencing and a new era for whole genome sequencing. **International neurourology journal**, v. 20, n. Suppl 2, p. S76, 2016.

PALMISANO, M. M.; NAKAMURA, L. K.; DUNCAN, K. E.; ISTOCK, C. A.; COHAN, F. M. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1671-1679, 2001.

PARTE, A. C. LPSN—List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825-1829, 2018.

PARTRIDGE, M. R.; BERRY, C. Insecticidal activity of the *Bacillus sphaericus* Mtx1 toxin against *Chironomus riparus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 79, n. 2, p. 135-136, 2002.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. Robust demarcation of fourteen different species groups within the genus *Streptococcus* based on genome-based phylogenies and molecular signatures. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, p. 130-151, 2018.

PATEL, S.; GUPTA, R. S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406-438, 2020.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 309-318, 2017.

PEÑA, G.; MIRANDA-RIOS, J.; DE LA RIVA, G.; PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. A. *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna*

varivestis (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 353-360, 2006.

PERALTA, C.; PALMA, L. Is the insect world overcoming the efficacy of *Bacillus thuringiensis*?. **Toxins**, v. 9, n. 1, p. 39, 2017.

PERCHAT, S.; BUISSON, C.; CHAUFFAUX, J.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; GOHAR, M. *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 90, n. 2, p. 131-133, 2005.

PEREIRA, L. D. A.; JUNQUEIRA, R. M.; CARRAMASCHI, I. N.; QUEIROZ, M. M.; ZAHNER, V. Bioactivity under laboratory conditions of *Brevibacillus laterosporus* towards larvae and adults of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 158, p. 52-54, 2018.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.

POINTING, S. B.; HYDE, K. D. Exploiting filamentous fungi. **The University of Hong Kong: Fungal Diversity Press, Hong Kong**, p. 467, 2001.

POLANCZYK, R. A.; SILVA, R. F. P. da; FIUZA, L. M. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* Berliner a partir de amostras de solo e sua patogenicidade para *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 2, p. 209-214, 2004.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

PRAÇA, L.B.; BATISTA, A.C.; MARTINS, E.S.; SIQUEIRA, C.B.; DIAS, D.G.S.; GOMES, A.C.M.M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R.G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.39, n.1, p.11-16, 2004.

PRESCOTT, H.; KLEIN'S. **Microbiology** (7^a ed.). Nova Iorque: McGraw Hill, 2008.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 69-71, 1987.

QAIM, M.; ZILBERMAN, D. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. **Science**, v. 299, n. 5608, p. 900-902, 2003.

QIAO, J. Q.; WU, H. J.; HUO, R.; GAO, X. W.; BORRIS, R. Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2014.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1º Ed. Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Fisiologia Bacteriana, 2015. 160 p.

RAO, M. P. N.; DONG, Z. Y.; LIU, G. H.; LI, L.; XIAO, M.; LI, W. J. Reclassification of *Bacillus aryabhatai* Shivaji *et al.* 2009 as a later heterotypic synonym of *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (Approved Lists 1980). **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 22, p. fnz258, 2019.

RASKO, D. A.; ALTHERR, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005. REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I.C.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002.

REIS, P. P.; ROGATTO, S. R.; KOWALSKI, L. P.; NISHIMOTO, I. N.; MONTOVANI, J. C.; CORPUS, G.; KAMEL-REID, S. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. **Oncogene**, v. 21, n. 42, p. 6480-6487, 2002.

REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-throughput sequencing technologies. **Molecular cell**, v. 58, n. 4, p. 586-597, 2015.

RIVERS D. B.; VANN C. N.; ZIMMACK H. L.; DEAN D. H. Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 58, n. 3, p. 444-447, 1991.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 256-264, 1994.

ROBERTS, M. S.; NAKAMURA, L. K.; COHAN, F. M. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 470-475, 1996.

ROJAS-PINZÓN, P. A.; DUSSÁN, J. Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 1-9, 2017.

ROY, D. K.; SINGH, G. P.; SAHAY, A.; SAHAY, D. N.; SURYANARAYANA, N. Leaf surface microflora for tasar crop improvement. **Indian Silk**, v. 45, n. 1-12, p. 19-21, 2006.

RÜCKERT, C.; BLOM, J.; CHEN, X.; REVA, O.; BORRISS, R. Genome sequence of *B. amyloliquefaciens* type strain DSM7T reveals differences to plant-associated *B. amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of biotechnology**, v. 155, n. 1, p. 78-85, 2011.

RUIU, L. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. **Insects**, v. 4, n. 3, p. 476-492, 2013.

RUIZ-GARCIA, C.; BEJAR, V.; MARTINEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; QUESADA, E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 191-195, 2005.

RUIZ-GARCIA, C.; QUESADA, E.; MARTINEZ-CHECA, F.; LLAMAS, I.; URDACI, M. RUNGROD, A.; TJAHAJA, N. K.; SOONSANGA, S.; AUDTHO, M.; PROMDONKOY, B. *Bacillus sphaericus* Mtx1 and Mtx2 toxins co-expressed in *Escherichia coli* are synergistic against *Aedes aegypti* larvae. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 4, p. 551-555, 2009.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2897, 2018.

SHAHID, M.; ZEYAD, M. T.; SYED, A.; SINGH, U. B.; MOHAMED, A.; BAHKALI, A. H.; PICHTEL, J. STRESS-Tolerant Endophytic Isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Enhanced Salt Tolerance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 17, p. 10883, 2022.

SASAHARA, T.; HAYASHI, S.; MORISAWA, Y.; SAKIHAMA, T.; YOSHIMURA, A.; HIRAI, Y. *Bacillus cereus* bacteremia outbreak due to contaminated hospital linens. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 30, n. 2, p. 219-226, 2011.

SAUKA, D. H.; BENINTENDE, G. B. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. **Revista argentina de microbiología**, v. 40, n. 2, p. 124-140, 2008.

SATOMI, M.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1735-1740, 2006.

SCHLEIFER, K. H. Phylum XIII. Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmacutes [sic] SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N. V.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 775-806, 1998.

SCHOENI, J. L.; LEE WONG, A. C. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. **Journal of food protection**, v. 68, n. 3, p. 636-648, 2005.

SEJAS, L. M. S.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; SADER, H. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n.1, p.27-35, 2003

SELVAKUMAR, G.; MOHAN, M.; SUSHIL, S. N.; KUNDU, S.; BHATT, J. C.; GUPTA, H. S. Characterization and phylogenetic analysis of an entomopathogenic *Bacillus cereus* strain WGPSB-2 (MTCC 7182) isolated from white grub, *Anomala dimidiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 525-534, 2007.

SETTE, L.D. **Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI. I** Simpósio Nacional de Coleções Científicas, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz. 2005.

SHARMA, A.; SATYANARAYANA, T. Comparative genomics of *Bacillus* species and its relevance in industrial microbiology. **Genomics insights**, v. 6, p. GEI. S12732, 2013.

SHIVAJI, S.; CHATURVEDI, P.; SURESH, K. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1-9, 2006.

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 3, p. 138-146, 2003.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.

SMITH, D. Culture collections over the world. **International Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 95-100, 2003.

SOKOLOVA, T.; HANEL, J.; ONYENWOKE, R. U.; REYSENBACH, A. L.; BANTA A.; GEYER R; GONZALEZ J. M.; WHITMAN W. B.; WIEGEL J. Novel chemolithotrophic, thermophilic, anaerobic bacteria *Thermolithobacter ferrireducens* gen. nov., sp. nov. and *Thermolithobacter carboxydivorans* sp. nov. **Extremophiles**, v. 11, n. 1, p. 145-157, 2007.

SOROKIN, I. D.; KRAVCHENKO, I. K.; TOUROVA, T. P.; KOLGANOVA, T. V.; BOULYGINA, E. S.; SOROKIN, D.YU. *Bacillus alkalidiazotrophicus* sp. nov., a Diazotrophic, Low Salt-Tolerant Alkaliphile Isolated from Mongolian Soda Soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. 10, p. 2459-2464, 2008.

STACKEBRANDT, EaBMG; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STAGER, C. E.; DAVIS, J. R. Automated systems for identification of microorganisms. **Clinical Microbiology reviews**, v. 5, n. 3, p. 302-327, 1992.

STEFANIC, P.; KRAIGHER, B.; LYONS, N. A.; KOLTER, R.; MANDIC-MULEC, I. Kin discrimination between sympatric *Bacillus subtilis* isolates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 45, p. 14042-14047, 2015.

SUMPAVAPOL, P.; TONGYONK, L.; TANASUPAWAT, S.; CHOKESAJJAWATEE, N.; LUXANANIL, P.; VISESSANGUAN, W. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 2364-2370, 2010.

TANGSONGCHAROEN, C.; CHOMANEE, N.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. **Journal of invertebrate pathology**, v. 128, p. 57-63, 2015.

TEJERA-HERNÁNDEZ, B.; ROJAS-BADÍA, M. M.; HEYDRICH-PÉREZ, M. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 42, n. 3, p. 131-138, 2011.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. Efficient expression of a 100-kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4031-4036, 1995.

THOMASHOW, L. S.; KWAK, Y. S.; WELLER, D. M. Root-associated microbes in sustainable agriculture: models, metabolites and mechanisms. **Pest management science**, v. 75, n. 9, p. 2360-2367, 2019.

TINDALL, B. J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; BUSSE, H. J.; LUDWIG, W.; KÄMPFER, P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 60, n. 1, p. 249-266, 2010.

TJALSMA, H.; ANTELMANN, H.; JONGBLOED, J. D.; BRAUN, P. G.; DARMON, E.; DORENBOS, R.; VAN DIJL, J. M. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 68, n. 2, p. 207-233, 2004.

TOLEDO, C. P. **Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola. Universidade de São Paulo. 2011.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782-7, 1990.

TURNBULL, P. C. B. **Introduction: anthrax history, disease and ecology**. In: Koehler TM (ed): *Anthrax*, Springer-Verlag, Berlin, v. 271, p. 1-19, 2002.

VALICENTE, F. H. Controle de biológico de pragas com entomopatógenos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 48 -55, 2009.

VAN NIMWEGEN, K. J.; VAN SOEST, R. A.; VELTMAN, J. A.; NELEN, M. R.; VAN DER WILT, G. J.; VISSERS, L. E.; GRUTTERS, J. P. Is the \$1000 genome as near as we think? A cost analysis of next-generation sequencing. **Clinical chemistry**, v. 62, n. 11, p. 1458-1464, 2016.

VANDENABEELE, P.; MOENS, L. Raman microspectroscopy as an identification tool within the phylogenetically homogeneous '*Bacillus subtilis*'-group. **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 8, p. 650-660, 2006.

VARY, P. Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*. **Biotechnology (Reading, Mass.)**, v. 22, p. 251-310, 1992.

VARY, P. S. Prime time for *Bacillus megaterium*. **Microbiology**, v. 140, n. 5, p. 1001-1013, 1994.

VENKATESWARAN, K.; HART, M. E. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 1475-1484, 2006.

VIDEIRA, S. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2007. 74p.

VIEIRA, L. M. R. **Classificação taxonômica de procariontes com base em sequências simuladas do gene 16S rRNA**. Dissertação – Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. 2017.

VIANA, C. J. M. Aspectos da análise comparativa. 2006. 86 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2006.

VLAMAKIS, H.; CHAI, Y.; BEAUREGARD, P.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 157-168, 2013.

VOLPON, L.; BESSON, F.; LANCELIN, J. M. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A₂. **FEBS Letters**, v. 485, n. 1, p. 76-80, 2000.

WANG, X.; LE, T. B.; LAJOIE, B. R.; DEKKER, J.; LAUB, M. T.; RUDNER, D. Z. Condensin promotes the juxtaposition of DNA flanking its loading site in *Bacillus subtilis*. **Genes and Development**, v. 29, n. 15, p. 1661-1675, 2015.

WARREN, G.W.; KOZIEL, M.G.; MULLINS, M.A.; NYE, G.J.; CARR, B.; DESAI, N.M.; KOSTICHKA, K.; DUCK, N.B.; ESTRUCH, J.J. **Auxiliary Proteins for Enhancing the Insecticidal Activity of Pesticidal Proteins**. U.S. Patent 5,770,696, 1998.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M. I.; TRUPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

WHITE, G. F. **The cause of European foulbrood**. US Dep. Agric. Bur. Entomology. 1912, 157 p.

WHITE, J. F.; KINGSLEY, K. L.; ZHANG, Q.; VERMA, R.; OBI, N., DVINSKIKH, S.; KOWALSKI, K. P. Endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest management science**, v. 75, n. 10, p. 2558-2565, 2019.

WHITELEY, H. R.; SCHNEPF, H. E. The Molecular Biology of Parasporal Crystal Body Formation In *Bacillus thuringiensis*. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 549-576, 1986.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Procariontes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 6578-6583, 1998.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 965-974, 2012.

WILMES, P.; BOND, P. L. Microbial community proteomics: elucidating the catalysts and metabolic mechanisms that drive the Earth's biogeochemical cycles. **Current opinion in microbiology**, v. 12, n. 3, p. 310-317, 2009.

WIRTH, M. C.; YANG, Y.; WALTON, W. E.; FEDERICI, B. A.; BERRY, C. Mtx toxins synergize *Bacillus sphaericus* and Cry11Aa against susceptible and insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p. 6066-6071, 2007.

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

YOBO, KS; LAING, MD; HUNTER, C. H. Effect of commercially available rhizobacteria strains on growth and production of lettuce, tomato and pepper. **South African Journal of Plant and Soil**, v. 21, n. 4, p. 230-235, 2004.

YOSHIDA, S.; HIRADATE, S.; TSUKAMOTO, T.; HATAKEDA, K.; SHIRATA, A. Antimicrobial Activity of Culture Filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 Isolated from Mulberry Leaves. **Phytopathology**. v. 9, n.2 p.181-187. 2001.

ZEIGLER, D. R.; PERKINS, J. B. The genus *Bacillus*. In: **Practical handbook of microbiology**. CRC Press, 2021. p. 249-278.

ZERVAS, A.; AGGERBECK, M. R.; ALLAGA, H.; GÜZEL, M.; HENDRIKS, M.; JONUŠKIENĖ, I.; HENDRIKSEN, N. B. Identification and characterization of 33 *Bacillus cereus sensu lato* isolates from agricultural fields from eleven widely distributed countries by whole genome sequencing. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 2028, 2020.

ZHANG, S.; REDDY, MS; KOKALIS-BURELLE, N.; WELLS, LW; NIGHTENGALE, SP; KLOEPPER, J. W. Lack of induced systemic resistance in peanut to late leaf spot disease by plant growth-promoting rhizobacteria and chemical elicitors. **Plant Disease**, v. 85, n. 8, p. 879-884, 2001.

CAPÍTULO 1 – SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO DE ESTIRPES PERTENCENTES AOS GÊNERO *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*

RESUMO

O sequenciamento de DNA tem um impacto profundo no avanço da biologia molecular. Nos últimos 30 anos, esse método tem sido utilizado para identificar centenas ou milhares de espécies e componentes simultaneamente. Além disso, sequências genômicas de microrganismos importantes fornecem perspectivas biotecnológicas para indústria, saúde humana e para o meio ambiente. O objetivo desse estudo foi identificar 21 estirpes pertencentes à Coleção de Bactéria de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por sequenciamento de nova geração (NGS). Adicionalmente, analisar o genoma das estirpes identificadas, por meio de ferramentas de bioinformática, verificando a ocorrência de genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários importantes. Os genomas foram sequenciados na Macrogen, Inc. (Seul, Coreia). A identificação das espécies foi feita pelo método ANI – *Average Nucleotide Identity* (10.1099/ijb.0.64483-0; 10.1128/genomeA.00927-14). Foi realizada uma mineração no genoma dessas estirpes a fim de detectar genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos, lipopeptídeos, antibacterianos, genes de virulência, toxinas e genes de resistência a antibióticos. Assim, foram identificadas espécies como *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. spizizenii*, *B. megaterium* (*Priestia megaterium*), *B. aryabhatai* (*Priestia aryabhatai*), *Lysinibacillus capsici* e *Brevibacillus laterosporus*. Também foram detectados genes de virulência e codificadores de sideróforos importantes como a petrobactina e bacilibactina nas espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*, além de genes codificadores de lipopeptídeos e antibacterianos, como surfactina, iturina, bacilomicina, bacilisina, fengicina e plipastatina nas cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*. Deste modo, conclui-se que o sequenciamento genético permitiu identificar uma diversidade de espécies do gênero *Bacillus*, e algumas espécies pertencentes aos gêneros *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* e *Priestia*, bem como moléculas biologicamente ativas e conservadas capazes de controlar fitopatógenos e insetos.

Palavras-chaves: Genoma; Virulência; Sideróforos; Lipopeptídeos; Identificação.

ABSTRACT

DNA sequencing has a profound impact on the advancement of molecular biology. In the last 30 years, this method has been used to identify hundreds or thousands of species and components simultaneously. Furthermore, genomic sequences of important microorganisms provide biotechnological perspectives for industry, human health, and the environment. The aim of this study was to identify 21 strains belonging to the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology by next-generation sequencing (NGS). And to analyze the genome of the identified strains, through bioinformatics tools, verifying the occurrence of genes responsible for the biosynthesis of important secondary metabolites. The genomes were sequenced at Macrogen, Inc. (Seoul, Korea). Species identification was performed using the ANI – Average Nucleotide Identity method (10.1099/ijs.0.64483-0; 10.1128/genomeA.00927-14). A genome mining of these strains was performed to detect genes responsible for the biosynthesis of siderophores, lipopeptides, antibacterial, virulence genes, toxins, and antibiotic resistance genes. Thus, species such as *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. spizizenii*, *B. megaterium* (*Priestia megaterium*), *B. aryabhatai* (*Priestia aryabhatai*), *Lysinibacillus capsici* and *Brevibacillus laterosporus*. Virulence genes and genes encoding important siderophores such as petrobactin and bacillibactin were also detected in species belonging to the *B. cereus sensu lato* group, as well as genes encoding lipopeptides and antibacterials, such as surfactin, iturin, bacillomycin, bacilisin, fengicin and plipastatin in the strains belonging to the group *B. subtilis sensu lato*. Thus, it is concluded that the genetic sequencing allowed the identification of a diversity of species of the genus *Bacillus*, and some species belonging to the genera *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* and *Priestia*, as well as biologically active and conserved molecules capable of controlling phytopathogens and insects.

Keywords: Genome; Virulence; Siderophores; Lipopeptides; Identification.

1.1.INTRODUÇÃO

A sequência genômica de bactérias pode ser obtida por técnicas de sequenciamento de alto rendimento que são capazes de gerar extensas bibliotecas de dados a partir de pequenas quantidades de DNA (KNETSCH *et al.*, 2019). Com a disponibilidade de sequências genômicas foi possível examinar as relações evolutivas entre um determinado grupo de espécies de forma mais robusta, usando várias abordagens independentes. Essas sequências também forneceram um recurso único na identificação de marcadores moleculares que são especificamente compartilhados por um grupo de organismos evolutivamente relacionados, que fornecem estratégias poderosas para a demarcação de diferentes grupos de espécies em termos moleculares confiáveis e, auxiliam na compreensão de suas inter-relações (GAO; GUTA, 2012; ADEOLU *et al.*, 2016).

Além disso, o crescimento exponencial de bancos de dados genômicos, advindos de projetos de sequenciamento, garantem uma estrutura ecológica e evolutiva mais confiável e precisa para classificar e definir adequadamente novas cepas/espécies e novos gêneros (MAUGHAN; VAN DER AUWERE, 2011).

Assim, os avanços recentes na química de sequenciamento de primeira e segunda gerações permitiram a identificação e reclassificação de várias espécies e gêneros bacterianos por meio de abordagens filogenômicas e genômicas comparativas. O gênero *Bacillus*, por exemplo, dividiu-se em 23 novos gêneros, incluindo os gêneros *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* e *Priestia* (GUPTA *et al.*, 2020).

As espécies membros desses gêneros são fenotipicamente e genotipicamente heterogêneas (PRIEST, 1993; SLEPECKY; HEMPHILL, 2006) e, devido a isso, exibem propriedades fisiológicas bastante diversas, sendo consideradas fábricas microbianas para produção de uma vasta gama de moléculas biologicamente ativas e potencialmente inibitórias para fungos, bactérias e insetos (MAAGD *et al.*, 2003; ZEIGLER; PERKINS, 2009; DUNLAP *et al.*, 2016; PALAZZINI *et al.*, 2016).

A atividade de biocontrole dessas cepas podem ser mediadas por seus metabólitos secundários, e quanto mais metabólitos a cepa produz, mais forte é a eficiência do biocontrole. Assim, sequenciar e analisar o genoma completo, bem como, minerar, por meio dos algoritmos de bioinformática, o genoma dessas espécies, tornou-se um meio eficaz e rápido para obtenção de dados genéticos, a fim de compreender definitivamente a taxonomia das mesmas e, caracterizar o potencial de metabólitos secundários presentes nesses isolados (PALAZZINI *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2018), tornando-as assim uma alternativa ecologicamente correta,

saudável e viável para mitigar o uso excessivo de fertilizantes e pesticidas na agricultura (BACH *et al.*, 2022).

1.2.OBJETIVO GERAL

Identificar 21 estirpes pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por sequenciamento de nova geração (NGS). E analisar o genoma dessas cepas, por meio da bioinformática, na busca por genes responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários importantes.

1.3.MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1. Seleção das estirpes

Foram selecionadas aleatoriamente 21 estirpes, pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CERNAGEN, pelos seguintes códigos de identificação S0043, S0953, S1438, S1338, S2536, S2538, S2566, S2777, S2781, S2784, S2785, S2786, S2787, S2788, S2791, S2794, S2795, S2796, S2893, S2894 e 2896.

1.3.2. Cultivo, preparo e purificação das estirpes

As cepas selecionadas para o sequenciamento do genoma foram provenientes de material armazenado em papel filtro e/ou liofilizado. Esses materiais, devidamente impregnados com esporos, foram inoculados em meio de cultura Embrapa-líquido a 30 °C por 72 h sob agitação contínua a 200 rpm (MONNERAT *et al.*, 2007).

Após esse período, foi realizada a microscopia óptica com contraste de fases das culturas, em aumento de 1000x, a fim de verificar a pureza das amostras, bem como a presença de esporos e cristais no meio. Atendidos esses critérios, as amostras foram destinadas a extração do DNA genômico.

1.3.3. Extração do DNA genômico

As estirpes selecionadas foram cultivadas em meio EMBRAPA-ágar por 16 h a 30 °C (MONNERAT *et al.*, 2007). Posteriormente, as colônias bacterianas foram coletadas, com

auxílio de alça bacteriológica descartável estéril de 10 µL, e transferidas para um tubo de polipropileno, onde a biomassa bacteriana foi ressuspensa em uma solução contendo 200 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA•Na₂) e 4 µL de lisozima (25 mg/mL). Em seguida, as amostras foram inoculadas em agitador orbital por 3 horas, em temperatura ambiente.

Para a extração de DNA adotou-se o seguinte protocolo: após a incubação das amostras, adicionou-se 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 300 µL de tampão de lise, sendo composto por 20 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8; 38 mL de NaCl 5 M; 500 µL de Triton X-100 e 2 mL de SDS 10%. Posteriormente, as amostras foram novamente incubadas, porém em banho-maria a 60 °C, por 10 minutos. Após o resfriamento das soluções bacterianas, realizou-se o processo de precipitação do DNA, em que consistiu na adição de 500 µL álcool etílico 100% gelado. O DNA extraído foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, e posteriormente purificado por duas lavagens com 500 µL de álcool etílico 70%, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O DNA foi diluído com TE 0,1X (1 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA•Na₂).

O DNA obtido foi quantificado pelo aparelho Quantus™ Fluorometer, usando o kit QuantiFluor® ONE dsDNA System (PROMEGA CORPORATION, 2015), de acordo com o manual do fabricante. Somente foram aceitos DNAs com valor acima de 50 ng/µl para a realização do sequenciamento. Depois de quantificado, foi verificado o grau de pureza de cada DNA com o fluorômetro Picodrop, por meio das análises das razões A260/280 e A260/230. A primeira é uma avaliação primária de pureza, onde o intervalo desejado para as amostras de DNA está entre 1.8-2.0, com razões menores que 1.7, indicando contaminação de proteínas e/ou fenol; a segunda é uma avaliação secundária de pureza, com intervalo desejado entre 1.8-2.2, com razões menores que 1.7, indicando contaminação com sal e/ou anéis de guanidina (BUSTIN, *et al.*, 2009).

1.3.4. Sequenciamento do genoma

Os genomas foram sequenciados na Macrogen, Inc. (Seul, Coréia) usando as plataformas de alto rendimento HiSeq2000 e GS-FLX Plus. As leituras (*reads*) foram montadas usando Unicycler, um pipeline de assembler baseado em SPAdes desenvolvido para genomas bacterianos (<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>) e anotados por prokka (<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>). Para verificar a qualidade da montagem, os *reads* foram mapeados de volta para *contigs* com o bowtie2, o arquivo de mapeamento foi processado com o samtools.

O genoma foi anotado com o RAST usando o esquema RASTtk. A análise funcional foi realizada usando as ferramentas incorporadas no portal do SEED. A previsão do CAZymes foi feita usando a meta dbCAN2 meta server (<https://doi.org/10.1093/nar/gky418>). A identificação das espécies foi feita com os cálculos de ANI - Average Nucleotide Identity (10.1099/ij.s.0.64483-0; 10.1128/genomeA.00927-14) (Zinina *et al.*, 2019). Valores de ANI > 95% indicam que os dois genomas pertencem à mesma espécie (GORIS *et al.*, 2007; RICHTER; ROSSELLÓ-MORA, 2009).

A identificação das espécies foi também realizada através de análise de genômica comparativa por inferências filogenéticas por ortologia, usando o programa OrthoFinder (EMMS; KELLY, 2019). Para isso, 416 espécies de *Bacillus*, gêneros correlacionados e estirpes internas sequenciadas foram incluídas no dataset. Além disso, foram utilizadas sequências completas de outras cepas de *Bacillus* e espécies correlacionadas, geralmente depositadas em bancos de dados públicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> ou <http://www.bt.nomenclature.info>).

Foi realizado ainda, por meio da bioinformática, um estudo de identidade através de BLAST para identificação dos genes de toxinas clássicas de *B. thuringiensis*, *cry*, *cyt*, *vip* e *sip*, genes de virulência característicos de *B. cereus sensu stricto*, como *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytdK*, *bceT* e *entFMm* genes de resistência a antibióticos, genes correspondentes a produção de sideróforos, genes codificadores de bacillomicina (*bmyA*, *bmyB*, *bmyD* e *bmyC*), fengicina (*fenC*, *fenD*, *fenE*, *fenA*, *fenB*), iturina (*ituD*, *ituA*, *ituB* e *ituC*), surfactina (*srfAA*, *srfAB*, *srfAC*, *srfAD*), plipastatina (*ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD*) e bacillisina (*bacA*, *bacB*, *bacC*, *bacD*, *bacE* e *bacG*).

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação dos isolados incluiu a análise do genoma completo, e a análise da região 16S do DNA ribossômico, resultando em cepas bacterianas, com 97-99% de identidade de sequência, e correspondência com espécies pertencentes ao filo Firmicutes, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales* e gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*. Especificamente as espécies encontradas foram *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. spizizenii*, *Priestia megaterium* (*B. megaterium*), *P. aryabhatai* (*B. aryabhatai*), *Lysinibacillus capsici* e *Brevibacillus laterosporus* (Figura 1).

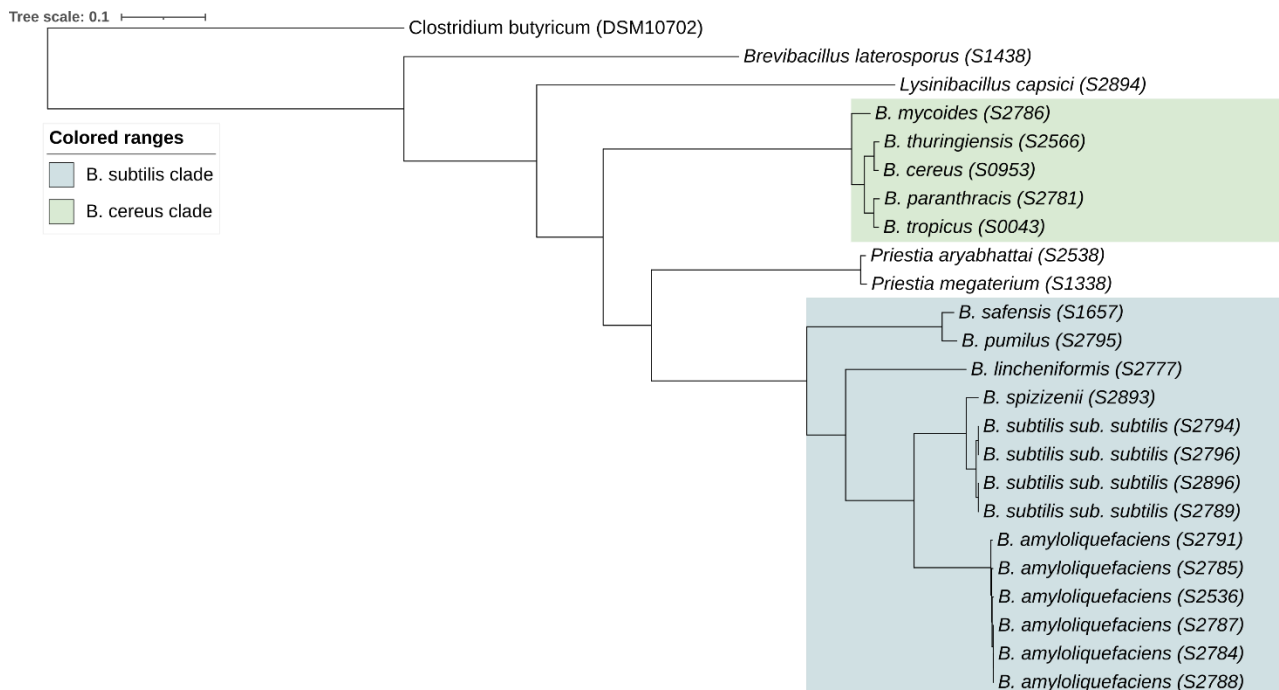


Figura 1. Árvore filogenética das 21 estirpes identificadas por análise de genômica comparativa por inferências filogenéticas por ortologia usando o programa OrthoFinder.

1.4.1. Grupo *Bacillus cereus sensu lato*

O sequenciamento do genoma completo das cepas S0953, S0043, S2566, S2781 e S2786 e a análise de genômica comparativa realizada com o programa OrthoFinder permitiu determinar com precisão que essas estirpes são pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*.

Assim, para cepa S0953 a identidade média de nucleotídeos (ANI) mostrou 98,77% de identidade com o genoma de *B. cereus* MLY1. A estirpe S2566 correspondeu a 98,70% ao genoma de *B. thuringiensis* AM65-22. A S2786 teve seu genoma equiparado a espécie *B. mycooides* ATCC 6462 em 99,99%. A ANI do isolado S0043 mostrou 99,50% de identidade com o genoma de *B. tropicus* DE0099, enquanto a cepa S2781 foi relacionada a espécie *B. paranthracis* CFSAN068816 com 99,95% de ANI.

No esboço do genoma das estirpes S0953, S0043, S2786, S2781 e S2566, os números estimados de bases foram em média de 5.680.160 pb entre as cepas. Esses *contigs* foram organizados em *scaffolds* com tamanho mínimo de 44 pb para S0953 e máximo de 223 pb para S2566 (Tabela 1). As sequências dos genomas renderam também um comprimento médio de N50 e conteúdo %GC de 469.775 pb e 35.09%. Foram encontrados por prokka o número de CDS que variou de 5.538 a 6.043, os números de mRNA, tRNAs, rRNAs e ncRNA variaram

de 5.736 a 6.251; 61 a 72; 3 a 7; 121 a 131, respectivamente. Além disso, entre essas cepas, a única a apresentar CRISPRs foi a estirpe S0953.

Tabela 1. Características gerais do genoma total de cinco isolados de *B. cereus sensu lato*. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de sequências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do *contig* mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas.

Cepas	Bases	Scaffolds	N50	mRNA	CDS	tRNA	rRNA	ncRNA	%GC	CRISPRs
S2566	6.001.841	223	79.781	6.251	6.043	72	4	131	34.98	0
S0953	5.693.527	44	926.173	5.831	5.630	70	7	123	34.92	1
S0043	5.572.290	65	624.727	5.736	5.538	72	4	121	35.08	0
S2786	5.569.407	54	406.805	5.844	5.651	61	3	128	35.20	0
S2781	5.563.737	92	311.392	5.868	5.678	61	4	124	35.28	0

1.4.1.1.Sideróforos

O esboço do genoma das cepas de *B. cereus sensu lato* permitiu detectar um complexo gênico, responsável pela produção de pequenos metabólitos secundários quelantes de Fe³⁺ denominados sideróforos (petrobactina e bacilibactina), e compostos intermediários, como ácido salicílico (AS) que são incorporados em sideróforos a base de salicilato, codificados pelos genes *pchA* e *SMO* (KRAMER *et al.*, 2020; MISHRA; BAEK, 2021), e que codificam algumas enzimas necessárias para sintetizar esses metabólitos (Tabela 2).

Entende-se que o conjunto de genes denominado *cluster* de genes biossintéticos (BGC) é responsável por codificar todas as enzimas responsáveis por sintetizar AS e sideróforos. A biossíntese de sideróforos, em si, ocorre por duas vias: a via da sintetase de peptídeos não ribossomais e sintases de policetídeos (NRPS/PKSs), e a via da sintetase do sideróforo independente de NRPS (NIS), sendo todas codificadas como BGCs no genoma microbiano (MISHRA; BAEK, 2021).

Assim, o ácido salicílico é produzido por várias bactérias como um produto extracelular quelante de Fe^{3+} , por se assimilar ao esqueleto sideróforo derivado de salicina (salicilatos), em condições com baixo teor de ferro (KRAMER *et al.*, 2020). A síntese desse composto é realizada por agrupamentos de genes biossintéticos NRPS (NRPS BGC) ou agrupamentos de genes biossintéticos híbridos NRPS/PKS (NRPS/PKS BGC) (HO *et al.*, 2018).

A maioria das bactérias produtoras de AS, principalmente *Pseudomonas* e *Bacillus spp.*, operam uma via biossintética semelhante a ICS (isocorismato sintase), em que o primeiro passo é converter o corismato em seu isômero, isocorismato, por uma enzima ICS, enquanto o próximo passo requer outra enzima, isocorismato piruvato liase (IPL) que converte o isocorismato em AS e piruvato, considerada uma enzima crucial para biossíntese de salicilato bacteriano (WILDERMUTH *et al.*, 2001).

Como precursor inicial para biossíntese de AS bacteriano, o corismato é convertido em isocorismato pela enzima *pchA* (ICS) e, posteriormente, o isocorismato é convertido em salicilato pela enzima codificada pelo gene *pchB*. Ambas as enzimas fazem parte do BGC que compreende o operon *pchDHIEFKCBA*, principalmente em espécies de *Pseudomonas* (SERINO *et al.*, 1997; MASPOLI *et al.*, 2014; RONNEBAUM; LAMB, 2018; SCHALK *et al.*, 2020). O salicilato monooxigenase (*SMO*) converte AS em catecol (1,2-dihidroxibenzeno), enzima importante para síntese de sideróforos derivados de salicila, também encontrados em espécies de *Pseudomonas* (MISHRA; BAEK, 2021).

Em todas as cepas pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* foram detectados o gene *pchA*, porém somente a estirpe S2781 (*Bacillus paranthracis*) apresentou o número de identidade na sequência DNA do gene 100% compatível com sequência nucleotídica disponível do *pchA* no banco de dados NCBI (Tabela 2). No entanto, não foram detectados os outros genes pertencentes ao operon *pchDHIEFKCBA* nessas cepas, o que poderia levar ao comprometimento da biossíntese do ácido salicílico nessas espécies, uma vez que só a presença do gene *pchA* garante a conversão do corismato em isocorismato, mas não se compromete com a conversão do isocorismato em AS, que ficará disponível para espécie bacteriana.

Verificou-se também que apenas a cepa S2781 apresentou o gene *SMO*, e não existem relatos na literatura da presença ou função desses genes em *B. paranthracis*, sendo necessários mais estudos sobre o assunto.

Também foram detectados nessas estirpes genes importantes na produção de sideróforos de catecolatos, como a petrobactina e bacillibactina (KOPPISCH *et al.*, 2005; WILSON *et al.*,

2006). A biossíntese dessas moléculas está associada a dois *operons*, *asb* (petrobactina) e *dhb* (bacillibactina) (LEE *et al.*, 2011), ambos observados nas estirpes de *B. cereus sensu lato*.

Tabela 2. Detecção dos genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos no genoma das estirpes pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*.

Sideróforos							
Cepas	Ácido Salicílico		Petrobactina				
	<i>pchA</i> **	<i>SMO</i>	<i>asbA</i>	<i>asbE</i>	<i>asbB</i>	<i>asbC</i>	<i>sbF</i>
S0043	+ (94%) *	-	+ (90%)	+ (92%)	+ (93%)	+ (96%)	+ (90%)
S0953	+ (91%)	-	+ (98%)	+ (97%)	+ (85%)	+ (93%)	+ (89%)
S2566	+ (91%)	-	+ (99%)	+ (99%)	+ (86%)	+ (92%)	+ (89%)
S2781	+ (100%)	+ (99%)	-	-	-	-	-
S2786	+ (89%)	-	+ (84%)	+ (87%)	-	+ (84%)	+ (89%)

	Bacillibactina		Enterobactina	PB	Esquizocina	
	<i>dhbB</i>	<i>dhbC</i>	<i>dhbF</i>	<i>FeuA</i>	<i>FpuA</i>	<i>YfiY</i>
S0043	+ (97%)	+ (90%)	+ (94%)	-	-	+ (92%)
S0953	+ (96%)	+ (97%)	+ (97%)	-	+ (94%)	+ (97%)
S2566	+ (99%)	+ (98%)	+ (99%)	-	+ (94%)	+ (99%)
S2781	+ (94%)	+ (90%)	+ (93%)	+ (99%)	-	+ (93%)
S2786	+ (94%)	+ (89%)	+ (91%)	-	-	+ (92%)

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado;

** *pchA* (isochorismate synthase), *SMO* (salicylate 1- monooxygenase), *asbA*, *asbE*, *asbB* (petrobactin biosynthesis protein), *asbC* (3,4-dihydroxybenzoic-acid-AMP ligase), *sbF* (xylose isomerase domain protein Tim barrel), *dhbB* (isochorismatase), *dhbC* (isochorismate synthase), *dhbF* (dimodular nonribosomal peptide synthetase), *FeuA* (enterobactin), *FpuA* (petrobactin), *YfiY* (schizokinen).

A petrobactina foi inicialmente identificada como um sideróforo presente na bactéria marinha degradadora de petróleo *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (BARBEAU *et al.*, 2002), no entanto, tempos mais tarde, esse composto foi associado a patogenicidade de *Bacillus anthracis* (KOPPISCH *et al.*, 2005) e atualmente encontra-se em várias espécies do agrupamento *B. cereus sensu lato*, como observado nesse estudo. A petrobactina é considerada um membro da família de sideróforos à base de citrato, espermidina e DHB (ferro catecolato),

um grupo de cofatores de transporte de ferro que aumenta a virulência microbiana (CENDROWSKI *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2006). Além disso, a biossíntese desse composto ocorre pela sintetase do sideróforo independente de NRPS (NIS sintases), e o *cluster* de genes responsável pela biossíntese desse composto é o *asbABCDEF*, atuantes na aquisição de ferro, na patogênese de microrganismos virulentos, e na sobrevivência da bactéria em seu hospedeiro (CENDROWSKI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007; HOTTA *et al.*, 2010).

Nas estirpes S0043, S0953 e S2566 foram encontrados os genes *asbA*, *asbB*, *asbC*, *asbE*, com identidade de sequência de 85-99%, enquanto na cepa S2786 foi detectado apenas os genes *asbA*, *asbC* e *asbE*, com identidade de sequência de 84%, 84% e 87%, respectivamente. Essas enzimas são responsáveis por catalisarem as reações chaves para biossíntese do sideróforo petrobactina.

A bacillibactina foi isolada pela primeira vez de uma cepa de *B. subtilis* (MAY *et al.*, 2001), porém com a evolução dos estudos, verificou-se que essa molécula também é produzida por todas as espécies de *Bacillus* estudadas, incluindo o grupo *B. cereus s.l.* (WILSON *et al.*, 2006; KOPPISCH *et al.*, 2008). Além disso, esse composto é considerado um sideróforo tris-catecolato, sendo sua biossíntese operada pelo *cluster* de genes *bacACBEF/dhbACEBF* (WILSON *et al.*, 2006, OVES-COSTALES *et al.*, 2008). Desse *cluster* gênico, apenas os genes *dhbB*, *dhbC* e *dhbF*, cuja identidade de sequência variou de 88% a 99% foram encontrados nas estirpes do grupo *B. cereus s.l.*

Ademais, em espécies do grupo *B. cereus sensu lato*, principalmente *B. cereus* e *B. anthracis*, a capacitação e recuperação dos complexos ferro-sideróforo do meio extracelular é facilitada por receptores específicos ligados a membrana, ou seja, proteínas de ligação ao substrato associadas à membrana (SBPs) e por transportadores ABC que atravessam a membrana (HEINRICHS *et al.*, 2004). Assim, existem diversos tipos SBPs, associadas por proteínas especializadas, como o *FpuA* (receptor ferricromo), proteína de ligação a petrobactina livre de ferro, e *FeuA*, proteína de ligação e absorção de bacillibactina férrica e enterobactina (ZAWADZKA *et al.*, 2009). O gene *FeuA* foi presente apenas na estirpe S2781 (*B. paranthracis*), com identidade de 99% com o gene descrito no NCBI. Enquanto o gene *FpuA* foi detectado nas estirpes S0953 (*B. cereus*) e S2566 (*B. thuringiensis*), com identidade de sequência de DNA de 94% em ambas as cepas.

Em resumo, embora a produção da bacillibactina não seja necessária para o crescimento das espécies de *Bacillus*, esse composto mostrou ser necessário para o crescimento dessas espécies em meios depletados de ferro (CENDROWSKI *et al.*, 2004). A petrobactina, no

entanto, está presente apenas em espécies patogênicas de *Bacillus*, e esse composto é devidamente associado a virulência dos mesmos. Deste modo, presume-se que a presença desses genes que compõem os *clusters dhb* e *asb* indicam que há uma possível patogenicidade dessas cepas contra vertebrados, mais precisamente das estirpes S2781, S0043, S0953 e S2566, cujas identidades de sequência de DNA ficaram acima de 90%.

Entretanto, independente dessa suposição é visível que essas estirpes possuem também a capacidade de adquirir ferro de fontes hospedeiras em ambientes limitados, uma vez que, o sucesso de um patógeno dentro de um hospedeiro depende de sua habilidade em adquirir ferro que, conseqüentemente, depende da capacidade termodinâmica e cinética do sideróforo em obter ferro (KOPPISCH *et al.*, 2008). Além disso, também foi encontrado no genoma dessas estirpes, o gene responsável por codificar a proteína de ligação *YfiY*, receptor da esquizocina, um sideróforo a base de citrato, que possui as finalidades de transportar e sequestrar ferro e, participar ativamente do metabólito bacteriano (FADEEV *et al.*, 2004; ZAWADZKA *et al.*, 2009).

1.4.1.2. Genes de virulência

Foram detectados no esboço dos genomas das estirpes do grupo *B. cereus sensu lato* genes codificadores de virulência, denominados enterotoxinas. Essas enterotoxinas estão presentes em espécies de *B. cereus* e são basicamente três: a hemolisina BL de três componentes (HBL), que consiste em duas proteínas líticas L1 e L2 e no componente de ligação B (BEECHER; MACMILLAN, 1990; BEECHER *et al.*, 1995), a enterotoxina não hemolítica de três componentes Nhe, que consiste nas proteínas NheA, NheB e NheC (LUND; GRANUN, 1996) e a proteína única citotoxina K (CytK), e a variante menos tóxica CytK-2, cuja estrutura de ambas estão relacionadas com toxinas formadoras de poros β -barril, além de apresentarem atividade hemolítica e citotóxica (LUND *et al.*, 2000; HARDY *et al.*, 2001; FAGERLUND *et al.*, 2004).

Nesse estudo, com exceção da cepa S2781 (*B. paranthracis*) que apresentou em seu genoma apenas o gene *nheA*, todas as outras espécies do grupo *B. cereus s.l.* possuíram os três genes que codificam o complexo enterotóxico HBL, como *hbIA*, *hbIC*, *hbID*, e dois, dos três genes que codificam a enterotoxina não hemolítica Nhe, como o *nheA* e *nheB*. O gene *cytK*, que codifica a citotoxina K necrótica foi encontrado apenas na cepa de *B. tropicus* (S0043) e na

cepa de *B. cereus* (S0953). Também, observou-se que todas as cepas apresentaram o gene *entFM* (enterotoxina putativa FM), uma peptidase de parede celular (TRAN *et al.*, 2010).

Tabela 3. Detecção de genes codificadores de virulência (enterotoxinas) no genoma das estirpes pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*.

Cepas	Enterotoxina						Enterotoxina FM
	Hemolisina BL			Não Hemolítica		Citotoxina	
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>		
S0043	+ (97%)	+ (96%)	+ (98%)	+ (95%)	+ (82%)	+ (97%)	+ (94%)
S0953	+ (97%)	+ (96%)	+ (99%)	+ (94%)	+ (82%)	+ (97%)	+ (98%)
S2566	+ (98%)	+ (96%)	+ (99%)	+ (93%)	+ (82%)	-	+ (97%)
S2781	-	-	-	+ (95%)	-	-	+ (97%)
S2786	+ (95%)	+ (92%)	+ (96%)	+ (92%)	+ (81%)	-	+ (91%)

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado;

** *hblA* (hemolysin BL-binding), *hblC* (hemolysin BL lytic component L2), *hblD* (hemolysin BL lytic component L1), *nheA* (non-hemolytic enterotoxin lytic component L2), *nheB* (non-hemolytic enterotoxin B), *cytK* (cytotoxin K) e *entFM* (enterotoxin FM).

Tendo em vista que todas as cepas desse grupo abrigam genes para três enterotoxinas conhecidas, HBL, NHE e CytK, existe o risco de que elevadas populações desses organismos em humanos possam causar doenças nos mesmos, uma vez que essas enterotoxinas causam distúrbios gastrointestinais (KIM *et al.*, 2015). No entanto, é importante ressaltar que nenhum desses genes apresentou identidade de sequência de DNA 100% compatível com os genes descritos no NCBI, havendo uma variação de 81-99%, e o gene *nheC* não foi detectado em nenhuma estirpe, o que teoricamente poderia prejudicar a maquinaria biossintética desse composto virulento.

Também, é importante ressaltar que a presença de um agrupamento gênico em uma determinada cepa, não garante que a estirpe em questão, seja capaz de produzir o metabólito secundário esperado, uma vez que, pode ocorrer silenciamento de genes e falta de conhecimento sobre as condições ambientais necessárias para ativar o *cluster* (HARWOOD *et al.*, 2018).

1.4.1.3. δ -Endotoxinas

Foi detectado na estirpe S2566, única espécie de *B. thuringiensis* identificada, genes codificadores de proteínas cristalinas parasporais (chamadas δ -endotoxinas), como *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIBb*, *cryIBj1*, *cryIDa*, *cryIFb*, *cryIJa*, *cryIKa*, *cry2Ad* e *cry3Af3*. Essas inclusões proteicas são produzidas durante o processo de esporulação da espécie bacteriana e são codificadas principalmente por genes extracromossômicos localizados nos plasmídeos (JISHA *et al.*, 2013).

Além das proteínas cristalinas, a estirpe S2566 apresentou o gene responsável por codificar a proteína inseticida vegetativa (Vip), que é secretada durante a fase de crescimento vegetativo da bactéria. Essas proteínas são referidas como proteínas inseticidas de segunda geração, e podem ser usadas sozinhas ou em complementariedade com as proteínas Cry para o controle de várias pragas (GUPTA *et al.*, 2021). Assim, foram detectados os genes *vip3Ag6*, *vip2Aa*, *vip1Ca* na cepa S2566.

As proteínas inseticidas Cry e Vip são altamente tóxicas e específicas para o seu inseto alvo, porém inofensivas a humanos, vertebrados e plantas. Ademais, de acordo com MONNERAT *et al.* (1999), JAIN *et al.* (2017) e NAIR *et al.* (2018), normalmente isolados de *Bt* que abrigam um complexo gênico de *cryIA*, *cryIIA*, *cryIB*, *cryID* e *cry2* são efetivamente ativos contra lepidópteros. As proteínas *Vip1* e *Vip2* atuam como toxinas binárias e apresentam toxicidade para pragas pertencentes às ordens Hemiptera e Coleoptera, enquanto a proteína *Vip3* possui ação inseticida contra pragas de lepidópteros (GUPTA *et al.*, 2021).

Também foi encontrado o gene *spp1Aa* que codifica a via metabólica de promoção do crescimento vegetal 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase, indolepiruvato descarboxilase, fosfatase ácida putativa e proteína de biossíntese de sideróforos (MARTINS *et al.*, 2022).

1.4.1.4. Genes de resistência a antibióticos

No esboço dos genomas das cepas do grupo *B. cereus sensu lato* também foram encontrados os genes de resistência à penicilina (*bla*), cloranfenicol (*cat*), tetraciclina (*tetV* e *MMR peptide*), ampicilina (*bla 1*, *bla 2*, *bla 3*), clindamicina (*speG*), oxacilina (*fruB*, *gmk*, *hpt*, *purB*, *prsA*, *relA*), ceftriaxona (*Metallo-beta-lactamase*), polimixina B (*phoB*), clortetraciclina (*tetA*, *tetD*, *tetC*, *TetM/TetO*), sulfametoxazol (*folP*, *dhps*), amicacina (*aac(6')*), cloxacilina monohidratada (*mecA1* e *mecA2*), eritromicina (*ermB*) e vancomicina (*vanW*, *vanRB*, *vanR*, *vanY*). O perfil de resistência a esses antimicrobianos será discutido no Capítulo 5.

1.4.2. Grupo *Bacillus subtilis sensu lato*

O sequenciamento do genoma completo das cepas S2536, S2777, S2784, S2785, S2787, S2788, S2791, S2794, S2795, S2796, S2893 e S2896 e a análise de genômica comparativa realizada com o programa OrthoFinder permitiu determinar com precisão que essas estirpes são pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*.

Deste modo, a identidade média de nucleotídeos (ANI) mostrou que as estirpes S2788 e S2785 foram 99,09% e 98,96%, respectivamente, compatíveis com o genoma da cepa *B. amyloliquefaciens* HM618. Em uma primeira análise do genoma completo contra os dados disponíveis no GenBank, a estirpe S2787 foi inicialmente identificada como sendo *B. methylotrophicus*, com 95% de ANI. Entretanto, após a realização de um refinamento e acurácia do banco de dados público e da biblioteca de sequências construída pelo Laboratório de Bioinformática foi possível determinar que a cepa S2787 correspondeu com o genoma de *B. amyloliquefaciens* HM618 em 99,07%. O mesmo foi observado com a cepa S2784, em que uma primeira análise, a estirpe em questão correspondeu em 98,03% com o genoma da estirpe *Bacillus velezensis* CBMB205, posteriormente a mesma obteve 98,41% de identidade de sequência com o genoma do isolado *Bacillus amyloliquefaciens* IT-45. Desse modo, as duas estirpes foram identificadas como espécies de *B. amyloliquefaciens*.

Sabe-se que inicialmente, a espécie de *B. amyloliquefaciens* reconhecida como uma espécie distinta em 1987 (PRIEST *et al.*, 1987) foi dividida em duas subespécies, *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (BORRISS *et al.*, 2011). No entanto, após estudos realizados por Dunlap *et al.* (2015), em que foram analisados os genomas das espécies de *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (cepa FZB42^T) e *B. methylotrophicus* (cepa KACC 13105^T) (MADHAIYAN *et al.*, 2010) constatou-se que as duas espécies compartilhavam um alto grau de similaridade genômica, ou seja, essas espécies eram semelhantes geneticamente, com pequenas variações fenotípicas. Desse modo, os autores propuseram que a reclassificação da espécie *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* como um sinônimo heterotípico posterior de *B. methylotrophicus*, devido a prioridade de nomeação dada a primeira espécie validamente descrita e publicada.

Posteriormente, Dunlap *et al.* (2016) realizou um estudo de análise comparativa dos genomas das espécies *B. methylotrophicus* KACC 13015^T, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T, *B. oryzicola* KACC 18228 e *B. velezensis* NRRL B-41580^T e constataram que essas espécies compartilhavam coerência de fenótipos e

genótipos, uma vez que as mesmas apresentavam semelhanças morfológicas, fisiológicas, quimiotaxonômicas e filogenética entre si. Desse modo, devido a regra de prioridade de nomenclatura, as espécies *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* e *B. oryicola* foram consideradas sinônimos heterotípicos posteriores de *B. velezensis*, ou seja, passaram a ser classificadas como *B. velezensis*.

As estirpes S2794, S2796 e S2896 apresentaram 98,47%, 98,42% e 99,99%, respectivamente de identidade de sequência com o isolado *B. subtilis* 168. Enquanto, a estirpe S2795 obteve um valor de ANI de 96% com a cepa *B. pumilus* SH-B9. A cepa S2777 foi correspondente em 99,99% ao genoma de *B. licheniformis* ATCC 14580, e a estirpe S2894 obteve 99,99% de identidade de sequência com a espécie *B. spizizenii*.

No esboço do genoma das estirpes foi constatado que os números estimados de bases foram em média de 4.004.119 pb. Esses *contigs* foram organizados em *scaffolds* com tamanho mínimo de 21 pb (S2796) e máximo de 127 pb (S2788). As sequências dos genomas renderam também um comprimento médio de N50 e conteúdo %GC de 402.663 pb e 44.94%, respectivamente. Foram encontrados por prokka o número de CDS que variou de 3.723 a 4.397, os números de mRNA, tRNAs, rRNAs e ncRNA variaram de 3.879 a 4.558; 52 a 81; 3 a 5; 76 a 91, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Características gerais do genoma total de 12 isolados de *B. subtilis sensu lato*. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de sequências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do *contig* mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas.

Cepas	Bases	Scaffolds	N50	mRNA	CDS	tRNA	rRNA	ncRNA	%GC	CRISPRs
S2536	3.900.554	46	296.160	3.885	3.723	81	3	77	46,45	0
S2777	4.140.688	65	100.163	4.370	4.205	77	3	84	46,18	0
S2784	3.958.137	29	508.796	4.019	3.860	77	3	78	46,31	0
S2785	4.118.578	127	56.513	4.193	4.052	54	4	82	45,92	0
S2787	3.913.627	46	144.183	3.990	3.839	68	3	79	46,29	0
S2788	3.956.622	31	357.592	4.016	3.855	79	3	78	46,31	0

Continuação...

Cepas	Bases	Scaffolds	N50	mRNA	CDS	tRNA	rRNA	ncRNA	%GC	CRISPRs
S2791	3.848.891	31	362.913	3.879	3.734	61	3	80	46,50	0
S2794	4.051.450	32	1.039.968	4.373	4.209	71	3	89	43,00	0
S2795	3.829.482	56	651.800	4.046	3.913	53	3	76	41,92	0
S2796	4.056.638	21	854.968	4.365	4.217	52	5	90	43,51	0
S2893	3.983.337	33	294.318	4.122	3.958	73	4	86	43,83	0
S2896	4.291.432	54	164.591	4.558	4.397	66	3	91	43,06	0

O esboço do genoma das estirpes pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato* também permitiu usar a bioinformática para minerar o genoma em busca de metabólitos potenciais, como compostos antimicrobianos, lipopeptídeos e sideróforos ativos e conservados por todas as cepas do grupo. Os peptídeos não ribossomais formam uma família versátil de metabólitos secundários com crescente interesse em muitos campos industriais e agrícolas, como antibióticos, sideróforos, surfactantes, pigmentos, imunossupressores ou moléculas antitumorais (WANG *et al.*, 2014).

Os lipopeptídeos (LPs) e sideróforos de *Bacillus* são sintetizados de forma não ribossomal por meio de grandes multienzimas chamadas peptídeos sintetases não ribossomais (NRPSs) (PALAZZINI *et al.*, 2016). Entre os LPs produzidos por espécies de *Bacillus*, quatro famílias principais foram distinguidas: kurstakins, surfactinas, iturinas e fengicinas/plipastatina (JACQUES, 2011). No genoma das estirpes S2536, S2784, S2785, S2787, S2788, S2791, S2794, S2796 e S2896 foram detectados *clusters* gênicos responsáveis por codificarem metabólitos secundários pertencentes às famílias das surfactinas, iturinas e fengicinas, além de um representante do grupo plipastatina (fengicina), bacilomicina, bacilisina (antibacteriano) e sideróforos responsáveis pela síntese do ácido salicílico e quelantes de Fe³⁺.

Ressalta-se que não foram encontrados nenhum *cluster* gênico ou gene isolado responsáveis pela biossíntese de lipopeptídeos e sideróforos nas estirpes S2777, S2795 e S2893.

1.4.2.1. Bacilomicina

A bacilomicina é um membro da família de lipopeptídeos iturina, sintetizado por um mecanismo não ribossomal. Esse metabólito é um heptapeptídeo interligado com ácido graxo β-amino que forma uma estrutura de anel cíclico, e possui propriedades antifúngicas,

principalmente contra fungos filamentosos (KOUMOUTSI *et al.*, 2004; CAWOY *et al.*, 2015) e alta bioatividade antimicrobiana (QIAN *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018).

O complexo gênico da bacilomicina foi encontrado apenas nas cepas de *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2784, S2785, S2788, S2787) (Tabela 5). E a análise genômica revelou que nessas espécies há três dos quatro genes da bacilomicina L sintase, como *bmyD*, *bmyA* e *bmyB*, o qual compartilharam identidade de sequência de 97-99%. No agrupamento completo dos genes da bacilomicina L sintetase, existe também o gene *bmyC*, porém o mesmo não foi detectado nas estirpes em estudo. Esse gene possui a função de ciclização e liberação de bacilomicina (SUN *et al.*, 2018), desse modo, teoricamente, a falta desse gene poderia implicar na não liberação desse composto nessas cepas.

Tabela 5. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do lipopeptídeo bacilomicina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*.

Cepas	Lipopeptídeo		
	Bacillomicina		
	<i>bmyA</i>	<i>bmyB</i>	<i>bmyD</i>
S2536	+ (98%) *	+ (97%)	+ (99%)
S2777	-	-	-
S2784	+ (98%)	+ (98%)	+ (99%)
S2785	+ (97%)	+ (98%)	+ (98%)
S2787	+ (98%)	+ (98%)	+ (99%)
S2788	+ (98%)	+ (98%)	+ (99%)
S2791	+ (98%)	+ (98%)	+ (99%)
S2794	-	-	-
S2795	-	-	-
S2796	-	-	-
S2893	-	-	-
S2896	-	-	-

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado.

1.4.2.2. Surfactina

Entende-se que o *operon srfA* é necessário para a biossíntese não ribossomal da surfactina, sendo composto por quatro genes, *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* e *srfAD*, que codificam as subunidades da surfactina sintase, mais o gene *sfp* que codifica a fosfopanteteinil transferase (LEE *et al.*, 2007). Em todas as estirpes de *B. amyloliquefaciens* foi detectado o gene codificador da surfactina sintase (*operon srfA*), com identidade de sequência de DNA de 90% para os isolados de *B. amyloliquefaciens*. No entanto, nessas estirpes foi detectado apenas um, dos quatro genes codificadores das subunidades da surfactina sintase, *srfAC*, com 90% de identidade de sequência com o gene descrito no NCBI.

Nas estirpes de *B. subtilis* (S2794, S2796 e S2896), entretanto, apresentaram todo o *operon srfA*, e os quatro genes das subunidades da surfactina sintase, *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* e *srfAD*, com 98-100% de identidade, o que indica que essas cepas de *B. subtilis* são capazes de produzir e liberarem esse composto biossurfactante com atividade antifúngica e antibacteriana (Tabela 6).

A surfactina é um lipopeptídeo cíclico, membro da família iturina, sintetizado por um mecanismo de tiomodelo não ribossomal (SHEPPARD *et al.*, 1991). Por ter uma estrutura anfifílica, a surfactina é um poderoso biossurfactante com atividade superficial (ISHIGAMI *et al.*, 1995), além disso, esse composto possui propriedades antifúngicas, antibacterianas, hemólise, também inibe a formação de coágulos de fibrina, induz a formação de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica, inibe enzimas, como AMP cíclico fosfodiesterase, e exibe atividade antivirais e antitumorais (DOEKEL *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2007).

Tabela 6. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do lipopeptídeo surfactina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*.

Cepas	Lipopeptídeo				
	Surfactina				
	<i>srfA</i>	<i>srfAA</i>	<i>srfAB</i>	<i>srfAC</i>	<i>srfAD</i>
S2536	+ (90%) *	-	-	+ (90%)	-
S2777	-	-	-	-	-
S2784	+ (90%)	-	-	+ (90%)	-
S2785	+ (90%)	-	-	+ (90%)	-
S2787	+ (90%)	-	-	+ (90%)	-
S2788	+ (90%)	-	-	+ (90%)	-
S2791	+ (90%)	-	-	+ (90%)	-
S2794	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)
S2795	-	-	-	-	-
S2796	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)
S2893	-	-	-	-	-
S2896	+ (99%)	+ (99%)	+ (99%)	+ (99%)	+ (100%)

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado.

1.4.2.3. Iturina

Todo o *operon* biossintético da iturina foi detectado nas estirpes de *B. amyloliquefaciens* havendo identidade de sequência de 89-98% com os genes descritos, isso indica que essas espécies possuem a capacidade de produzir e liberar esse composto antifúngico (Tabela 7).

Tabela 7. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do lipopeptídeo iturina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*.

Cepas	Lipopeptídeo			
	Iturina			
	Gene <i>ituA</i>	Gene <i>ituB</i>	Gene <i>ituC</i>	Gene <i>ituD</i>
S2536	+ (97%)	+ (96%)	+ (96%)	+ (96%)
S2777	-	-	-	-
S2784	+ (97%)	+ (96%)	+ (96%)	+ (95%)
S2785	+ (98%)	+ (96%)	+ (96%)	+ (95%)
S2787	+ (97%)	+ (96%)	+ (96%)	+ (95%)
S2788	+ (97%)	+ (96%)	+ (96%)	+ (95%)
S2791	+ (97%)	+ (97%)	+ (89%)	+ (96%)
S2794	-	-	-	-
S2795	-	-	-	-
S2796	-	-	-	-
S2896	-	-	-	-

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado.

A iturina é um lipopeptídeo cíclico, heptapeptídeo ligado a uma cadeia de ácidos graxos β -amino (TSUGE et al, 2001). Esse composto é também um potente lipopeptídeo antifúngico, podendo ser usada como potencial biopesticida contra fitopatógenos, bem como para o tratamento de micoses humanas e animais, devido à sua baixa toxicidade e ausência de efeitos alérgicos no hospedeiro (ONGENA *et al.*, 2005; ROMERO *et al.*, 2007; MIZUMOTO *et al.*, 2007; ONGENA; JACQUES, 2008; JIN *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2014).

A iturina é biossintetizada pelas sintetases de peptídeos não ribossomais (NRPSs), e o *operon* biossintético da iturina é comandado pelo agrupamento de genes biossintéticos *itu*, que incluem os genes *ituD*, *ituA*, *ituB* e *ituC*. A biossíntese da iturina é similar a biossíntese da bacilomicina, uma vez que, ambos compostos pertencem a família das iturinas (STEIN *et al.*, 2005; ONGENA; JACQUES, 2008).

1.4.2.4. Fengicina e Plipastatina

Nas estirpes de *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2784, S2785, S2787, S2788, S2791) foi detectado todo o *cluster* gênico responsável pela síntese da plipastatina, *ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD* e *ppsE*, cuja identidade de sequência foi de 89-98%. Entretanto, o gene *fenA* da fengicina sintetase foi encontrado apenas na estirpe S2896 com identidade de sequência de DNA de 83% em comparação ao gene descrito no NCBI (Tabela 8).

A fengicina e plipastatina são lipodecapeptídeos cíclicos antifúngicos biosurfactantes que estão intimamente relacionados em estrutura, embora originalmente tenham sido isolados independentemente (HONMA *et al.*, 2012; HARWOOD *et al.*, 2018). A fengicina possui uma variedade de bioatividades, como inibição do crescimento fúngico, perturbação, curvatura e formação de micelas em membranas artificiais (VANITTANAKOM *et al.*, 1986; DELEU *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2011). A plipastatina está envolvida na inibição da fosfolipase A₂ e a formação de poros nas membranas fúngicas. Além disso, o uso desse composto é defendido como um substituto para fungicidas químicos, devido à sua biodegradabilidade e falta de toxicidade em plantas e animais (HARWOOD *et al.*, 2018).

A fengicina é sintetizada por cinco fengicina sintases, FenC (287 kDa), FenD (290 kDa), FenE (286 kDa), FenA (406 kDa) e FenB (146 kDa) (CHEN *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1999). Já o agrupamento de genes NRPSs que codificam a síntese de plipastatina é composto pelos genes *ppsAACDE*, que codificam cinco peptídeos sintetases, PpsA (*fenC*) (289 kDa), PpsB (*fenD*) (290 kDa), PpsC (*fenE*) (287 kDa), PpsD (*fenA*) (407 kDa) e PpsE (*fenB*) (145 kDa) (HARWOOD *et al.*, 2018). Como as estruturas da plipastatina são semelhantes às da fengicina, a sequência do *operon* da plipastatina sintetase é semelhante à do *operon* da fengicina sintetase, ambas possuindo funções similares.

Tabela 8. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese dos lipopeptídeos plipastatina e fengicina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*.

Cepas	Lipopeptídeos				Fengicina
	Plipastatina				
	<i>ppsA</i>	<i>ppsB</i>	<i>ppsC</i>	<i>ppsD</i>	<i>fenA</i>
S2536	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	-
S2777	-	-	-	-	-
S2784	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (97%)	-
S2785	+ (98%)	+ (98%)	+ (97%)	+ (98%)	-
S2787	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (97%)	-
S2788	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (97%)	-
S2791	+ (97%)	+ (98%)	+ (98%)	+ (98%)	-
S2794	-	-	-	-	-
S2795	-	-	-	-	-
S2796	-	-	-	-	-
S2893	-	-	-	-	-
S2896	-	-	-	-	+ (83%)

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado.

1.4.2.5. Bacilisina

Todo o *operon bacABCDE* e o gene *bacG* (*ywfH*) responsável pela biossíntese e liberação da bacilisina foi detectado nas espécies de *B. amyloliquefaciens* com identidade de sequência de 93-98%. Entretanto, nas espécies de *B. subtilis* foi somente encontrado os genes *bacD* e *bacE*, cuja identidade de sequência foi de apenas 82-84% (Tabela 9).

A bacilisina é um antibiótico dipeptídico constituído por um resíduo L-alanina no terminal N e um aminoácido não proteinogênico, L-anticapsina, no terminal C (WALKER; ABRAHAM, 1970). Apesar de sua estrutura simples, esse composto possui uma atividade antimicrobiana extremamente ativa contra uma ampla gama de bactérias e alguns fungos (KENIG *et al.*, 1976), sendo a porção anticapsina da bacilisina responsável pela base de sua atividade antibiótica. Além disso, o modo de ação da bacilisina se deve principalmente pelo bloqueio da formação de glucosamina (GlcNAc), o que leva a interdição da biossíntese da

parede celular, e subsequente morte celular do microrganismo (MILEWSKI *et al.*, 1986; BALDWIN *et al.*, 1995; PARKER; WALSH, 2013).

Um *operon* policistrônico, *ywfBCDEFG*, e um gene monocistrônico, *ywfH* são responsáveis pela biossíntese da bacilisina (INAOKA *et al.*, 2003). Descobriu-se que os genes *ywfBCDEF* carregam as funções centrais da biossíntese da bacilisina, e conseqüentemente a isso, esses genes foram renomeados como *bacABCDE* (STEINBORN *et al.*, 2005). Ademais, os produtos codificadores de genes *bacABC* são críticos para a biossíntese da anticapsina, e os genes *bacDE* codificam as funções de ligação de aminoácidos e a autoimunidade de bacilisina (INAOKA *et al.*, 2003; STEINBORN *et al.*, 2005; TABATA *et al.*, 2005). O gene *bacE* também possui a função de bombear bacilisina para fora da célula (STEINBORN *et al.*, 2005). O gene *ywfH* é divergentemente localizado e transcrito na fita de DNA oposta de *bacABCDE*, porém, tempos mais tarde, os genes *ywfG* e *ywfH* foram renomeados como *bacF* e *bacG*, respectivamente (PARKER; WALSH, 2012).

Tabela 9. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese do antimicrobiano bacilisina no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis* sensu lato.

Antimicrobiano						
Cepas	Bacilisina					
	<i>bacA</i>	<i>bacB</i>	<i>bacC</i>	<i>bacD</i>	<i>bacE</i>	<i>Ywfh (bacG)</i>
S2536	+ (96%)	+ (95%)	+ (93%)	+ (95%)	+ (95%)	+ (98%)
S2777	-	-	-	-	-	-
S2784	+ (96%)	+ (96%)	+ (93%)	+ (95%)	+ (95%)	+ (98%)
S2785	+ (96%)	+ (96%)	+ (93%)	+ (95%)	+ (95%)	+ (98%)
S2787	+ (96%)	+ (96%)	+ (93%)	+ (95%)	+ (95%)	+ (98%)
S2788	+ (96%)	+ (96%)	+ (93%)	+ (95%)	+ (95%)	+ (98%)
S2791	+ (96%)	+ (96%)	+ (93%)	+ (95%)	+ (95%)	+ (98%)
S2794			-	+ (82%)	+ (84%)	-
S2795			-	-		-
S2796			-	+ (82%)	+ (84%)	-
S2893			-	-		-
S2896			-	+ (82%)	+ (84%)	-

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado.

1.4.2.6. Sideróforos

Nas estirpes de *B. subtilis* foi também detectado o gene *YxeB*, com 99% de identidade de sequência. O *YxeB* é responsável por codificar uma proteína de ligação ao substrato ferrioxamina que auxilia o transporte e utilização de um sideróforo hidroxamato à base de citrato fotorreativo pela bactéria (OLLINGER *et al.*, 2006). De acordo com KAN *et al.* (2018), os sideróforos podem ser divididos em três classes principais: catecolato (também denominado como feno-catecolato ou sideróforo derivado de salicila), hidroxamato e carboxilato. O sideróforo hidroxamato possui a capacidade de formar complexos estáveis com metais pesados, como Cd (cádmio), Cu (cobre), Pb (chumbo), Zn (zinco) (RASHMI *et al.*, 2013; GAONKAR; BHOSLE, 2013), o que aumenta a disponibilidade de Fe-sideróforo para as plantas, e consequentemente auxilia no desenvolvimento e no crescimento do vegetal (JING; YANG, 2007; GROBELAK *et al.*, 2017).

Além disso, foi encontrado nessas mesmas cepas, o gene *SMO* responsável por sintetizar o salicilato monooxigenase, que converte ácido salicílico em catecol, porém a identidade de sequência do gene foi de 82% (Tabela 10).

Tabela 10. Detecção de genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos no genoma das cepas pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*.

Cepas	Sideróforos	
	Ácido Salicílico	Desferrioxamina e Ferricromo
	<i>SMO</i>	<i>YxeB</i>
S2536	-	-
S2777	-	-
S2784	-	-
S2785	-	-
S2787	-	-
S2788	-	-
S2791	-	-
S2794	+ (82%)	+ (99%)

Continuação...

Cepas	Ácido Salicílico	Desferrioxamina e Ferricromo
	<i>SMO</i>	<i>YxeB</i>
S2795	-	-
S2796	+ (82%)	+ (99%)
S2893	-	-
S2896	+ (82%)	+ (99%)

* + (n%) = Gene detectado no genoma da estirpe e identidade de sequência de DNA %. (-) = Gene não detectado.

1.4.2.7. Genes de resistência a antimicrobianos

Para as espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis s.l* foram detectados os genes de resistência a cefazolina (*ampC*), a clortetraciclina (*tetD*) e a lincomicina (*irmrA* e *irmrB*).

1.4.3. *Priestia megaterium* (*Bacillus megaterium*) e *Priestia aryabhatai* (*Bacillus aryabhatai*)

As sequências de DNA das estirpes S1338 e S2538 foram comparadas com as sequências de 416 espécies presentes no banco de dados interno do Laboratório de Bioinformática – CENARGEN, e a análise genômica determinou que a cepa S1338 foi 97,95% similar ao genoma da cepa *Priestia megaterium* S188, anteriormente denominado como *B. megaterium*.

A reclassificação de *B. megaterium* para o novo gênero *Priestia* foi proposto recentemente por GUPTA *et al.* (2020), em que os autores após realizarem análises filogenômicas e análises comparativas detectaram divergências genéticas em algumas espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*. Essas diferenças estão associadas a indels de assinaturas conservados (CSIs) ou seja, sequências de DNA codificadoras de proteínas conservadas, que são usadas como marcadores para determinar os graus de parentesco entre diferentes espécies. Esses marcadores são características exclusivas e comumente compartilhadas entre espécies de mesmo clado filogenético (grupo). Assim, espécies pertencentes ao gênero *Priestia*, como *P. megaterium*, diferiram das outras espécies de *Bacillus* por possuírem e compartilharem duas

inserções e deleções (indels) de assinaturas conservadas (CSIs) nas proteínas oligoribonuclease NrnB ou cAMP/cGMP fosfodiesterase e proteínas da superfamília DHH (GUPTA *et al.*, 2020).

A identidade média de nucleotídeos (ANI) da cepa S2538 foi 98,93% similar ao genoma da estirpe *P. aryabhatai* K13, anteriormente denominado como *B. aryabhatai*. Entretanto, na literatura alguns autores ressaltam que *P. aryabhatai* é semelhante a *P. megaterium*, como os autores RAO *et al.* (2019) que após realizarem testes morfológicos, bioquímicos e moleculares, baseado na sequência 16 rRNA, reclassificaram a espécie *P. aryabhatai* como sendo um sinônimo heterotípico posterior de *P. megaterium*. Porém, de acordo com literatura, a identificação de espécies com base em sequências do *operon* de RNA ribossômico, especificamente os genes 16S rRNA, não garantem a distinção coesa de uma espécie da outra, uma vez que suas sequências não apresentam diferenças significativas (CHO *et al.*, 2018), assim, nesse estudo a estirpe S2538 será tratada como sendo *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*), devido algumas diferenças observadas e abordadas nos próximos capítulos e devido a análise do genoma central.

No esboço do genoma das estirpes S1338 e S2538, os números estimados de bases foram de 6.169.737 pb e 5.252.248 pb, respectivamente. Esses *contigs* foram organizados em *scaffolds* com tamanho de 24 pb para S2538 e de 82 pb para S1338. As sequências dos genomas renderam também um comprimento de N50 e conteúdo %GC de 347.658 pb e 37.25% para S1338, e 4.096.862 pb e 37.93% para S2538. Um total de 6.335 e 5.393 CDS foram encontrados nas estirpes S1338 e S2538, respectivamente. Nessa mesma ordem, os números de mRNA, tRNAs, rRNAs e ncRNA encontrados por prokka foram 6.517 e 5.393; 54 e 53; 5 e 4; 122 e 105 (Tabela 11).

Além disso, durante a mineração do genoma das estirpes S1338 e S2538 não foram detectados genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos, lipopeptídeos, antimicrobianos, toxinas e virulência.

Tabela 11. Características gerais do genoma total dos isolados S1338 e S2538. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de seqüências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do *contig* mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas

Cepas	Bases	Scaffolds	N50	mRNA	CDS	tRNA	rRNA	ncRNA	%GC	CRISPRs
S1338	6.169.737	82	347.65	6.51	6.335	54	5	122	37.25	0
S2538	5.252.248	24	4.096.86	5.56	5.393	53	4	105	37.93	0

1.4.4. Gêneros *Lysinibacillus* e *Brevibacillus*

A análise genômica das seqüências de DNA da estirpe S2894 e S1438, por meio da bioinformática, determinou que essas duas cepas são pertencentes aos gêneros *Lysinibacillus* e *Brevibacillus*. O isolado S2894 foi 96,76% idêntica ao genoma da estirpe *Lysinibacillus capsici* anQ-h6. Enquanto, a cepa S1438 foi 99,89% correspondente a *Brevibacillus laterosporus* BGSP9.

No esboço do genoma das estirpes S2894 e S1438, os números estimados de bases foram de 4.500.419 pb e 5.241.246 pb, respectivamente. Esses *contigs* foram organizados em *scaffolds* com tamanho de 29 pb para S2894 e de 587 pb para S1438.

As seqüências dos genomas renderam também um comprimento de N50 e conteúdo %GC de 357.424 pb e 37,45% para S2894, e 14.537 pb e 40,11% para S1438. Um total de 4.363 e 4.708 CDS foram encontrados nas estirpes S2894 e S1438, respectivamente. Nessa mesma ordem, os números de mRNA, tRNAs, rRNAs e ncRNA encontrados por prokka foram 4.504 e 4.850; 47 e 69; 6 e 3; 87 e 69 (Tabela 12).

Além disso, na exploração do genoma das estirpes S2894 e S1438, pela bioinformática, não foram detectados genes responsáveis pela biossíntese de sideróforos, lipopeptídeos, antimicrobianos, toxinas e virulência.

Tabela 12. Características gerais do genoma total dos isolados S2894 e S1438. **Bases** = número de nucleotídeos, **CDS** = número de seqüências de codificação, **tRNA** = número de genes de tRNA, **rRNA** = número de genes de rRNA, **ncRNA** = número de genes de RNA não codificantes, **mRNA** = número de genes de RNA mensageiros, **Teor de GC%** = porcentagem de teor de guanina-citosina, **N50** = comprimento do *contig* mais curto para o qual os *contigs* mais longos e iguais cobrem pelo menos 50% do conjunto, **CRISPRs** = repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente interespaçadas.

Cepas	Bases	Scaffolds	N50	mRNA	CDS	tRNA	rRNA	ncRNA	%GC	CRISPRs
S2894	4.500.419	29	357.42	4.50	4.363	47	6	87	37.35	0
S1438	5.241.246	587	14.53	4.85	4.708	69	3	69	40.11	0

1.5. CONCLUSÕES

O sequenciamento genético permitiu identificar uma diversidade de espécies do gênero *Bacillus*, e algumas espécies pertencentes aos gêneros *Brevibacillus*, *Lysinibacillus* e *Priestia*.

Também, com a análise genômica comparativa foi possível explorar o genoma dessas estirpes e detectar diversos complexos gênicos responsáveis por sintetizar diferentes metabólitos secundários com grandes atividades antimicrobianas, quelantes de Fe³⁺ (sideróforos), biosurfactantes e toxinas. Além disso, também foi observada a presença de genes codificadores de virulência, como as enterotoxinas e genes responsáveis pela resistência a compostos antimicrobianos.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEOLU, M.; ALNAJAR, S.; NAUSHAD, S.; GUPTA, R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, 2016.

BACH, E.; RANGEL, C. P.; RIBEIRO, I. D. A.; PASSAGLIA, L. M. P. Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 1-17, 2022.

BALDWIN, J. E.; ADLINGTON, R. M.; MITCHELL, M. B. Stereocontrolled enantiospecific synthesis of anticapsin. **Tetrahedron**, v. 51, n. 17, p. 5193-5206, 1995.

BARBEAU, K.; ZHANG, G.; LIVE, D. H.; BUTLER, A. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 3, p. 378-379, 2002.

BARONA-GÓMEZ, F.; WONG, U.; GIANNAKOPOULOS, A. E.; DERRICK, P. J.; CHALLIS, G. L. Identification of a *Cluster* of Genes that Directs Desferrioxamine Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 50, p. 16282-16283, 2004.

BEECHER, D. J.; MACMILLAN, J. D. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. **Infection and immunity**, v. 58, n. 7, p. 2220-2227, 1990.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and immunity**, v. 63, n. 11, p. 4423-4428, 1995.

BORRIS, R.; CHEN, X. H.; RUECKERT, C.; BLOM, J.; BECKER, A.; BAUMGARTH, B.; KLENK, H. P. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. 8, p. 1786-1801, 2011.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; WITWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CAWOY, H.; DEBOIS, D.; FRANZIL, L.; DE PAUW, E.; THONART, P.; ONGENA, M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 281-295, 2015.

CENDROWSKI, S.; MACARTHUR, W.; HANNA, P. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. **Molecular microbiology**, v. 51, n. 2, p. 407-417, 2004.

CHALLIS, G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBiochem**, v. 6, n. 4, p. 601-611, 2005.

CHEN, X. H.; KOUMOUTSI, A.; SCHOLZ, R.; SCHNEIDER, K.; VATER, J.; SÜSSMUTH, R.; PIEL, J.; BORRIS, R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. **Journal of biotechnology**, v. 140, n. 1-2, p. 27-37, 2009.

CHEN, L.; HENG, J.; QIN, S.; BIAN, K. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198560, 2018.

CHO, M. S.; JIN, Y. J.; KANG, B. K.; PARK, Y. K.; KIM, C.; PARK, D. S. Understanding the ontogeny and succession of *Bacillus velezensis* and *B. subtilis* subsp. *subtilis* by focusing on kimchi fermentation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

CONTI, E.; STACHELHAUS, T.; MARAHIEL, M. A.; BRICK, P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. **The EMBO journal**, v. 16, n. 14, p. 4174-4183, 1997.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. **Journal of colloid and interface science**, v. 283, n. 2, p. 358-365, 2005.

DOEKEL, S.; EPPELMANN, K.; MARAHIEL, M. A. Heterologous expression of nonribosomal peptide synthetases in *B. subtilis*: construction of a bi-functional *B. subtilis*/*E. coli* shuttle vector system. **FEMS microbiology letters**, v. 216, n. 2, p. 185-191, 2002.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. Pt_7, p. 2104-2109, 2015.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1212-1217, 2016.

EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2019.

FADEEV, E. A.; LUO, M.; GROVES, J. T. Synthesis, structure, and molecular dynamics of gallium complexes of schizokinen and the amphiphilic siderophore acinetoferrin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 38, p. 12065-12075, 2004.

FAGERLUND, A.; WEEN, O.; LUND, T.; HARDY, S. P.; GRANUM, P. E. Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2689-2697, 2004.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRISS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

GAO, B.; GUPTA, R. S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 76, n. 1, p. 66-112, 2012.

GAONKAR, T.; BHOSLE, S. Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. **Chemosphere**, v. 93, n. 9, p. 1835-1843, 2013.

GROBELAK, A.; HILLER, J. Bacterial siderophores promote plant growth: screening of catechol and hydroxamate siderophores. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n. 9, p. 825-833, 2017.

GORIS, J.; KONSTANTINIDIS, K. T.; KLAPPENBACH, J. A.; COENYE, T., VANDAMME, P.; TIEDJE, J. M. DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. 1, p. 81-91, 2007.

GUPTA, M.; KUMAR, H.; KAUR, S. Vegetative insecticidal protein (*Vip*): A potential contender from *Bacillus thuringiensis* for efficient management of various detrimental agricultural pests. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 659736, 2021.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020.

HARDY, S. P.; LUND, T.; GRANUM, P. E. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. **FEMS microbiology letters**, v. 197, n. 1, p. 47-51, 2001.

HARWOOD, C. R.; MOUILLON, J. M.; POHL, S.; ARNAU, J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HEINRICHS D. E.; RAHN A.; DALE S. E.; SEBULSKY M. T. *Iron Transport in Bacteria: Molecular Genetics, Biochemistry, Bacterial Pathogenesis and Ecology* Washington, DC: American Society for Microbiology. 2004.

HO, Y. N.; LEE, H. J.; HSIEH, C. T.; PENG, C. C.; YANG, Y. L. Chemistry and biology of salicyl-capped siderophores. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 59, p. 431-490, 2018.

HONMA, M.; TANAKA, K.; KONNO, K.; TSUGE, K.; OKUNO, T.; HASHIMOTO, M. Termination of the structural confusion between plipastatin A1 and fengycin IX. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 12, p. 3793-3798, 2012.

HOTTA, K.; KIM, C. Y.; FOX, D. T.; KOPPISCH, A. T. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 1918-1925, 2010.

INAOKA, T.; TAKAHASHI, K.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; OCHI, K. Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2169-2176, 2003.

ISHIGAMI, Y.; OSMAN, M.; NAKAHARA, H.; SANO, Y.; ISHIGURO, R.; MATSUMOTO, M. Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 4, n. 6, p. 341-348, 1995.

JACQUES, P. "Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus spp.*," in *Biosurfactants: From Genes to Applications*, ed. G. Soberón-Chávez (Berlin: Springer), 57–91, 2011.

JAIN, D.; SUNDA, S. D.; SANADHYA, S.; NATH, D. J.; KHANDELWAL, S. K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

JIN, H.; ZHANG, X.; LI, K.; NIU, Y.; GUO, M.; HU, C.; HUANG, F. Direct bio-utilization of untreated rapeseed meal for effective iturin A production by *Bacillus subtilis* in submerged fermentation. **Plos one**, v. 9, n. 10, p. e111171, 2014.

JING, Y.; HE, Z.; YANG, X. Role of soil rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n. 3, p. 192-207, 2007.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; BENJAMIN, S. An overview on the crystal toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Advances in Microbiology**, v. 3, n. 05, p. 462, 2013.

KENIG, M.; VANDAMME, E. T; ABRAHAM, E. P. The mode of action of bacilysin and anticapsin and biochemical properties of bacilysin-resistant mutants. **Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 46-54, 1976.

KIM, M. J.; HAN, J. K.; PARK, J. S.; LEE, J. S.; LEE, S. H.; CHO, J. I.; KIM, K. S. Various enterotoxin and other virulence factor genes widespread among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 872-879, 2015.

KNETSCH, C. W.; VAN DER VEER, E. M.; HENKEL, C.; TASCHNER, P. DNA sequencing. In: VAN PELT-VERKUIL, E.; VAN LEEUWENR W.B.; TE WITT, R. **Molecular 66diagnostics. Part 1: Technical backgrounds and quality aspects**. 1. ed. Singapura: Springer, 2019. p. 339 360.

KOPPISCH, A. T.; BROWDER, C. C.; MOE, A. L.; SHELLEY, J. T.; KINKEL, B. A.; HERSMAN, L. E.; RUGGIERO, C. E. Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. **Biometals**, v. 18, n. 6, p. 577-585, 2005.

KOPPISCH, A. T.; DHUNGANA, S.; HILL, K. K.; BOUKHALFA, H.; HEINE, H. S.; COLIP, L. A.; RUGGIERO, C. E. Petrobactin is produced by both pathogenic and non-pathogenic isolates of the *Bacillus cereus* group of bacteria. **Biometals**, v. 21, n. 5, p. 581-589, 2008.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X. H.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; HITZEROTH, G.; FRANKE, P.; BORRISS, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 4, p. 1084-1096, 2004.

KRAMER, J.; ÖZKAYA, Ö.; KÜMMERLI, R. Bacterial siderophores in community and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 152-163, 2020.

LAMBALOT, R. H.; GEHRING, A. M.; FLUGEL, R. S.; ZUBER, P.; LACELLE, M.; MARAHIEL, M. A.; WALSH, C. T. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases. **Chemistry & biology**, v. 3, n. 11, p. 923-936, 1996.

LEE, J. Y.; JANES, B. K.; PASSALACQUA, K. D.; PFLEGER, B. F.; BERGMAN, N. H.; LIU, H.; SHERMAN, D. H. Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from *Bacillus anthracis*. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 5, p. 1698-1710, 2007.

LEE, J. Y.; PASSALACQUA, K. D.; HANNA, P. C.; SHERMAN, D. H. Regulation of petrobactin and bacillibactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* under iron and oxygen variation. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20777, 2011.

LEE, Y. K.; YOON, B. D.; YOON, J. H.; LEE, S. G.; SONG, J. J.; KIM, J. G.; KIM, H. S. Cloning of *srfA operon* from *Bacillus subtilis* C9 and its expression in *E. coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 3, p. 567-572, 2007.

LIN, G. H.; CHEN, C. L.; TSCHEN, J. S. M.; TSAY, S. S.; CHANG, Y. S.; LIU, S. T. Molecular cloning and characterization of fengycin synthetase gene *fenB* from *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1338-1341, 1998.

LIN, T. P.; CHEN, C. L.; CHANG, L. K.; TSCHEN, J. S. M.; LIU, S. T. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 5060-5067, 1999.

LIN, T. P.; CHEN, C. L.; FU, H. C.; WU, C. Y.; LIN, G. H.; HUANG, S. H.; LIU, S. T. Functional analysis of fengycin synthetase *FenD*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1730, n. 2, p. 159-164, 2005.

LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular microbiology**, v. 38, n. 2, p. 254-261, 2000.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. **FEMS microbiology letters**, v. 141, n. 2-3, p. 151-156, 1996.

LUND, T.; GRANUM, P. E. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. **Microbiology**, v. 143, n. 10, p. 3329-3336, 1997.

MAAGD, R. A.; BRAVO, A.; BERRY, C.; CRICKMORE, N.; SCHNEPF, H. E. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual review of genetics**, v. 37, n. 1, p. 409-433, 2003.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S. W.; SA, T. M. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated

from rice rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 2490-2495, 2010.

MARTINS, É.; GRYNBERG, P.; TOGAWA, R.; QUEIROZ, P.; MONNERAT, R. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain S1905, an isolate toxic for lepidoptera. **BRAZILIAN APPLIED SCIENCE REVIEW**, v. 6, n. 3, p. 947-951, 2022.

MASPOLI, A.; WENNER, N.; MISLIN, G. L.; REIMMANN, C. Functional analysis of pyochelin-/enantiopyochelin-related genes from a pathogenicity island of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. **BioMetals**, v. 27, n. 3, p. 559-573, 2014.

MAUGHAN, H.; VAN DER AUWERA, G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 789-797, 2011.

MAY, J. J.; WENDRICH, T. M.; MARAHIEL, M. A. The *dhb operon* of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2, 3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 10, p. 7209-7217, 2001.

MILEWSKI, S.; CHMARA, H.; BOROWSKI, E. Anticapsin: an active site directed inhibitor of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Candida albicans*. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 12, n. 6-7, p. 577-583, 1986.

MISHRA, A. K.; BAEK, K. H. Salicylic acid biosynthesis and metabolism: A divergent pathway for plants and bacteria. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 705, 2021.

MIZUMOTO, S.; SHODA, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2007.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current microbiology**, v. 39, n. 3, p. 159-162, 1999.

MOOTZ, H. D.; MARAHIEL, M. A. The tyrocidine biosynthesis *operon* of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 21, p. 6843-6850, 1997.

NAIR, K.; AL-THANI, R.; AL-THANI, D.; AL-YAFEI, F.; AHMED, T.; JAOUA, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and *cry* gene content. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 708, 2018.

OLLINGER, J.; SONG, K. B.; ANTELMANN, H.; HECKER, M.; HELMANN, J. D. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3664-3673, 2006.

ONGENA, M.; JACQUES, P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ONGENA, M.; JACQUES, P.; TOURÉ, Y.; DESTAIN, J.; JABRANE, A.; THONART, P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 29-38, 2005.

OVES-COSTALES, D.; KADI, N.; FOGG, M. J.; SONG, L.; WILSON, K. S.; CHALLIS, G. L. Petrobactin biosynthesis: AsbB catalyzes condensation of spermidine with N8-citryl-spermidine and its N 1-(3, 4-dihydroxybenzoyl) derivative. **Chemical communications**, n. 34, p. 4034-4036, 2008.

PALAZZINI, J. M.; DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; CHULZE, S. N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. **Microbiological research**, v. 192, p. 30-36, 2016.

PARKER, J. B.; WALSH, C. T. Action and timing of BacC and BacD in the late stages of biosynthesis of the dipeptide antibiotic bacilysin. **Biochemistry**, v. 52, n. 5, p. 889-901, 2013.

PATEL, H.; TSCHEKA, C.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; HEERKLOTZ, H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 8, p. 2000-2008, 2011.

PENG, W.; ZHONG, J.; YANG, J.; REN, Y.; XU, T.; XIAO, S.; TAN, H. The artificial neural network approach based on uniform design to optimize the fed-batch fermentation condition: application to the production of iturin A. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2014.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 69-71, 1987.

PRIEST, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus*. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: **Biochemistry, physiology, and molecular genetics**, p. 1-16, 1993.

QIAN, S.; LU, H.; SUN, J.; ZHANG, C.; ZHAO, H.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Antifungal activity mode of *Aspergillus ochraceus* by bacillomycin D and its inhibition of ochratoxin A (OTA) production in food samples. **Food Control**, v. 60, p. 281-288, 2016.

RAO, M. P. N.; DONG, Z. Y.; LIU, G. H.; LI, L.; XIAO, M.; LI, W. J. Reclassification of *Bacillus aryabhatai* Shivaji *et al.* 2009 as a later heterotypic synonym of *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (Approved Lists 1980). **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 22, p. fnz258, 2019.

- RASHMI, V.; SHYLAJANACIYAR, M.; RAJALAKSHMI, R.; D'SOUZA, S. F.; PRABAHARAN, D.; UMA, L. Siderophore mediated uranium sequestration by marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* BDU 130911. **Bioresource technology**, v. 130, p. 204-210, 2013.
- RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 45, p. 19126-19131, 2009.
- ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R. H.; DUFOUR, S. E.; VEENING, J. W.; ARREBOLA, E.; PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 430-440, 2007.
- RONNEBAUM, T. A.; LAMB, A. L. Nonribosomal peptides for iron acquisition: pyochelin biosynthesis as a case study. **Current opinion in structural biology**, v. 53, p. 1-11, 2018.
- SCHALK, I. J.; RIGOUIN, C.; GODET, J. An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent Pseudomonads and new insights into their complex cellular organization. **Environmental microbiology**, v. 22, n. 4, p. 1447-1466, 2020.
- SCHLUMBOHM, W.; STEIN, T.; ULLRICH, C.; VATER, J.; KRAUSE, M.; MARAHIEL, M. A.; WITTMANN-LIEBOLD, B. An active serine is involved in covalent substrate amino acid binding at each reaction center of gramicidin S synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 34, p. 23135-23141, 1991.
- SERINO, L.; REIMMANN, C.; VISCA, P.; BEYELER, M.; CHIESA, V. D.; HAAS, D. Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginosic acid requires the iron-regulated pchDCBA operon in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 1, p. 248-257, 1997.
- SHEPPARD, J. D.; JUMARIE, C.; COOPER, D. G.; LAPRADE, R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1064, n. 1, p. 13-23, 1991.
- SHU, H. Y.; LIN, G. H.; WU, Y. C.; TSCHEN, J. S. M.; LIU, S. T. Amino acids activated by fengycin synthetase FenE. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 292, n. 4, p. 789-793, 2002.
- SLEPECKY, R.; HEMPHILL, E. **The genus *Bacillus***. Nonmedical. The Prokaryotes, Vol. 4 (Dworkin M Falkow S Rosenberg E Schleifer K-H Stackebrandt E, eds), pp. 530–562. Springer, New York, 2006.
- STACHELHAUS, T.; HÜSER, A.; MARAHIEL, M. A. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. **Chemistry & biology**, v. 3, n. 11, p. 913-921, 1996.
- STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D.; BERGENDAHL, V.; MARAHIEL, M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis: catalytic role of the condensation domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 35, p. 22773-22781, 1998.

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

STEIN, T.; VATER, J.; KRUFIT, V.; OTTO, A.; WITTMANN-LIEBOLD, B.; FRANKE, P.; MORRIS, H. R. The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzymatic templates. **Journal of Biological chemistry**, v. 271, n. 26, p. 15428-15435, 1996.

STEINBORN, G.; HAJIREZAEI, M. R.; HOFEMEISTER, J. bac genes for recombinant bacilysin and anticapsin production in *Bacillus* host strains. **Archives of microbiology**, v. 183, n. 2, p. 71-79, 2005.

SUN, J.; QIAN, S.; LU, J.; LIU, Y.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Knockout of rapC improves the bacillomycin D yield based on de novo genome sequencing of *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 17, p. 4422-4430, 2018.

TABATA, K.; IKEDA, H.; HASHIMOTO, S. I. *ywfE* in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, l-amino acid ligase. **Journal of bacteriology**, v. 187, n. 15, p. 5195-5202, 2005.

TRAN, S. L.; GUILLEMET, E.; GOHAR, M.; LERECLUS, D.; RAMARAO, N. CwpFM (EntFM) is a *Bacillus cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 10, p. 2638-2642, 2010.

TSUGE, K.; AKIYAMA, T.; SHODA, M. Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6265-6273, 2001.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **The Journal of antibiotics**, v. 39, n. 7, p. 888-901, 1986.

WALKER, J. E.; ABRAHAM, E. P. The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. **Biochemical Journal**, v. 118, n. 4, p. 563-570, 1970.

WANG, H.; FEWER, D. P.; HOLM, L.; ROUHIAINEN, L.; SIVONEN, K. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 25, p. 9259-9264, 2014.

WILDERMUTH, M. C.; DEWDNEY, J.; WU, G.; AUSUBEL, F. M. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. **Nature**, v. 414, n. 6863, p. 562-565, 2001.

WILSON, M. K.; ABERGEL, R. J.; RAYMOND, K. N.; ARCENEUX, J. E.; BYERS, B. R. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 348, n. 1, p. 320-325, 2006.

ZAWADZKA, A. M.; ABERGEL, R. J.; NICHIPORUK, R.; ANDERSEN, U. N.; RAYMOND, K. N. Siderophore-mediated iron acquisition systems in *Bacillus cereus*:

identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. **Biochemistry**, v. 48, n. 16, p. 3645-3657, 2009.

ZEIGLER, D. R.; PERKINS, J.B. **The genus *Bacillus***. E. Goldman, L.H. Green (Eds.), Practical Handbook of Microbiology, CRC Press, Boca Raton, FL, 2009.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES PERTENCENTES AOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* POR PCR EM TEMPO REAL

RESUMO

A caracterização molecular por PCR em tempo real é capaz de monitorar a reação enquanto ela progride, sendo os dados coletados ao longo da PCR. Essa praticidade garante uma identificação rápida e precisa de espécies microbianas, que serão utilizadas no desenvolvimento de novos produtos biológicos, como bioinseticidas e biofertilizantes. Assim, o objetivo desse estudo foi desenvolver *primers* específicos para qPCR e identificar espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*. Desse modo, com base em sequências candidatas de genes específicos de 416 espécies de *Bacillus* e gêneros correlacionados, pelo sequenciamento das 21 estirpes do Capítulo 1, e por sequências de DNA de espécies inseridas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), selecionou-se 29 espécies bacterianas para o desenvolvimento de *primers* destinados a PCR em tempo real. Após o desenho e síntese dos *primers* foram realizados ensaios de especificidade (funcionalidade), otimização, curva padrão relativa e eficiência dos mesmos, a fim de determinar as melhores condições de amplificação por qPCR. Posteriormente, foram selecionadas ao acaso 600 estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, como parte da validação do método de identificação. Assim, com os resultados obtidos dos ensaios de especificidade verificou-se que 20 *primers* mostraram-se adequados e satisfatórios, sem formação de dímeros, sem amplificação cruzada com espécies filogeneticamente correlacionadas, e com amplificação correspondente com estirpes candidatas definidas como controles positivos. Além disso, no processo de validação dos *primers* foram identificadas 458 estirpes, sendo 80% das espécies identificadas pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato*. Também foram calculados os índices de diversidade de espécies Simpson e Shannon-Wiener (Weaver), aos quais acusaram baixa diversidade de espécies dentro do conjunto de amostras identificadas. Conclui-se que o desenvolvimento de *primers* específicos para qPCR garante uma identificação rápida e precisa de espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* tornando-se um excelente método de caracterização bacteriana para coleções de bactérias, bem como para seleção de estirpes com interesse biotecnológico.

Palavras-chaves: Caracterização Molecular; qPCR; Bactérias; Coleção.

ABSTRACT

Molecular characterization by real-time PCR can monitor the reaction as it progresses, with data collected throughout the PCR. This practicality guarantees a quick and accurate identification of microbial species, which will be used in the development of new biological products, such as bioinsecticides and biofertilizers. Thus, the aim of this study was to develop specific primers for qPCR and identify species belonging to the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* and *Brevibacillus*. Thus, based on candidate sequences of specific genes from 416 *Bacillus* species and correlated genera, by sequencing the 21 strains from Chapter 1, and by DNA sequences from species included in the National Center for Biotechnology Information (NCBI), we selected 29 bacterial species for the development of *primers* for real-time PCR. After the design and synthesis of the primers, specificity (functionality), optimization, relative standard curve and efficiency assays were performed, in order to determine the best amplification conditions by qPCR. Subsequently, 600 strains were selected from the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – CENARGEN, as part of the validation of the identification method. Thus, with the results obtained from the specificity assays, it was verified that 20 *primers* were adequate and satisfactory, without dimer formation, without cross amplification with phylogenetically correlated species, and with corresponding amplification with candidate strains defined as positive controls. Furthermore, in the *primers* validation process, 458 strains were identified, with 80% of the identified species belonging to the *B. cereus sensu lato* group. Simpson and Shannon-Wiener (Weaver) species diversity indices were also calculated, which showed low species diversity within the set of identified samples. It is concluded that the development of specific primers for qPCR guarantees a fast and accurate identification of species belonging to the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* and *Brevibacillus*, making it an excellent method of bacterial characterization for bacterial collections, as well as for the selection of strains with biotechnological interest.

Keywords: Molecular Characterization; qPCR; Bacteria; Collection.

2.1. INTRODUÇÃO

Em laboratórios de microbiologia, a detecção, quantificação e identificação de bactérias, incluindo as do gênero *Bacillus* e gêneros correlacionados são realizados por meio de várias abordagens, como ensaios fenotípicos, bioquímicos, imunológicos e métodos moleculares (CLIFFORD *et al.*, 2012; CHO *et al.*, 2018). No entanto, ao distinguir espécies intimamente relacionadas, essas técnicas possuem baixa resolução e muitas vezes resultam em erros de classificação e identificação de cepas (CHO *et al.*, 2009; SANGAL *et al.*, 2016). Algumas espécies de *Bacillus*, por exemplo, possuem alta similaridade fenotípica e genética, o que pode

representar problemas na identificação, quando usados métodos convencionais de detecção (KĘDRAK-JABŁOŃSK *et al.*, 2018).

Por muitos anos, os genes 16S rRNA têm sido usados para descrever a composição da microbiota de vários habitats. Para o gênero *Bacillus*, análises moleculares baseadas no sequenciamento do gene 16S rRNA têm sido utilizados como principal ferramenta para atribuição taxonômica das espécies pertencentes a esse gênero (HUANG *et al.*, 2012). Contudo, a identificação de espécies com base em sequências do *operon* de RNA ribossômico, especificamente os genes 16S rRNA, não garantem a distinção coesa de uma espécie da outra, uma vez que suas sequências não apresentam diferenças significativas (CHO *et al.*, 2018).

Porém, o aumento no número de genomas sequenciados, devido aos avanços da tecnologia de sequenciamento de última geração, permitiu que novos genes fossem identificados. Além disso, cada vez mais, os genes, que não são universais, ou são menos conservados dentro e entre as espécies, estão sendo usados para melhorar a resolução e identificação de bactérias. Desse modo, essa conquista, acompanhada da disponibilidade de várias ferramentas de bioinformática, levou ao advento de novas técnicas de identificação de maior fidelidade, mais rápidas e mais econômicas, como, por exemplo, a PCR em tempo real (JANDA; ABBOTT, 2007; FERNÁNDEZ – NO *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2018)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi um dos primeiros ensaios baseados em DNA, usados para identificar microrganismos (OLIWA-STASIAK *et al.*, 2011). Em comparação aos outros métodos de detecção, a PCR é considerada uma ferramenta mais rápida, mais sensível e mais específica. Diferentemente da PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR ou PCR quantitativa) permite realizar a análise das amostras em tempo real, ciclo após ciclo, descartando a análise pós ensaio. Também a qPCR é realizada em um sistema de tubo fechado, não sendo necessário a manipulação do produto, assim como na PCR convencional, após o fim da qPCR, evitando assim contaminações (HEID *et al.*, 1996).

Essa técnica molecular também permite que o usuário quantifique o alvo, de forma mais precoce e precisa. Além disso, a qPCR possibilita também quantificar populações microbianas por meio da medição do número de genes (POSTOLLEC *et al.*, 2011). Com a PCR em tempo real, a quantidade de DNA é mensurada a cada ciclo, via misturas químicas fluorescentes, seja SYBR Green ou sondas marcadas com sequência específica TaqMan, que aumentam a fluorescência a cada ciclo de reação, teoricamente duplicando a quantidade inicial do alvo, de forma proporcional a quantidade de amplicons gerados (MACKAY, 2004).

Desse modo, vários estudos abordam o uso da qPCR na detecção, quantificação e identificação de espécies bacterianas do gênero *Bacillus* e gêneros correlacionados. A título de exemplo, Oliwa-Stasiak *et al.* (2011) desenvolveram ensaios de PCR em tempo real para detecção e quantificação de espécies do grupo *B. cereus*, e diferenciação de *B. weihenstephanensis* e *B. pseudomycoides*. Wei *et al.* (2018) estabeleceram um método de diferenciação entre espécies do grupo *B. cereus* a partir de *primers* específicos de qPCR. Nakano (2020) desenvolveu uma técnica de identificação e quantificação rápida e específica para os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* usando PCR quantitativa simples (qPCR) e PCR quantitativa multiplex (mqPCR). Fernández – No *et al.* (2011) desenvolveram ensaios de PCR em tempo real para detecção e quantificação de *B. cereus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis*. Por fim, Fratura *et al.* (2022) desenvolveram um método de PCR em tempo real com sequências específicas para táxons visando o grupo *Bacillus subtilis*.

Ademais, a qPCR pode ser utilizada para inúmeros fins, principalmente na detecção, identificação e discriminação de espécies destinadas a produção e formulação de novos produtos biológicos, essencialmente aqueles que atuam como agentes de biocontrole e biofertilizantes na agricultura.

2.2. OBJETIVO GERAL

Desenvolver *primers* específicos para qPCR e identificar (detectar) espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar um protocolo de identificação bacteriana rápido e preciso por qPCR utilizando-se o sistema SYBR Green;
- Desenvolver *primers* com base em sequências candidatas de genes específicos para identificação (detecção) de espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* por qPCR;
- Validar o método de identificação por qPCR com estirpes pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia;

2.4. MATERIAL E METÓDOS

2.4.1. Espécies de Referência

Com base em sequências de DNA dos genomas das 21 estirpes sequenciadas, e sequências candidatas de genes específicos de 416 espécies de *Bacillus* e gêneros correlacionados, pertencentes ao banco de dados interno do Laboratório de Bioinformática – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, bem como por sequências de DNA de espécies inseridas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), selecionou-se 29 espécies bacterianas relacionadas aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia*, *Brevibacillus* e *Paenibacillus* para o desenvolvimento de *primers* destinados a Real Time-PCR.

Assim, as espécies selecionadas para o desenho dos *primers* foram: *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus luti*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus paranthracis*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus albus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus megaterium* (*Priestia megaterium*), *Bacillus aryabhatai* (*Priestia aryabhatai*), *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus nakamurai*, *Bacillus safensis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus spizizenii*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Paenibacillus alvei*.

2.4.2. Desenho dos *primers*

Os genes foram selecionados conforme descritos no *Genbank*, sendo escolhidas sequências de DNA específicas para cada espécie de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Brevibacillus spp.* e *Paenibacillus spp.* As sequências dos genes de interesse foram pesquisadas no banco de dados do NCBI. As sequências foram alinhadas por meio do software *Geneious* (KEARSE *et al.*, 2012), e após o alinhamento, foram escolhidas regiões mais conservadas para a síntese de sequências consenso de DNA para os genes.

Assim, para a construção dos *primers* utilizou-se o programa *Primer Quest Tool* (<https://www.idtdna.com/primerquest/Home/Index>), sob os seguintes parâmetros de confecção: comprimento de sequência até 150pb, temperatura de anelamento variando entre

60°C e 62°C, possibilidade de os produtos de amplificação serem usados com corante intercalante de DNA.

Posteriormente, as sequências dos *primers* foram alinhadas pelo programa *Primer Stats* (WISHART *et al.*, 2000) a fim de evitar, por exemplo, o desenho de oligonucleotídeos defeituosos, que sofressem efeito de grampo ou com temperaturas de anelamento muito altas. Os *primers* foram também comparados a outras sequências de DNA por meio da ferramenta *Nucleotide Blast* (NCBI, 2022), com a intenção de confirmar suas especificidades e as sequências consenso utilizadas. Após esses procedimentos, os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies*® na concentração de 100 µM.

2.4.3. Ensaios de especificidade, otimização, curva padrão e eficiência dos *primers*

Para determinar as melhores condições de amplificação por qPCR foi realizado ensaios de especificidade (funcionalidade), otimização, curva padrão relativa e eficiência dos *primers*. Para todos esses ensaios foi utilizado o equipamento Step OnePlus™ System da Applied Biosystems (PLUS; MANUAL, 2006), programado para o modo fast de acordo com o manual do kit GoTaq qPCR Master Mix da Promega Corporation.

A definição da condição de ciclagem foi de 1 ciclo inicial a 95 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60±2 °C por 30 segundos, dependendo do *primer* utilizado, e ao final uma rampa de temperatura começando em 60 °C, em modo *step and hold*, até 95 °C. Ao final de cada ensaio foi realizado um gradiente de temperatura, ou curva de *melting*, a fim de identificar se houve alguma contaminação do ensaio ou amplificação inespecífica dos *primers*. A faixa de temperatura foi programada de 60 °C a 95 °C, em método de *step and hold*. Esses ensaios de qPCR foram preparados utilizando o kit GoTaq qPCR Master Mix, com o corante intercalante SYBR Green®, de acordo com o manual da fabricante.

Assim, após a síntese dos *primers*, os mesmos foram diluídos conforme manual do fabricante e submetidos a ensaios de especificidade. Esse ensaio detecta a sequência alvo apropriada em vez de outros alvos não específicos também presentes em uma amostra (BUSTIN *et al.*, 2009). Também possui a finalidade de determinar os controles positivos para cada *primer*, bem como verificar se os mesmos estão funcionando, ou seja, amplificando. Sendo assim, o ensaio consistiu na realização de testes de amplificação com DNA genômico de estirpes candidatas, de preferência cepas que foram identificadas por sequenciamento NGS. Além disso, nesses mesmos ensaios foi também determinado a melhor temperatura de trabalho, ou seja, de anelamento mais apropriada para cada produto gerado. E por fim, por meio desses testes

também foi verificado a ocorrência de amplificações cruzadas (dupla amplificação) entre as espécies filogeneticamente correlacionadas, como por exemplo, as espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* e a formação de dímeros nos *primers*.

Para título de conhecimento, dímeros consistem em duas moléculas do iniciador (*primer*) que se ligaram (hibridizaram) uma à outra por causa de cadeias de bases complementares nos iniciadores. Como resultado, a DNA polimerase amplifica o dímero, levando à competição por reagentes de PCR, potencialmente inibindo a amplificação da sequência de DNA direcionada para a amplificação (CHOU *et al.*, 1992; PAPEL, 2008). É possível detectar a formação de dímeros na curva de *melting*, uma vez que a presença de duplos picos na curva, pode indicar a ocorrência de dímeros e contaminações (Apêndice I).

Logo após os ensaios de especificidade, os *primers* foram submetidos a ensaios de otimização, por titulação. Esse ensaio possuiu o intuito de determinar a concentração mínima e ideal de uso dos pares de *primers* capaz de gerar a máxima eficiência de amplificação na reação. Desse modo, para a titulação foram feitas alíquotas dos *primers* diluídos em 10 μ M, e posteriormente foram construídas seis reações em duplicata, variando a concentração final de cada *primers*, tanto direto quanto o reverso. Em seguida, a concentração padrão definida foi de 0.6 μ M, que correspondente a 0,3 μ L.

Após o ensaio de otimização foi realizada a curva padrão relativa de qPCR para cada par de *primer*, esse ensaio teve como objetivo estabelecer a quantidade inicial de DNA a ser utilizado para cada marcador e avaliar a eficiência da reação. Ademais, com a curva padrão são adquiridas informações importantes sobre o desempenho da reação, bem como vários parâmetros de reação, como *slope* (inclinação), *y-intercept* (interceptação y) e o coeficiente de correlação (R^2). Desse modo, a curva padrão foi construída inicialmente por uma concentração de DNA de 10 ng/ μ L, sendo posteriormente feitas diluições seriadas na proporção de 1:5, com no mínimo cinco pontos na curva, com concentrações variando de 10 ng/ μ L a 0,0016 ng/ μ L de DNA. Além disso, cada diluição foi realizada em triplicata.

Após os ensaios para composição da curva padrão, a eficiência de cada reação foi calculada. Esse cálculo consistiu em uma regressão linear do valor das diferenças do ciclo de quantificação (C_q) obtido em cada um dos pontos da curva padrão. Como a regressão influencia a inclinação (*slope*) da curva padrão, a seguinte equação foi definida por Bustin *et al.* (2009), para o cálculo da eficiência dos ensaios: $Eficiência = 10^{(-\frac{1}{slope})} - 1$

Os dados obtidos em cada ponto foram então analisados para gerar a curva padrão de cada controle positivo, além de verificar a eficiência do ensaio, definir o *threshold* (limiar) e

analisar a confiabilidade dos resultados. Além disso, as curvas de amplificação foram analisadas, com o intuito de verificar erros que o programa possa ter cometido, por exemplo, como a definição errada dos valores da linha de base, que podem gerar curvas de amplificação errôneas. Também foram avaliados a linha de base e os gráficos de *Multicomponent Plot*, com o objetivo de verificar se houve evaporação da reação durante o ensaio, presença de bolhas nos poços, e se o aparelho estava apresentando algum problema na detecção da fluorescência.

2.4.4. Seleção de estirpes para validação dos *primers*

Após definidos todos os parâmetros de uso dos *primers*, bem como determinados os controles positivos a serem usados, realizou-se a validação do método de identificação por qPCR. Desse modo, para a validação dos *primers* foram selecionadas ao acaso, 600 estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN.

2.4.5. Extração do DNA genômico

As estirpes selecionadas foram então cultivadas em meio EMBRAPA-ágar por 16 h a 30 °C (MONNERAT *et al.*, 2007). Passado o período de incubação, as colônias bacterianas foram coletadas, com auxílio de alça bacteriológica descartável estéril de 10 µL, e transferidas para um microtubo de polipropileno, onde a biomassa bacteriana foi ressuspensa em uma solução contendo 200 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA•Na₂) e 4 µL de lisozima (25 mg/ml). Em seguida, as amostras foram inoculadas em agitador orbital por 3 horas, em temperatura ambiente.

Para a extração de DNA adotou-se o seguinte protocolo: após a incubação das amostras, em agitador orbital, adicionou-se 20 µL de proteinase K (20 mg/mL) e 300 µL de tampão de lise, sendo composto por 20 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8; 38 mL de NaCl 5 M; 500 µL de Triton X-100 e 2 mL de SDS 10%. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C, por 10 minutos. Após o resfriamento das soluções bacterianas, realizou-se o processo de precipitação do DNA, em que consistiu na adição de 500 µL álcool etílico 100% gelado. O DNA extraído foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, e posteriormente purificado por duas lavagens com 500 µL de álcool etílico 70%, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O DNA foi diluído com TE 0,1X (1 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA•Na₂).

O DNA obtido foi quantificado pelo aparelho Quantus™ Fluorometer, usando o kit QuantiFluor® ONE dsDNA System (PROMEGA CORPORATION, 2015), de acordo com o manual do fabricante. Somente foram aceitos DNAs com valor acima de 10 ng/μL. Depois de quantificado, foi verificado o grau de pureza de cada DNA com espectrofotômetro Picodrop, por meio das análises das razões A260/280 e A260/230. A primeira é uma avaliação primária de pureza, onde o intervalo desejado para estirpes de DNA é 1.8-2.0, com razões menores que 1.7, indicando contaminação de proteínas e/ou fenol; a segunda é uma avaliação secundária de pureza, com intervalo desejado entre 1.8-2.2, com razões menores que 1.7, indicando contaminação com sal e/ou anéis de guanidina (BUSTIN *et al.*, 2009).

2.4.6. Ensaios de identificação (detecção) por qPCR

Inicialmente, para a concepção dos ensaios por qPCR, os DNAs genômicos das 600 estirpes foram diluídos em uma concentração padrão de 10 ng/μL. Para a construção das reações de qPCR utilizou-se o kit GoTaq qPCR Master Mix, e as concentrações dos reagentes foram de acordo com o manual do fabricante. Assim, o volume final de cada sistema de reação foi de 20 μL, distribuídos nos seguintes volumes e reagentes: dH₂O 8,2 μL; *Primer* (F) – 0,3 μL; *Primer* (R) – 0,3 μL; Mix qPCR – 10 μL, CXR- 0,2 μL, DNA – 1 μL.

Foi utilizado o equipamento Step OnePlus™ System da Applied Biosystems (PLUS; MANUAL, 2006), programado para o modo fast de acordo com o manual do kit GoTaq qPCR Master Mix, para todos os ensaios de identificação. O sistema de ciclagem foi definido em 1 ciclo inicial a 95 °C por 20 segundos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e, 60±2 °C por 30 segundos, dependendo do *primer* utilizado. Posteriormente, foi programado uma rampa de temperatura, em modo *step and hold*, de 60±2 °C a 95 °C por 15 segundos. Ao final, para a construção do gradiente de temperatura ou curva de *melting*, uma faixa de temperatura foi programada para 60 °C por 1 minuto, e posteriormente 95 °C por 15 segundos.

2.4.7. Análise Estatística

A análise dos dados de identificação das 600 estirpes baseou-se na distribuição de frequência absoluta, além da estatística descritiva, sendo os dados apresentados por meio do emprego de Gráficos e Tabelas.

Os índices de Simpson e Shannon-Wiener foram calculados pelo programa Past 4.0 (HAMMER, 2001), com o intuito de determinar a diversidade de espécies presentes dentro das

amostras identificadas. Assim, o índice de Simpson é considerado um índice de dominância e reflete a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie, quanto mais próximo de 1 (um), maior a probabilidade dos indivíduos serem da mesma espécie, e conseqüentemente menor é a diversidade presente dentro da comunidade (URAMOTO *et al.*, 2005).

O índice de Shannon-Wiener (Weaver), no entanto, é um índice de diversidade de espécies que considera igual o peso entre as espécies raras e abundantes, seus valores ficam entre 1.5 e 3.5, raramente acima de 5 (cinco), e quanto maior for o valor do índice, maior será a diversidade de espécies (URAMOTO *et al.*, 2005).

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1. Ensaios de especificidade, curva padrão e eficiência dos *primers*

Parte da implementação de um ensaio ideal de PCR em tempo real envolve a otimização da reação para garantir que todos os parâmetros sejam ajustados, a fim de se obter resultados mais precisos. A validação do ensaio acompanhada de quaisquer ajustes de reação necessários, deve ser realizada sempre que um novo gene estiver sendo estudado, ou quando os parâmetros do ensaio forem alterados. Isso pode envolver o ajuste das concentrações de *primer*, temperaturas e tempos de termociclagem.

Dessa forma, os ensaios iniciais de qPCR foram realizados para verificar a especificidade dos *primers* projetados e, determinar um protocolo de identificação rápido e prático para espécies bacterianas do gênero *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Priestia* e *Paenibacillus*. Ademais, todas as informações sobre os pares de *primers*, como genes alvos, sequências 5' – 3', temperatura de anelamento, e amplificação estão descritas na Tabela 1. Além disso, é importante ressaltar que devido a variabilidade populacional existente dentro das espécies de *B. thuringiensis*, *B. tropicus* e *B. toyonensis* foram necessários o desenho e construção de mais um par de *primer* para identificação dessas espécies.

Assim, inicialmente, pelos ensaios de especificidade foi possível verificar que 19 *primers* obtiveram resultados satisfatórios, uma vez que os mesmos seguiram três parâmetros fundamentais de funcionalidade, ou seja, os *primers* corresponderam adequadamente com a estirpe candidata a controle positivo (houve amplificação sensível e específica), não apresentaram formação de dímeros (ligação de duas moléculas do iniciador – *primer*), e não apresentaram amplificação cruzada (amplificação ambígua) com espécies consideradas filogeneticamente correlacionadas. Desse modo, os *primers* que obtiveram esses resultados

foram destinados a identificação das espécies de *B. thuringiensis* (primers 1, 2 e 5), *B. luti*, *B. tropicus* (primer 3), *Bacillus toyonensis* (primers 1 e 2), *B. mycoides*, *Priestia megaterium* (*B. megaterium*), *P. aryabhatai* (*B. aryabhatai*), *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *B. spizizenii*, *Lysinibacillus sphaericus* e *Brevibacillus laterosporus*.

Além disso, três primers seguiram dois dos três princípios de funcionalidade, como amplificação correspondente com a estirpe candidata a controle positivo e não formação de dímeros. Entretanto, os mesmos apresentaram amplificação ambígua com espécies intimamente ligadas, por exemplo, com o primer de *B. cereus* houve a amplificação inequívoca de algumas estirpes de *B. thuringiensis*, e com os primers de *B. velezensis* e *B. methylotrophicus* houve a amplificação de determinadas estirpes de *B. amyloliquefaciens*.

Wei *et al.* (2018) abordam que o método de identificação utilizando biomarcadores para diferenciação e discriminação de espécies do grupo *B. cereus* é complexo e demorado, devido à proximidade genética entre espécies. Helgason *et al.* (2000) descrevem ainda que *Bacillus cereus* é uma espécie mais ancestral, com muitas linhagens pertencentes às variantes *B. anthracis* e *B. thuringiensis* codificando suas propriedades fenotípicas e características do DNA extracromossômico. Além disso, historicamente, a identificação de espécies do grupo *B. cereus* baseou-se em seu conteúdo plasmidial, ou seja, *B. thuringiensis* abriga vários plasmídeos que codificam uma grande variedade de toxinas inseticidas, como Cry e Cyt, que formam cristais parasporais característicos da espécie e, que são tóxicos a diversos tipos de pragas (LERECLUS *et al.*, 1984; KRONSTAD; WHITELEY, 1984). *B. cereus*, no entanto, abriga o plasmídeo pCER270 que codifica os componentes enzimáticos necessários para biossíntese não ribossomal da toxina cereulide, que causa intoxicação em humanos (EHLING-SCHULZ *et al.*, 2006; RASKO *et al.*, 2007). Entretanto, experimentos genéticos revelaram que as espécies pertencentes a esse grupo podem mover seus plasmídeos por conjugação e transdução (THORNE, 1993; TIMMERY *et al.*, 2009) e essa transferência de plasmídeo pode alterar drasticamente seus fenótipos (HELGASON *et al.*, 2000). Além disso, de acordo com Thorne (1993) a perda desses plasmídeos, mais especificamente de genes codificadores de toxinas inseticidas presentes em *B. thuringiensis*, pode acarretar na a proximidade fenotípica e genética entre as espécies de *B. thuringiensis* e *B. cereus*, tornando-as indistinguíveis.

Dessa forma, com o intuito de evitar identificações errôneas no processo de validação do método por qPCR, o primer destinado a identificação de espécies de *B. thuringiensis* foi utilizado primeiro e, posteriormente a essa primeira triagem o primer desenvolvido para *B.*

cereus. Também como medida auxiliar no processo identificação foram usadas descrições citomorfológicas, como a presença ou ausência de inclusões proteicas (cristais) nas estirpes, e triagem de genes *cry* por qPCR, em casos mais extremos.

Houve também à amplificação cruzada entre os *primers* destinados a identificação das espécies *Bacillus methylotrophicus* e *Bacillus velezensis* com estirpes de *B. amyloliquefaciens*. No entanto, ressalta-se que a amplificação ambígua do *primer* de *B. methylotrophicus* não foi comum a todas as cepas *B. amyloliquefaciens*, porém para o *primer* de *B. velezensis* sim. Esse resultado é condizente com que foi observado no Capítulo 1, uma vez que essas espécies são consideradas por alguns autores como espécies semelhantes. Além disso, essa tese é elucidada por Fan *et al.* (2017) que relatam que estudos filogenéticos mostraram que as espécies de *B. methylotrophicus*, *B. velezensis*, *B. oryzicola*, *B. vanillea* e *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* apresentam genomas extremamente similares, e que *B. amyloliquefaciens* faz parte de um grupo operacional composto por ele e mais três espécies bacterianas filogeneticamente próximas, como o *B. siamensis*, *B. velezensis* e *B. nakamurai*.

Ainda, *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* e *B. oryzicola* fazem parte de um grupo coespecífico de *B. velezensis* e são consideradas como sinônimos heterotípicos dessa espécie (DUNLAP *et al.*, 2016; NGALIMAT *et al.*, 2021). Além disso, segundo Dunlap *et al.* (2016) a identificação e discriminação das espécies de *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens* por biomarcadores é complexa e muitas vezes falha, uma vez que pares de *primers* direcionados a genes de manutenção não foram capazes de distinguir *B. velezensis* de *B. amyloliquefaciens* e até mesmo *B. subtilis* devido às relações próximas entre essas espécies.

Ademais, os *primers* desenvolvidos para a identificação de espécies como *Bacillus paranthracis*, *Bacillus tropicus* (*primers* 1 e 2), *B. toyonensis* (*primer* 3), *Bacillus albus*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus nakamurai*, *Bacillus paralicheniformis*, *Lysinibacillus fusiformis* e *Paenibacillus alvei* não apresentaram bons resultados, uma vez que os mesmos não atingiram os parâmetros estabelecidos nos ensaios de especificidade (funcionalidade) dos *primers*. Assim, alguns *primers* apresentaram inespecificidade no processo de identificação, ou seja, amplificaram para mais de uma espécie, seja ela intimamente relacionada ou não, não apresentaram amplificação com a estirpe candidata a controle positivo, houve a formação de dímeros, que não foram resolvidos por ajustes de temperatura ou concentração do *primer*, e/ou simplesmente não houve qualquer tipo de amplificação. Desse modo, esses *primers* não prosseguiram para as análises posteriores.

Tabela 1. Sequências dos *primers* e suas respectivas características e genes alvos. As letras "F" e "R" representam os *primers* forward (direto) e reverse (reverso).

Espécie	Gene Alvo	Sequências (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Tm (°C)	Amplificação
<i>B. albus</i>	<i>gyrA</i>	F – CCGTTGCTTGTTCCCTACAATAAT	23	39.1	61	Não
		R- ACGGTTTAATTGCAATCTCTCTTC	24	37.5		
<i>B. amyloliquefaciens</i>	<i>gyrA</i>	F – CCCGGAAGAAGAGTAAGACAA	22	45.5	60	Sim
		R - CTTCGAGAATCTCATGCCTAC	22	50.0		
<i>B. aryabhatai</i>	<i>RsfA</i>	F – GCATCTGTAGAGCATGTGGAA	21	47.6	60	Sim
		R - CCTCACTGCTGCTTCTTTCT	20	50.0		
<i>B. atrophaeus</i>	<i>gyrA</i>	F – GCTTACTGACCGATTGATGTTTG	23	43.5	60	Sim
		R - GCCGTTACTGTACCTGTCATT	21	47.6		
<i>B. cereus</i>	<i>spo0M</i>	F – GTGCATACGACCGACTAGAAA	21	47.6	61	Sim**
		R - AAGCGCCTCAGCGAATAA	18	54.6		
<i>B. spizizenii</i>	<i>gyrB</i>	F – CGTCCTGCGGTAGAAGTTATT	21	47.6	61	Sim
		R - GCAGTCCTCCAGACACTTTAT	21	47.6		
<i>B. licheniformis</i>	<i>gyrA</i>	F – GCTTCCGGAATTGATGGAGA	20	50.0	60	Sim
		R - CTTTGGCTCGAAGCGTAATTG	21	47.6		

Continuação...

Espécie	Gene Alvo	Sequências (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Tm (°C)	Amplificação
<i>B. luti</i>	<i>DUF4179</i>	F - CGCTATCATTAGATTGAAACACG	23	39.1	61	Sim
		R - TTGCGACAAATCAAGCAGAA	20	40.0		
<i>B. megaterium</i>	<i>gryA</i>	F – AGATTATTCCAGGCCAGATTT	22	40.9	60	Sim
		R - AGTTTCATAAGCTTTACGAATGCC	24	37.5		
<i>B. methylotrophicus</i>	<i>XRE</i>	F – CCGATCCGGAGACATTAAGAA	22	45.5	60	Sim*
		R - GATCCAATTTAGATTTGGGTCTGTC	25	40.0		
<i>B. mycooides</i>	<i>groEL</i>	F – CAAGAGAAAGCTTCACATGCTTAT	24	37.5	61	Sim
		R - CGTGTTACAGTTAATTGCCTT	22	40.9		
<i>B. nakamurai</i>	<i>RecQ</i>	F – AAACGAAGATAAAGCGAGGTT	21	38.1	60	Não
		R -GCAAACCTTTCGTAGCCGAAATA	22	40.9		
<i>B. pacificus</i>	<i>VOC</i>	F – TCATCGTAGCGAGAGATACTTAC	23	43.5	62	Não
		R - GGGTTGGCTCTGTATGAGTA	20	50.0		
<i>B. paralicheniformis</i>	<i>IF - 2</i>	F – GGCAGCTTGCCGAAGAG	17	64.7	60	Não
		R - GTTGCCATAGTGCCGAGA	18	55.6		

Continuação...

Espécie	Gene Alvo	Sequências (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Tm (°C)	Amplificação
<i>B. paranthracis</i>	<i>pheS</i>	F – TGAAGCGATTCAAACCTCGT	19	42.1	62	Não
		R - TTAGCTAATTTTCGCTTCGATTACTG	25	36.0		
<i>B. pseudomycooides</i>	<i>DNA topo I</i>	F – AGCAGCTATACGAAGGGATAGA	22	45.5	61	Não
		R - GAGCTTCCTCTTGAGCAGTTT	21	47.6		
<i>B. pumilus</i>	<i>gryA</i>	F – GCTACTATCCGCTCATCTAATGATA	25	40.0	60	Sim
		R - CTTCTGATTGAGCTTCTGTAAAGTC	25	40.0		
<i>B. safensis</i>	<i>gyrB</i>	F – TTGGGTCAACCAATGCAAA	19	42.1	60	Sim
		R - CTGTACAATAACCAGCTAATGCC	23	43.5		
<i>B. siamensis</i>	<i>gryA</i>	F - CTG AAA GAA TGT CTG GAG CAC TA	23	43.5	60	Não
		R - GCC TCC GCT TTA CGA AGT T	19	52.6		
<i>B. subtilis</i>	<i>gryA</i>	F – CGTAGGTATGGCAACAAACA	21	47.6	60	Sim
		R - GCCCTGGAATGACTTCCATAA G	22	50.0		
<i>B. thuringiensis (1)</i>	<i>ncRNA</i>	F - TGTGTATGAAGCTAGGTGAAGTC	23	43.5	61	Sim
		R - TTTCAGCCATCCGACCTATC	20	50.0		

Continuação...

Espécie	Gene Alvo	Sequências (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Tm (°C)	Amplificação
<i>B. thuringiensis</i> (2)	<i>ncRNA</i>	F – CCTACATGCATGATTTGTTAGTAGAC	26	38.5	61	Sim
		R - ATCCGACCTATCCTACACCATA	22	45.5		
<i>B. thuringiensis</i> (5)	<i>ncRNA</i>	F – GGCCTCTTTGAAGGTAGTCTC	21	52.4	61	Sim
		R - GTTCGATAACGAGAACCAAATCG	23	43.5		
<i>B. toyonensis</i> (1)	<i>RecQ</i>	F – TCACGTACTIONTGC GGAGTT	18	50.0	61	Sim
		R - TCGTATACTAGATTATCTCCCAGAA	25	36.0		
<i>B. toyonensis</i> (2)	<i>ncRNA</i>	F – CCTTAATTTAGGAATTTTCGGCTTTG	25	36.0	61	Sim
		R - GCAGTATATATGCCAGATTCCATTC	25	40.0		
<i>B. toyonensis</i> (3)	<i>gryA</i>	F – ATTGCAAAGCAGGGCTTAATG	21	42.9	61	Não
		R - CGTTGCAGACGCATGTCTA	19	52.6		
<i>B. tropicus</i> (1)	<i>PTS cello transporter</i>	F – AATAAGTCGTCTGGTTCGTATCC	23	43.5	61	Não
		R - GCGAGAGATACAATTGTTCAAAGT	24	37.5		
<i>B. tropicus</i> (2)	<i>LytR</i>	F – GAACTGATTTTCGGCGTTACAC	21	47.6	61	Não
		R - TGCAAGTAGAAGGTACGGATAAA	23	39.1		

Continuação...

Espécie	Gene Alvo	Sequências (5' – 3')	Tamanho (pb)	%GC	Tm (°C)	Amplificação
<i>B. tropicus</i> (3)	<i>LytR</i>	F – ACCATTAAGAGTCTGAACGC	21	42.9	62	Sim
		R - GGGTGAACCAGTGTCAATTT	20	45.0		
<i>B. velezensis</i>	<i>XRE</i>	F – GCAGGAAGAAGTCGCAAATC	20	50.0	60	Sim*
		R - CGTGTCGTAATCGGGTTCA	19	52.6		
<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>Camelysin</i>	F – GGTCTAACGTACCAGCTTGAAA	22	45.5	61	Não
		R - GGGAGTTGTCACTGCATCAATA	22	45.5		
<i>Brev. laterosporus</i>	<i>gryA</i>	F - CGGTTGGCACAAGATTTCAATA	22	40.9	60	Sim
		R - CGGGACTCAGTATAACGCATAG	22	50.0		
<i>Ly. fusiformis</i>	<i>ABC Transporter</i>	F – CACTCGGTACACCTGAAACA	20	50.0	60	Não
		R - TGACTCCCACAGTTGCATATT	21	42.9		
<i>Ly. sphaericus</i>	<i>gryA</i>	F - GAT TTC CCT ACT GGC GGA TT	20	50.0	60	Sim
		R - TTC CAC CTT CGC ACG AAT AA	20	45.0		
<i>Paenibacillus alvei</i>	<i>DNA polIII d</i>	F – TTCGAAGTAATGCCGAGTAACA	22	40.9	60	Não
		R - TTGGTCTAGGCAACTGGAATG	21	47.6		

*Amplificação cruzada com estirpes de *B. amyloliquefaciens*.

** Amplificação cruzada com estirpes de *B. thuringiensis*.

Posteriormente aos ensaios de especificidade, os *primers* selecionados prosseguiram para as construções e análises das curvas padrões de cada controle positivo. Ressalta-se que os testes para construção da curva de eficiência para o *primer* de *B. velezensis* não produziram bons resultados, dessa forma, esse *primer* foi retirado da análise. Assim, a eficiência da reação e os parâmetros de uso para cada *primer* foram calculados e foram apresentados na Tabela 2. Também, o *threshold*, caracterizado como o desvio padrão médio de Rn (*reporter normalizado* - intensidade de emissão de fluorescência do corante *reporter* dividida pela intensidade de emissão de fluorescência do corante da referência passiva) para os ciclos iniciais da PCR, multiplicado por um fator ajustável, foi definido, com o intuito de afirmar quais estirpes são positivas e quais são negativas. Não há uma regra para definição do *threshold*, porém deve ser definido após o *baseline*, na fase exponencial da reação (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). Os gráficos de amplificação, eficiência e curva de *melting* estão apresentados no Apêndice I.

Para que uma reação seja considerada como boa, a eficiência calculada da reação deve estar dentro do recomendado por MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), cujos valores ficam entre 95% e 105%, o que também corresponde a uma inclinação das retas (*slope*) de -3,58 a -3,10 (BUSTIN *et al.*, 2009). Dessa forma, com os resultados obtidos foi possível constatar que todas as reações foram condizentes com os valores recomendados de eficiência e *slope*.

Os valores de R² (coeficiente de correlação) foram superiores aos valores estabelecidos de 0,98 (BUSTIN *et al.*, 2009), o que indica que houve a determinação da linearidade da curva, bem como que os erros de pipetagem foram mínimos, e que existe uma correlação entre Cqs e variações na concentração de DNA. Valores de R² abaixo de 0,95 podem indicar erros no ensaio (BUSTIN *et al.*, 2009).

No mais, entende-se que a eficiência real pode fornecer informações valiosas sobre a reação. Fatores experimentais como comprimento, estrutura secundária e conteúdo de GC do amplicon podem influenciar na eficiência. Além disso, outros fatores, como o uso de concentrações de reagentes não ideais e a qualidade da enzima, podem resultar em eficiências abaixo de 90%. E a presença de inibidores de PCR em um ou mais dos reagentes pode produzir eficiências superiores a 110% (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Tabela 2. Alvos, estirpes de referência e seus respectivos parâmetros após construção da curva padrão.

Alvo	Código	R²	Eff%	Y-intercept	Slope	Tm (°C)
<i>B. amyloliquefaciens</i>	S2784	0.98	104.31	17,731	-3,223	82.74
<i>P. aryabhatai</i>	S2566	0.98	104.65	19,375	-3.215	79.88
<i>B. atrophaeus</i>	S2792	0.98	101.08	17.851	-3,296	79.01
<i>B. cereus</i>	S0953	0.98	106.71	23,716	-3,171	78.81
<i>B. licheniformis</i>	S2777	0.98	99.34	17.832	-3.338	82.88
<i>B. luti</i>	S1624	0.98	96.01	19.135	-3.421	76.93
<i>P. megaterium</i>	S1338	0.99	104.18	19.938	-3.226	81.55
<i>B. methylotrophicus</i>	S2787	0.99	95.51	21.214	-3,434	78.40
<i>B. mycoides</i>	S2786	0.99	105.68	17.244	-3.193	80.21
<i>B. pumilus</i>	S2795	0.99	100.52	21,704	-3,310	77.52
<i>B. safensis</i>	S1657	0.99	98.85	16.661	-3.350	79.76
<i>B. spizizenii</i>	S2893	0.98	104.83	15.348	-3.211	80.89
<i>B. subtilis</i>	S2796	0.98	102.59	16.272	-3.261	82.29
<i>B. thuringiensis</i> (1)	S1450	0.99	97.04	16.555	-3.395	80.34
<i>B. thuringiensis</i> (2)	S1450	0.98	95.62	16.945	-3.431	79.85
<i>B. thuringiensis</i> (5)	S0075	0.98	101.49	19.859	-3.287	80.00
<i>B. toyonensis</i> (1)	S1647	0.98	97.30	19,473	-3,393	75.47
<i>B. toyonensis</i> (2)	S1647	0.98	95.24	20,742	-3,403	75.44
<i>B. tropicus</i> (3)	S0043	0.98	105.40	19.176	-3.199	81.10
<i>Brev. laterosporus</i>	S1438	0.99	95.45	16.001	-3,436	83.78
<i>Ly. sphaericus</i>	S0002	0.99	105.20	17,091	-3,182	81.40

Em que: Eff% = eficiência %. Tm (°C) = temperatura na curva de *melting*.

As análises comparativas entre as variações de C_{Ts} (ciclo limiar) em função das diluições de DNA, adquiridos dos ensaios das curvas de eficiência de cada *primer* estão apresentadas na Tabela 3. Assim, os resultados observados indicaram que houve uma variação média de C_{Ts} de 2 – 4, em função das concentrações de DNA testadas. O ciclo limiar (C_t) corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para o início da amplificação, ou seja, o momento em que a fluorescência emitida ultrapassa a linha do limite. O C_t tem relação inversamente proporcional à quantidade de sequência alvo presente na amostra. Assim, para que uma PCR esteja operando com 100% de eficiência, é necessário que a quantidade do

produto inicial dobre perfeitamente durante cada ciclo. No mais, a faixa dinâmica de uma reação linear, cujo aumento na concentração do material de partida resulta em um aumento correspondente no produto de amplificação, deve pelo menos possuir um intervalo de 3 a 4 log, para DNA genômico (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Sendo assim, os resultados adquiridos corroboram com a discussão apresentada, uma vez que houve a duplicação do produto de amplificação a cada ciclo da qPCR, sobretudo em grande parte dos pares de *primers*. No entanto, em alguns casos, houve a quadruplicação do produto gerado em função das menores concentrações (diluições) de DNA, como em 0.08 ng/ μ L e 0.0016 ng/ μ L, isso provavelmente deve-se a quantidade de DNA presente na amostra, o que acarretaria a necessidade de mais ciclos de amplificação para replicação do DNA, e posteriormente amplificação do produto.

Tabela 3. Variação média de C_{Ts} em função das diluições do DNA.

<i>Primers</i>	Variações de C_{Ts} (ΔC_T)				
	Concentração de DNA (ng/ μ L)				
	10	2	0.4	0.08	0.016
<i>B. amyloliquefaciens</i>	15.03*	16.50	18.80	21.20	23.50
<i>B. atrophaeus</i>	15.16	16.66	18.60	21.46	23.90
<i>B. cereus</i>	21.26	23.26	26.16	28,73	30.92
<i>B. licheniformis</i>	15.02	17.66	21.16	25.05	29.09
<i>B. luti</i>	16.34	18.05	20.04	23.32	26.31
<i>B. methylotrophicus</i>	17.90	20.50	22.43	24.86	27.46
<i>B. mycoides</i>	16.26	18.73	21.06	22.73	25.07
<i>B. pumilus</i>	21.73	23.60	26.16	29.06	32.20
<i>B. safensis</i>	12.51	14.40	16.51	19.33	21.56
<i>B. spizizenii</i>	12.16	15.03	15.86	18.32	21.46
<i>B. subtilis</i>	9.90	12.30	15.80	19.75	23.55
<i>B. thuringiensis</i> (1)	16.60	18.76	21.73	24.93	27.80
<i>B. thuringiensis</i> (2)	14.20	15.46	17.70	20.70	23.36
<i>B. thuringiensis</i> (5)	13.33	15.34	18.50	20.30	22.26
<i>B. toyonensis</i>	21.83	24.65	29.05	34.07	38.66
<i>B. tropicus</i>	16.73	17.80	20.00	22.53	25.43
<i>Brev. laterosporus</i>	13.03	14.55	17.06	19.52	22.20

Continuação...

Variações de C _{Ts} (ΔC_T)					
Concentração de DNA (ng/ μ L)					
<i>Primers</i>	10	2	0.4	0.08	0.016
<i>Ly. sphaericus</i>	13.96	16.20	17.90	20.85	22.50
<i>P. aryabhatai</i>	16.30	17.50	19.75	22.40	24.85
<i>P. megaterium</i>	16.43	19.03	21.40	23.70	24.73

* As médias foram definidas sob ajuste do *threshold*.

2.5.2. Identificação de estirpes por qPCR

Após definidos todos os parâmetros a serem adotados com o uso dos *primers* para qPCR, e a definição das estirpes de referência (controles positivos), realizou-se o processo de identificação das 600 estirpes selecionadas da Coleção de Bactérias de Invertebrados – CENARGEN, como forma de validação do método.

Desse modo, esse ensaio proporcionou a identificação correta e precisa de 458 espécies, dentre as 600 estirpes selecionadas. Porém, é interessante observar que, em conjunto, 80% das espécies identificadas nesse ensaio foram de estirpes pertencentes ao grupo filogenético *Bacillus cereus sensu lato*, composto por *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. luti*, *B. toyonensis*, *B. tropicus* e *B. mycoides* (Tabela 4).

Entende-se que a Coleção de Bactéria de Invertebrados foi originalmente proposta e composta para preservar espécies de *B. thuringiensis*, devido a sua função entomopatogênica. No entanto, as estirpes dessa espécie eram anteriormente selecionadas e isoladas por métodos tradicionais de identificação, propostos pelos protocolos de isolamento da OMS (WORD, 1985; 1987). Assim, as metodologias de isolamento abrangidas por esses protocolos são baseadas na resistência ao antibiótico penicilina e a presença de inclusões proteicas (cristais) produzidas pela espécie *B. thuringiensis*. Contudo, como abordado no Capítulo 4, esse processo de identificação é falho, uma vez que várias espécies, inclusive as pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* são capazes de resistir à ação desse composto antimicrobiano. Além disso, as caracterizações morfológicas das estirpes relacionadas a esse grupo são bastante similares, com exceção da estirpe de *B. mycoides*, ao qual possui uma caracterização extremamente diversa das espécies do mesmo grupo filogenético (Capítulo 3). Assim, ensaios de isolamento por resistência à penicilina juntamente com a caracterização morfológica das colônias pode levar a identificações errôneas das espécies desse grupo.

Ainda, a citomorfologia de *B. thuringiensis* garante sim uma diferença primordial em comparação as outras espécies do mesmo grupo, devido a capacidade da espécie em produzir inclusões proteicas (cristais) visíveis em microscópio. No entanto, como descrito anteriormente, se a espécie de *B. thuringiensis* perde capacidade de gerar os genes codificadores de toxinas inseticidas (plasmídeos), o Bt fica indistinguível de *B. cereus* (THORNE, 1993), o que poderia levar a confusões de identificação entre essas duas espécies. Além disso, a produção de cristais parasporais não é somente exclusiva ao Bt, existem outras espécies capazes de produzirem inclusões proteicas, como por exemplo, *Lysinibacillus sphaericus* (JONES *et al.*, 2007), *Paenibacillus popilliae* (ZHANG *et al.*, 1997), *Brevibacillus laterosporus* (SMIRNOVA *et al.*, 1996), *Paenibacillus lentimorbis* (YOKOYAMA *et al.*, 2004), *Bacillus pumilus* (GARCIA-RAMON *et al.*, 2016).

Assim, ensaios bioquímicos e fenotípicos são frequentemente usados para atribuir novas cepas ao grupo *B. cereus*, por serem práticos e mais baratos, porém não são suficientes para garantir uma classificação taxonômica precisa em escala genômica (ACEVEDO *et al.*, 2020).

Tabela 4. Perfil de frequência das espécies identificadas entre as 600 estirpes da Coleção de Bactérias de Invertebrados.

Espécie - Alvo	Frequência	%
<i>B. cereus</i>	172	37,55%
<i>B. thuringiensis</i>	157	34,27%
<i>P. megaterium</i>	21	4,58%
<i>B. subtilis</i>	17	3,71%
<i>B. luti</i>	14	3,05%
<i>B. amyloliquefaciens</i>	13	2,83%
<i>Ly. sphaericus</i>	13	2,83%
<i>P. aryabhatai</i>	10	2,18%
<i>B. toyonensis</i>	10	2,18%
<i>B. tropicus</i>	9	1,96%
<i>B. pumilus</i>	8	1,74%
<i>B. mycoides</i>	7	1,52%
<i>Brev. laterosporus</i>	5	1,09%
<i>B. safensis</i>	2	0,43%
<i>B. atrophaeus</i>	0	0%
<i>B. licheniformis</i>	0	0%
<i>B. methylotrophicus</i>	0	0%
<i>B. spizizenii</i>	0	0%

Total	458	100%
--------------	------------	-------------

Por fim, análises moleculares baseadas no sequenciamento do gene 16 rRNA foram e ainda são muito utilizadas como principal ferramenta para atribuição taxonômica das espécies pertencentes ao gênero *Bacillus*. No entanto, membros do grupo *Bacillus cereus s.l* possuem rRNA 16S e 23S altamente semelhantes, indicando que essas espécies divergiram de uma linhagem evolutiva comum. Desse modo, a identificação baseada em genes 16S rRNA não garante uma distinção coesa dessas bactérias (HUANG et al., 2012; LIU *et al.*, 2015; PATIÑO-NAVARRET; SANCHIS, 2017; CHO *et al.*, 2018). Assim, o desenvolvimento de *primers*, baseados em genes alvos específicos, para identificação de espécies desse grupo foi de suma importância para reclassificar diversas estirpes alocadas erroneamente dentro da coleção, uma vez que esses produtos geraram uma identificação precisa, rigorosa e relativamente prática.

Também foi possível identificar com os *primers* desenvolvidos, espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*, como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. safensis* e *B. amyloliquefaciens*. No entanto, não foram identificadas espécies como *B. atropheus*, *B. licheniformis*, *B. methylotrophicus* e *B. spizizenii* que também fazem parte desse mesmo grupo.

Espécies como *P. megaterium*, *P. aryabhatai*, *Lysinibacillus sphaericus* e *Brevibacillus laterosporus* também foram identificadas durante o processo de validação e identificação, demonstrando assim, uma pequena diversidade de espécies, além do gênero *Bacillus*, presentes no número amostral de 600 estirpes advindas da coleção.

Todavia, 142 estirpes não foram identificadas por meio dos *primers* desenvolvidos. A não identificação dessas estirpes deve-se a diversos fatores, como possível degradação do DNA genômico, possíveis contaminantes não eliminados no processo de extração, aos quais poderiam interferir no processo de amplificação por qPCR, possíveis erros no processo de montagem das reações de qPCR, ou especificamente pela existência de espécies diferentes daquelas pleiteadas inicialmente para confecção dos *primers*.

2.5.3. Diversidade de espécies

Para determinar a diversidade de espécies bacterianas presentes dentro do grupo de amostras identificadas, foram calculados os índices de Simpson e Shannon-Wiener (Weaver). Entende-se que na análise da diversidade microbiana, dois fatores devem ser levados em consideração ao medir a diversidade de uma amostra, a riqueza e uniformidade. A riqueza refere-se ao número de espécies diferentes presentes em um determinado nicho. A uniformidade

compara a equitabilidade do tamanho da população de uma das espécies presentes. E em geral, quando a riqueza de espécies e a uniformidade aumentam, a diversidade também aumenta (KIM *et al.*, 2017). Assim, os índices de diversidade de Shannon-Wiener (Weaver) e Simpson têm sido recomendados para medir de forma robusta a diversidade microbiana (HAEGEMAN *et al.*, 2013).

Desse modo, o índice de Simpson calculado foi de 0.733, o que sugere que a diversidade existente no conjunto de amostras identificadas foi relativamente baixa, devido a esse valor estar mais próximo de 1 (um). Entende-se que quanto mais alto for o índice de Simpson, maior será a probabilidade de os indivíduos serem da mesma espécie, ou seja, maior dominância e menor diversidade. Assim, constatou-se que devido à alta predominância e dominância de estirpes identificadas das espécies de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, ao qual corresponderam com 72% das amostras identificadas, a diversidade de espécies dentro do conjunto de amostras identificadas foi reduzida.

O valor estimado para o índice de Shannon foi de 1.75, o que sugere que a diversidade de espécies dentro da amostra foi também relativamente baixa. Esse índice mede o grau de incerteza em prever que a espécie pertencerá um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécie e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza em selecionar uma espécie específica dentro da amostra, portanto, a diversidade da amostra é considerada baixa (URAMOTO *et al.*, 2005). Além disso, esse índice mede a riqueza e uniformidade da amostra, no entanto, devido ao padrão de distribuição dos indivíduos entre espécies (uniformidade) ser proporcional à diversidade, a equidade das amostras identificadas também foi considerada proporcionalmente baixa (Figura 1).

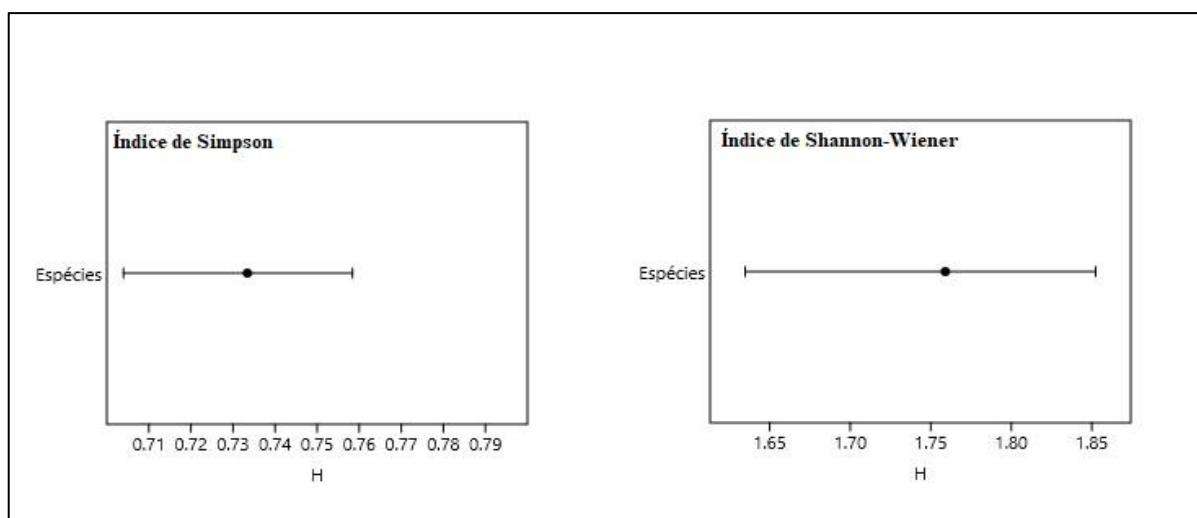


Figura 1. Índice de Simpson e Índice de Shannon – Wiener (Weaver) calculados.

SU *et al.* (2021) ao realizarem estudos com ensaios de qPCR para determinar a composição bacteriana ativa do solo, após aplicação de fertilizantes orgânicos por 30 anos, constataram que as espécies do gênero *Bacillus* foram as mais favorecidas pela adubação e com isso tornaram-se as mais abundantes e diversas no solo.

Raros são os estudos mensurando a diversidade de espécies bacterianas dos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* por ensaios qualitativos de identificação por qPCR. Grande parte da literatura está voltada para estudos relacionados a quantificação, ou seja, a expressão gênica, quantificação de genes específicos, e/ou quantificação de esporos de *Bacillus* em amostras de alimentos. Diante desses fatos, é importante enfatizar a relevância desse trabalho, uma vez que esse estudo criou uma base de dados, a partir do desenvolvimento de *primers* específicos, para a identificação coesa e precisa de espécies com importância biotecnológica, tornando-se uma ferramenta eficaz de identificação desses grupos bacterianos em coleções de microrganismos.

2.6. CONCLUSÕES

Foram obtidos *primers* de qPCR para identificação precisa e coesa de várias espécies de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*.

O desenvolvimento de *primers* específicos para qPCR garante uma identificação precisa de espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* tornando-se um excelente método de caracterização de coleções de bactérias, bem como para seleção de estirpes com interesse biotecnológico.

2.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, M. M.; CARROLL, L. M.; MUKHERJEE, M.; MILLS, E.; XIAOLI, L.; DUDLEY, E. G.; KOVAC, J. Novel effective *Bacillus cereus* group species “*Bacillus clarus*” is represented by antibiotic-producing strain ATCC 21929 isolated from soil. **mSphere**, v. 5, n. 6, p. e00882-20, 2020.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; WITWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CLIFFORD, R. J.; MILILLO, M.; PRESTWOOD, J.; QUINTERO, R.; ZURAWSKI, D. V.; KWAK, Y. I.; MC GANN, P. Detection of bacterial 16S rRNA and identification of four clinically important bacteria by real-time PCR. **PLoS one**, v. 7, n. 11, p. e48558, 2012.

CHO, M. S.; JIN, Y. J.; KANG, B. K.; PARK, Y. K.; KIM, C.; PARK, D. S. Understanding the ontogeny and succession of *Bacillus velezensis* and *B. subtilis* subsp. *subtilis* by focusing on kimchi fermentation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

CHO, K. M.; MATH, R. K.; ISLAM, S. M. A.; LIM, W. J.; HONG, S. Y.; KIM, J. M.; YUN, H. D. Novel multiplex PCR for the detection of lactic acid bacteria during kimchi fermentation. **Molecular and Cellular Probes**, v. 23, n. 2, p. 90-94, 2009.

DUNLAP, C. A.; KIM, S. J.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1212-1217, 2016.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; GRALLERT, H.; RIECK, P.; WAGNER, M.; SCHERER, S. Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid *pXO1*. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2006.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRIS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "operational group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

FRAITURE, M. A.; GOBBO, A.; PAPAZOVA, N.; ROOSENS, N. H. Development of a Taxon-Specific Real-Time PCR Method Targeting the *Bacillus subtilis* Group to Strengthen the Control of Genetically Modified Bacteria in Fermentation Products. **Fermentation**, v. 8, n. 2, p. 78, 2022.

FERNÁNDEZ-NO, I. C.; GUARDDON, M.; BÖHME, K.; CEPEDA, A.; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. **Food microbiology**, v. 28, n. 3, p. 605-610, 2011.

GARCIA-RAMON, D. C.; MOLINA, C. A.; OSUNA, A.; VÍLCHEZ, S. An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 8, p. 3637-3654, 2016.

HAEGEMAN, B.; HAMELIN, J.; MORIARTY, J.; NEAL, P.; DUSHOFF, J.; WEITZ, J. S. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. **The ISME journal**, v. 7, n. 6, p. 1092-1101, 2013.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HELGASON, E.; ØKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; KOLSTØ, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2627-2630, 2000.

HUANG, C. H.; CHANG, M. T.; HUANG, L.; CHU, W. S. Development of a novel PCR assay based on the gyrase B gene for species identification of *Bacillus licheniformis*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 26, n. 5, p. 215-217, 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JONES, G. W.; NIELSEN-LEROUX, C.; YANG, Y.; YUAN, Z.; FIUZA DUMAS, V.; MONNERAT, R. G.; BERRY, C. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; DRUMMOND, A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KĘDRAK-JABŁOŃSKA, A.; BUDNIAK, S.; SZCZAWIŃSKA, A.; REKSA, M.; KRUPA, M.; SZULOWSKI, K. Evaluation of real-time PCR based on SYBR Green I fluorescent dye for detection of *Bacillus anthracis* strains in biological samples. **Journal of veterinary research**, v. 62, n. 4, p. 549, 2018.

KIM, B. R.; SHIN, J.; GUEVARRA, R. B.; LEE, J. H.; KIM, D. W.; SEOL, K. H.; ISAACSON, R. E. Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089-2093, 2017.

KRONSTAD, J. W.; WHITELEY, H. R. Inverted repeat sequences flank a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. **Journal of bacteriology**, v. 160, n. 1, p. 95-102, 1984.

LERECLUS, D.; RIBIER, J.; KLIER, A.; MENOU, G.; LECADDET, M. M. A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 11, p. 2561-2567, 1984.

LIU, Y.; LAI, Q.; GÖKER, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WANG, M.; SUN, Y.; SHAO, Z. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2015.

LIFE TECHNOLOGIES. Real-time PCR handbook. **Applied Biosystems – Thermofisher**, p. 1-73, 2014.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical microbiology and infection**, v. 10, n. 3, p. 190-212, 2004.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against

Spodoptera frugiperda, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

NAKANO, M. Development of a multiplex real-time PCR assay for the identification and quantification of group-specific *Bacillus spp.* and the genus *Paenibacillus*. **International journal of food microbiology**, v. 323, p. 108573, 2020.

NGALIMAT, M. S.; YAHAYA, R. S. R.; BAHARUDIN, M. M. A. A.; YAMINUDIN, S. M.; KARIM, M.; AHMAD, S. A.; SABRI, S. A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 614, 2021.

OLIWA-STASIAK, K.; KOLAJ-ROBIN, O.; ADLEY, C. C. Development of real-time PCR assays for detection and quantification of *Bacillus cereus* group species: differentiation of *B. weihenstephanensis* and rhizoid *B. pseudomycooides* isolates from milk. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 1, p. 80-88, 2011.

PATIÑO-NAVARRETE, R.; SANCHIS, V. Evolutionary processes and environmental factors underlying the genetic diversity and lifestyles of *Bacillus cereus* group bacteria. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 309-318, 2017.

PLUS, A. P.; MANUAL, P. A. K. U. S. **PCR Amplification Kit User's**. Applied Biosystems. Foster City, California, 2006.

POSTOLLEC, F.; FALENTIN, H.; PAVAN, S.; COMBRISSE, J.; SOHIER, D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

PROMEGA CORPORATION. QuantiFluor R dsDNA System QuantiFluor R dsDNA System. **Technical Manual**, 2015.

RASKO, D. A.; ROSOVITZ, M. J.; ØKSTAD, O. A.; FOUTS, D. E.; JIANG, L.; CER, R. Z.; RAVEL, J. Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including *Bacillus anthracis* pXO1. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 1, p. 52-64, 2007.

SANGAL, V.; GOODFELLOW, M.; JONES, A. L.; SCHWALBE, E. C.; BLOM, J.; HOSKISSON, P. A.; SUTCLIFFE, I. C. Next-generation systematics: an innovative approach to resolve the structure of complex prokaryotic taxa. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

SMIRNOVA, T. A.; MINENKOVA, I. B.; ORLOVA, M. V.; LECADET, M. M.; AZIZBEKYAN, R. R. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. **Research in microbiology**, v. 147, n. 5, p. 343-350, 1996.

SU, X.; LI, G.; COTNER, J. B.; WEI, L.; WANG, Y.; PAN, T.; DING, K. Long-term organic fertilization changes soil active bacterial composition and multifunctionality: RNA-based bacterial community and qPCR-based SmartChip analysis. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, n. 2, p. 799-809, 2021.

TIMMERY S; MODRIE P; MINET O; MAHILLON J. Plasmid capture by the *Bacillus thuringiensis* conjugative plasmid pXO16. *Journal Bacteriology*, v. 191, p. 2197–2205, 2009.

THORNE CB. *Bacillus anthracis*, p 113–124. In Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (ed), *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Mole., 1933.

URAMOTO, K.; WALDER, J. M.; ZUCCHI, R. A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 33-39, 2005.

WEI, S.; CHELLIAH, R.; PARK, B. J.; PARK, J. H.; FORGHANI, F.; PARK, Y. S.; OH, D. H. Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimba) using quantitative real-time PCR targeting groEL and gyrB. **Microbial pathogenesis**, v. 115, p. 312-320, 2018.

WISHART, D. S.; STOTHARD, P.; DOMSELAAR, G. H. Van. PepTool™ and GeneTool™. **Bioinformatics Methods and Protocols**, p. 93-113, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1985). **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide**. Geneva: UNDP: World Bank: WHO, 24p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1987). **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification, and ecology of biocontrol agent disease vectors**. WHO Mimeograph Document, 87.

YOKOYAMA, T.; TANAKA, M.; HASEGAWA, M. Novel cry gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain *Semadara inhibits* ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. **Journal of invertebrate pathology**, v. 85, n. 1, p. 25-32, 2004.

ZHANG, J.; HODGMAN, T. C.; KRIEGER, L.; SCHNETTER, W.; SCHAIRER, H. U. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 13, p. 4336-4341, 1997.

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CITOMORFOLÓGICA DE ESPÉCIES DE *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Brevibacillus spp.* e *Priestia spp.*

RESUMO

Presumidamente a caracterização morfológica é um mecanismo primário de identificação bacteriana, sendo assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar 37 espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.* e *Brevibacillus spp.* pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por parâmetros morfológicos e citomorfológicos. A caracterização das morfológicas de colônias seguiu os princípios de Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Para a caracterização citomorfológica das estirpes utilizou-se a microscópio eletrônico de varredura, modelo Zeiss DSM 962. Deste modo, verificou-se que houve uma heterogeneidade de colônias entre as 37 estirpes, como exemplo, a estirpe S2786, *B. mycoides* diferiu-se das outras espécies por apresentar colônias com formato rizoide. Enquanto três estirpes de *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2785 e S2791) apresentaram modificações morfológicas durante o processo de incubação, uma vez que ocorreram inicialmente a formação de colônias circulares, lisas, aquosas e brilhosas e, posteriormente colônias irregulares, com aspecto rugoso e seco. Houve também colônias com coloração creme, branco e alaranjada, como na espécie de *B. atrophaeus* e aspecto brilhante, translúcido e opaco. Na citomorfologia foi possível observar que as espécies de *Bacillus cereus sensu lato* possuíram esporos elípticos a elipsoides, com formação de cristal na espécie de *B. thuringiensis*. As espécies pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, apresentaram forma de esporo cilíndrico, com comprimento variando de 0,7 a 1 µm, com exceção da espécie *B. spizizenii* (S2893) que apresentou esporos em formato esférico. Houve também esporos esféricos e esporângio em formato de raquete, aspecto esse pertencente as espécies do gênero *Lysinibacillus*. Conclui-se que as propriedades morfológicas e citomorfológicas das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* foram consideradas características relevantes e determinante no estudo da diversidade das populações desses gêneros.

Palavras-chaves: Colônias; Esporos; Cristal; MEV.

ABSTRACT

Presumably the morphological characterization is a primary mechanism of bacterial identification, therefore, the objective of this work was to characterize 37 species of *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp. and *Brevibacillus* spp. belonging to the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, by morphological and cytomorphological parameters. The characterization of colony morphology followed the principles of Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. For the cytomorphological characterization of the strains, a scanning electron microscope, model Zeiss DSM 962 was used. In this way, it was verified that there was a heterogeneity of colonies among the 37 strains, as an example, the strain S2786, *B. mycoides* differed of the other species for presenting colonies with rhizoid format. While three strains of *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2785 and S2791) showed morphological changes during the incubation process, since initially there were circular, smooth, watery and shiny colonies and, later, irregular colonies, with a rough and dry appearance. There were also colonies with cream, white and orange coloration, as in the species of *B. atrophaeus* and shiny, translucent and opaque appearance. In the cytomorphology, it was possible to observe that the species of *Bacillus cereus sensu lato* had elliptical to ellipsoid spores, with crystal formation in the species of *B. thuringiensis*. The species belonging to the *Bacillus subtilis sensu lato* group presented a cylindrical spore shape, with a length ranging from 0.7 to 1 μm , except for the species *B. spizizenii* (S2893) which presented spherical spores. There were also spherical spores and racket-shaped sporangia, an aspect belonging to the species of the genus *Lysinibacillus*. It is concluded that the morphological and cytomorphological properties of *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., *Priestia* spp. and *Brevibacillus* spp. they were considered relevant and determinant characteristics in the study of the diversity of the populations of these genera.

Keywords: Colonies; Spores; Crystal; MEV.

3.1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de formação da colônia, uma única bactéria é capaz de se dividir e criar uma colônia composta por bilhões de seus descendentes, organizados em uma estrutura ordenadamente notável (MAMOU *et al.*, 2016). Portanto, este recurso microbiológico torna-se um mecanismo primário e básico de caracterização, classificação e identificação, mesmo sendo considerado antiquado por vários autores. Todavia, a caracterização morfológica pode fornecer informações valiosas sobre a diversidade microbiana individual (KAUFMANN; SCHAIBLE, 2005; WEILE; KNABBE, 2009; SOUSA *et al.*, 2011, BRAGA *et al.*, 2013).

As colônias bacterianas apresentam variações morfológicas distintas, como diâmetro, forma, elevação, textura da superfície, cor, consistência e forma de adesão das mesmas no meio de cultura (RABINOVITCH *et al.*, 2017). Além disto, as bactérias, microscopicamente, também podem apresentar diferentes propriedades morfológicas, revelando-se esféricas (cocos), retangulares ou na forma de bastonetes (bacilos), encurvados (espirilos) e na forma de vírgula (vibriões) que variam fundamentalmente entre as diferentes espécies (HÖFLING; GONÇALVES, 2008; VARGAS-FLORES; KUNO-VARGAS, 2014).

As bactérias em forma de bastonetes (bacilos) são um grupo extremamente vasto e diverso. É nesse grupo que as bactérias formadoras de endósporos, característica morfológica marcante deste grupo, como as espécies do gênero *Bacillus* e gêneros correlacionados, como *Paenibacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* e *Brevibacillus* estão alocadas (MADIGNAN *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2020). As espécies desses gêneros apresentam uma ampla gama de morfologias de colônias, tanto dentro quanto entre espécies, sendo observado formação de colônias circulares, irregulares e filamentosas, com bordas inteiras a onduladas, serrilhadas ou fimbriadas; texturas secas e granulares, ou mais suaves e úmidas, além de colorações que podem variar entre branco, creme, alaranjado e marrom. Além disso, as morfologias dos endósporos também podem apresentar variações em suas conformações, como esporos esféricos, elípticos, cilíndricos, ovalados, sendo sua posição dentro do esporângio diverso, como central, subterminal, terminal ou lateral (DE VOS *et al.*, 2009).

Em vários bacilos, especialmente *Bacillus thuringiensis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus* e *Paenibacillus popilliae*, a produção de inclusões proteicas cristalinas (corpo paraesporal), no esporângio, conferem a essas espécies uma capacidade única de identidade. Em espécies de *B. thuringiensis* a forma do cristal é uma indicação de seu conteúdo de proteínas Cry e, portanto, é usada como primeiro critério visual de classificação de

isolados de Bt, podendo ser bipiramidal, cuboide, romboide, ovoide, esférico ou, ainda, sem forma definida (LÓPEZ-MEZA; IBARRA, 1996; MAHALAKSHMI *et al.*, 2012).

Assim, a caracterização morfológica usada de maneira complementar a outra técnica de identificação, como por exemplo as moleculares, pode sim se tornar uma ferramenta útil na discriminação de espécies bacterianas.

3.2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar 37 estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Brevibacillus spp.* e *Priestia spp.* pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por parâmetros morfológicos e citomorfológicos.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar a existência de elementos de distinção entre as estirpes por meio das caracterizações morfológicas e citomorfológicas;
- Verificar se as caracterizações morfológicas e a citomorfológicas são parâmetros eficientes na identificação bacteriana;

3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. Seleção das estirpes

Por meio das análises de identificação por sequenciamento genético e qPCR (Capítulo 1 e 2) foram selecionadas 37 estirpes, pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN. Dessas 37 estirpes, 14 foram pertencentes ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, sendo seis isolados de *B. thuringiensis* (S1450, S1576, S2782, S0615, S2566 e S1989), três de *B. cereus sensu stricto* (S0953, S0663, S0167), um *B. mycoides* (S2786), um *B. tropicus* (S0043), *B. luti* (S1624), *B. toyonensis* (S1647), *B. paranthracis* (S2781) e 16 estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, sendo cinco *B. subtilis sensu stricto* (S2794, S2796, S2896, S2790, S2776), seis *B. amyloliquefaciens* (S2785, S2784, S2787, S2788, S2791, S2536), dois *B. pumilus* (S2783 e S2795), um *B. atrophaeus* (S2792) e um *B. spizizenii* (S2893). As outras estirpes foram

definidas como sendo *Priestia megaterium* (*B. megaterium*) (S1338), *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*) (S2538), *Lysinibacillus capsici* (S2894), *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127), *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438).

3.4.2. Caracterização morfológica

As 37 estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura EMBRAPA-ágar a 30 °C por 72h (MONNERAT *et al.*, 2007), a fim determinar caracterização morfológica das colônias. Após esse período, as colônias foram visualizadas por microscópio de transmissão, modelo JEM-2100-Jeol, e posteriormente analisadas conforme os princípios de Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (De VOS *et al.*, 2009) (Figura 1), em que foram consideradas colônias com:

- Forma: puntiforme; circular, irregular, filamentosa, rizoide;
- Elevação: convexa, elevada, plana, umbonada, irregular;
- Consistência: mucosa, seca, fluida, micelial;
- Margem: lisa, serrilhada, ondulada, lobada, filamentosa;
- Superfície: brilhante e rugosa
- Densidade: translúcido e opaco;
- Coloração: amarela, branca, branca acinzentada, marrom, alaranjado, creme.

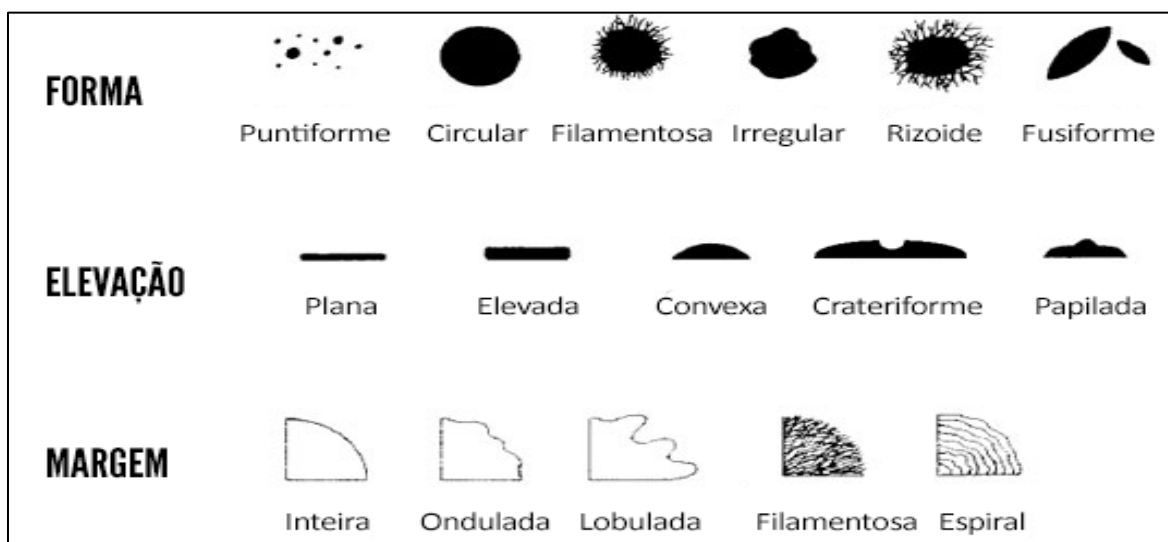


Figura 1. Esquema visual das formas, elevações e margens das colônias bacterianas. Fonte: CÂMARA, B. (2013).

Para a caracterização citomorfológica das estirpes por meio de microscópio eletrônico de varredura, modelo Zeiss DSM 962, inoculou-se as cepas em meio de cultura EMBRAPA-líquido por 48 h a 30 °C. Posteriormente, os inóculos foram liofilizados por 72 horas, e em seguida depositadas em suportes metálicos, contendo adesivo carbono. Esses suportes foram recobertos com 25nm de ouro por 180 segundos, por meio do metalizador MED 010 da Balzers e visualizados no MEV (Figura 2).

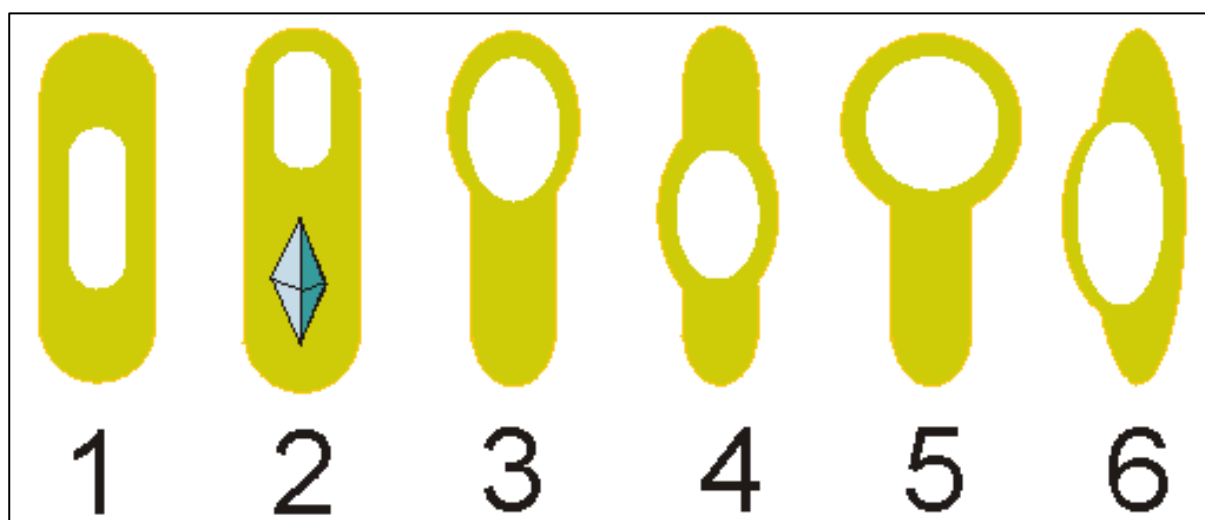


Figura 2. Esquema das variações de endósporos em *Bacillus*. **1** – Endósporo cilíndrico com posição central; **2** – Endósporo elíptico em posição terminal e presença de proteína cristalina; **3** – Endósporo ovalado em posição terminal; **4** – Endósporo elipsoide em posição central; **5** – Endósporo esférico em posição terminal; **6** – Esporo elipsoide em posição lateral. Fonte: Adaptado de German Wikipedia, acervo livre, desenho de Kookaburra, http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Bakterien_Sporen.png, acessado em 20 de outubro de 2022.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partindo do pressuposto que a identificação bacteriana se inicia por características morfológicas, verificou-se que entre as 37 estirpes, 28 apresentaram forma circular, oito forma irregular e apenas uma com conformação rizoide, sendo essa característica típica da espécie *B. mycoides* (S2786). As margens das colônias foram divididas em serrilhadas (10), inteiras (8), lobuladas (7), onduladas (5), inteira/lobulada (3), espiral (1), filamentosa (1), rizoide (1) (Tabela 1).

Houve 34 estirpes com formação de colônias planas e trêas com característica de colônia elevada. Além disso, 19 estirpes apresentaram colônias com consistência seca e superfície rugosa/granulosa, e 12 cepas exibiram uma textura brilhante e mucosa. O isolado S0043 apresentou colônias com superfície brilhante, mas com aspecto seco, enquanto a cepa S2538 obteve colônias aquosas e brilhantes.

A coloração das estirpes, em sua maioria (25) foram brancas ou brancas acinzentadas, no entanto, houve 10 cepas com colônias com cor creme, duas estirpes com coloração marrom (S0002 e S0127), e uma cepa com colônias com a pigmentação alaranjada (S2792). Além disso, verificou-se que a densidade das colônias, dividida em opaco e translúcido, foram predominantemente opacas, ocorrendo apenas cinco cepas com densidade translúcida.

É importante enfatizar que as estruturas morfológicas observadas nessas cepas são típicas quando cultivadas em meio de cultura do tipo EMBRAPA-ágar por um período de 24 h e 72 h a 30 °C. Porém, a composição do meio de cultivo, bem como as condições de incubação podem exercer forte influência na variedade morfológica dessas bactérias, sendo determinantes na definição de detalhes como diâmetro, forma, elevação, textura da superfície, cor e consistência das colônias bacterinas (RABINOVITCH *et al.*, 2017). A título de exemplo, algumas estirpes de *B. atrophaeus* e *B. licheniformis* podem produzir colônias com pigmentos pretos-azulados ou avermelhados, respectivamente, quando submetidas a meios de cultura contendo ferro ou glicerol-glutamato (DE VOS *et al.*, 2009).

Tabela 1. Propriedades morfológicas das colônias, em acordo com os princípios de Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, das 37 estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* crescidas em meio Embrapa-ágar a 30 °C.

Estirpes	Spp.	Forma	Elevação	Margem	Superfície	Consistência	Coloração	Densidade
S0002	<i>Lsp</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Marrom	Translúcida
S0127	<i>Lsp</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Marrom	Translúcida
S2894	<i>Lcp</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Creme	Translúcida
S0663	<i>Bc</i>	Circular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S0953	<i>Bc</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S0615	<i>Bt</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S1450	<i>Bt</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S1576	<i>Bt</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S1989	<i>Bt</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2566	<i>Bt</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2782	<i>Bt</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S0167	<i>Bc</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S0043	<i>Btrop</i>	Circular	Plana	Espiral	Brilhante	Seca	Branca	Opaca
S1624	<i>Blut</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S1647	<i>Btoy</i>	Circular	Plana	Serrilhada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2781	<i>Bpa</i>	Circular	Plana	Ondulada	Brilhante	Mucosa	Branca	Opaca

Continuação...

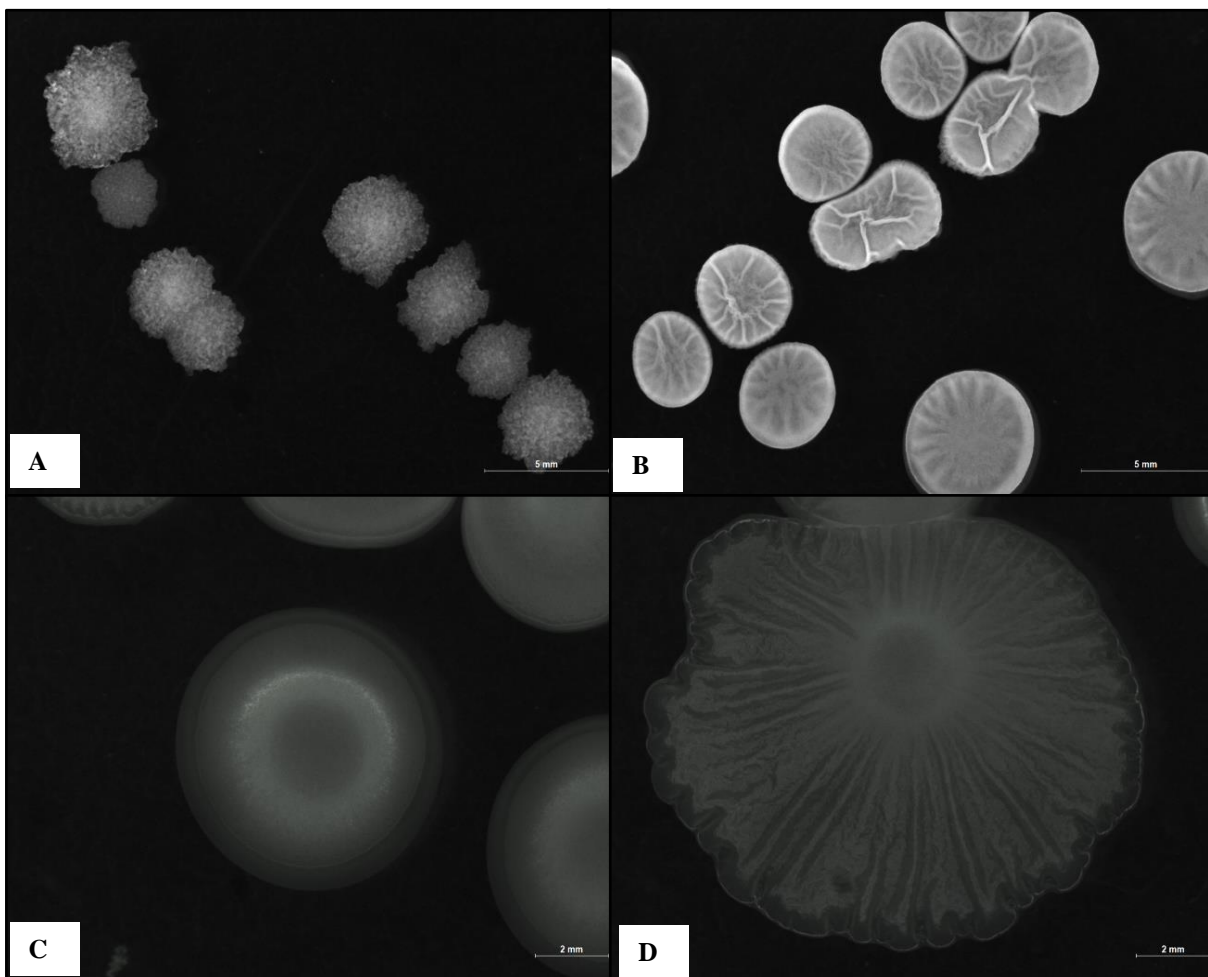
Estirpes	Spp.	Forma	Elevação	Margem	Superfície	Consistência	Coloração	Densidade
S2786	<i>Bmy</i>	Filamentosa	Plana	Filamentosa	Rugosa	Mucosa	Branca	Opaca
S2536	<i>Bamy</i>	Circular/Irregular	Convexa	Inteira/ Lobulada	Lisa/ Rugosa	Aquosa/Seca	Creme	Translúcida/ Opaca
S2784	<i>Bamy</i>	Irregular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2785	<i>Bamy</i>	Circular/Irregular	Convexa	Inteira/ Lobulada	Lisa/ Rugosa	Aquosa/Seca	Creme	Translúcida/ Opaca
S2788	<i>Bamy</i>	Irregular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Creme	Opaca
S2791	<i>Bamy</i>	Circular/Irregular	Convexa	Inteira/ Lobulada	Lisa/ Rugosa	Aquosa/Seca	Creme	Translúcida/ Opaca
S2783	<i>Bpu</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Branca	Translúcida/ Opaca
S2795	<i>Bpu</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Branca	Translúcida/ Opaca
S2787	<i>Bamy</i>	Irregular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Creme	Opaca
S2776	<i>Bs</i>	Irregular	Plana	Ondulada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2794	<i>Bs</i>	Irregular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2796	<i>Bs</i>	Irregular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2896	<i>Bs</i>	Irregular	Plana	Lobulada	Rugosa	Seca	Branca	Opaca
S2777	<i>Bl</i>	Irregular	Plana	Rizoide	Rugosa	Mucosa	Creme	Translúcida/ Opaca

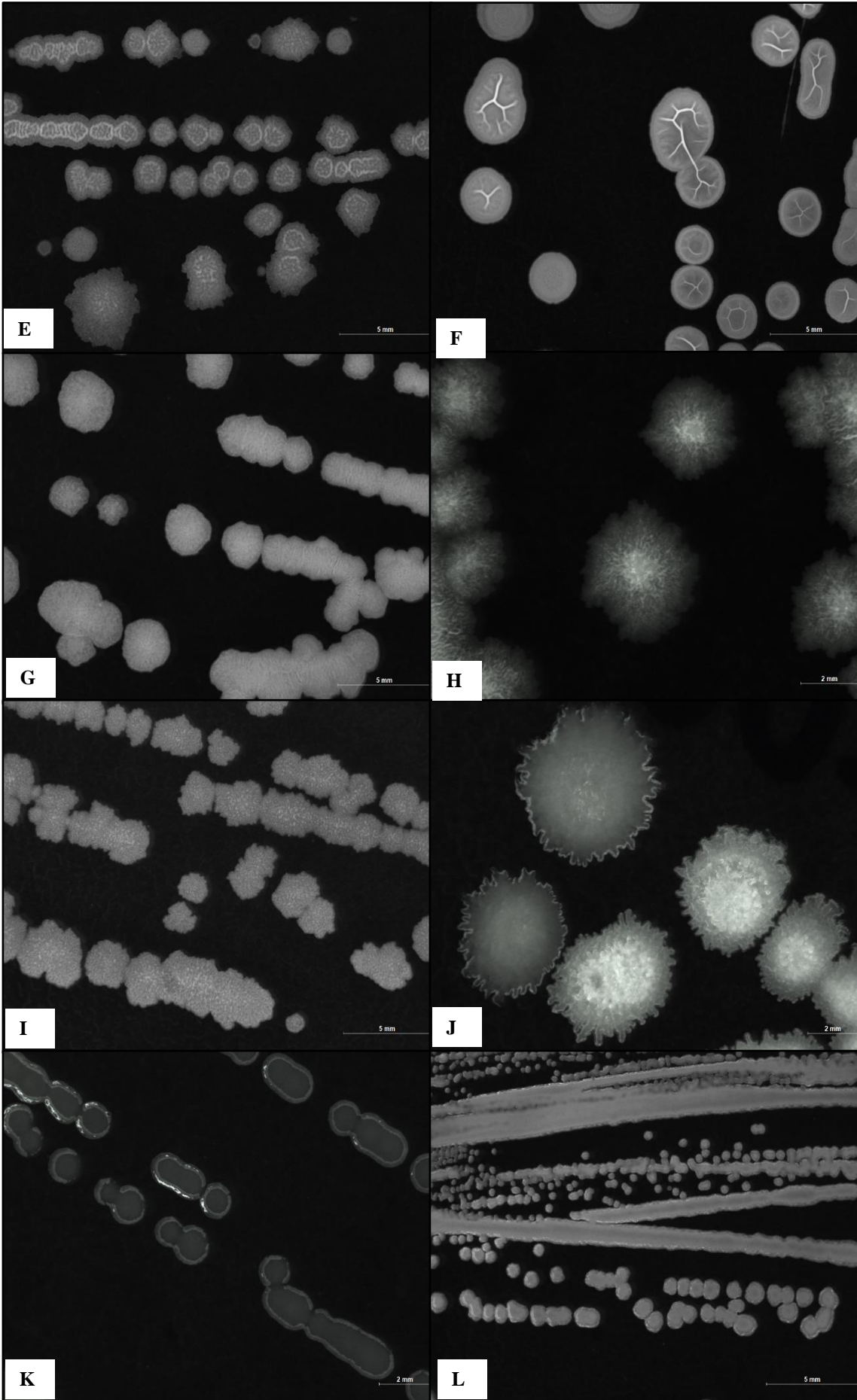
Continuação...

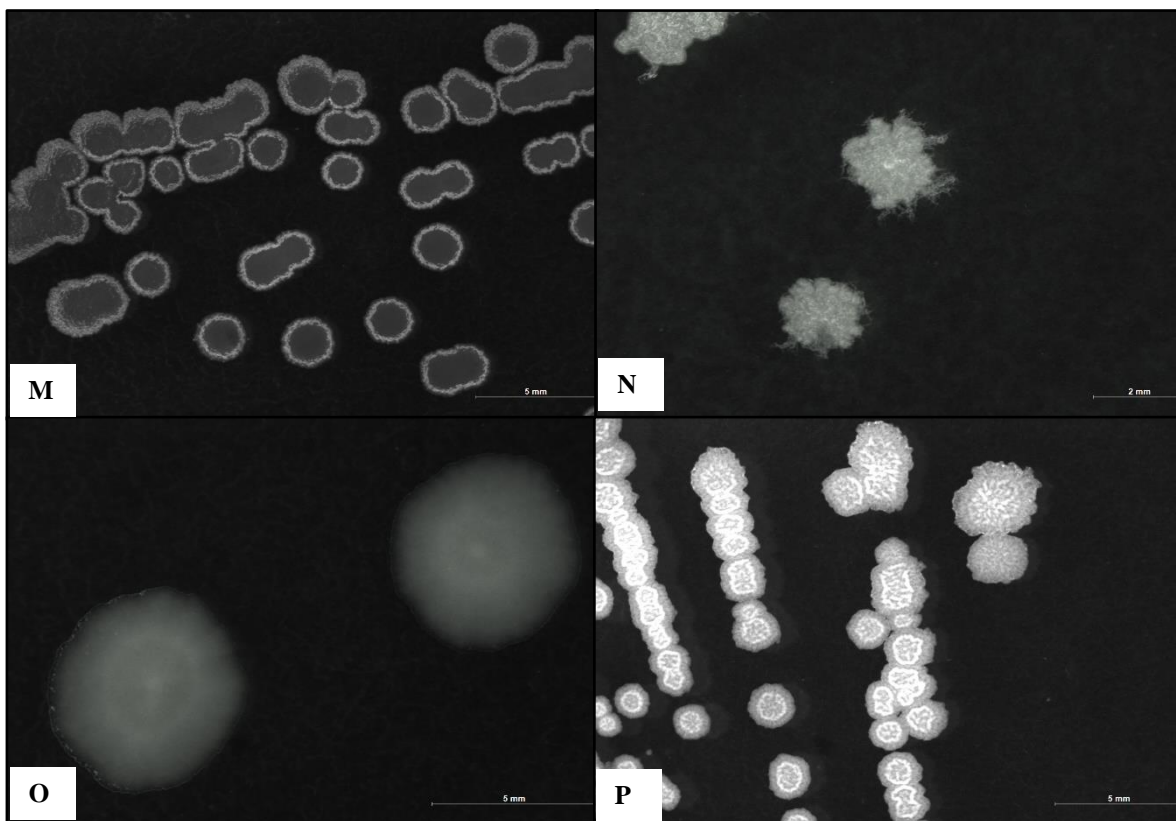
Estirpes	Spp.	Forma	Elevação	Margem	Superfície	Consistência	Coloração	Densidade
S2792	<i>Batr</i>	Circular	Plana	Ondulada	Brilhante	Mucosa	Alaranjada	Opaca
S2893	<i>Bspi</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Branca	Translúcida
S2538	<i>Pary</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Aquosa	Creme	Translúcida/ Opaca
S1338	<i>Pmeg</i>	Circular	Plana	Inteira	Brilhante	Mucosa	Branca	Opaca
S1431	<i>Brev</i>	Circular	Plana	Ondulada	Brilhante	Mucosa	Creme	Translúcida/ Opaca
S1438	<i>Brev</i>	Circular	Plana	Ondulada	Brilhante	Mucosa	Creme	Translúcida/ Opaca

Entre as espécies do grupo *Bacillus subtilis* s.l observou-se uma grande variabilidade morfológica, sendo constatado isolados com colônias em formato circular e consistência mucosa, como as espécies de *B. pumilus* e *B. spizizenii*, e formato irregular e consistência seca como as espécies de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* (Figuras 3). No entanto, para três cepas de *B. amyloliquefaciens*, S2536, S2785 e S2791, observou-se variação na formação das colônias, devido ao tempo de incubação. Inicialmente as colônias foram caracterizadas em circulares e lisas, com consistência aquosa e brilhante e densidade translúcida, sendo comparadas a uma gota d'água. Posteriormente, após 48h de incubação as colônias foram caracterizadas como irregulares e lobuladas, com consistência seca e rugosa e densidade opaca.

Além disso, grande parte das estirpes desse grupo apresentaram colônias com coloração branca e creme, com exceção de *B. atrophaeus* que apresentou colônias alaranjadas (Apêndice II).

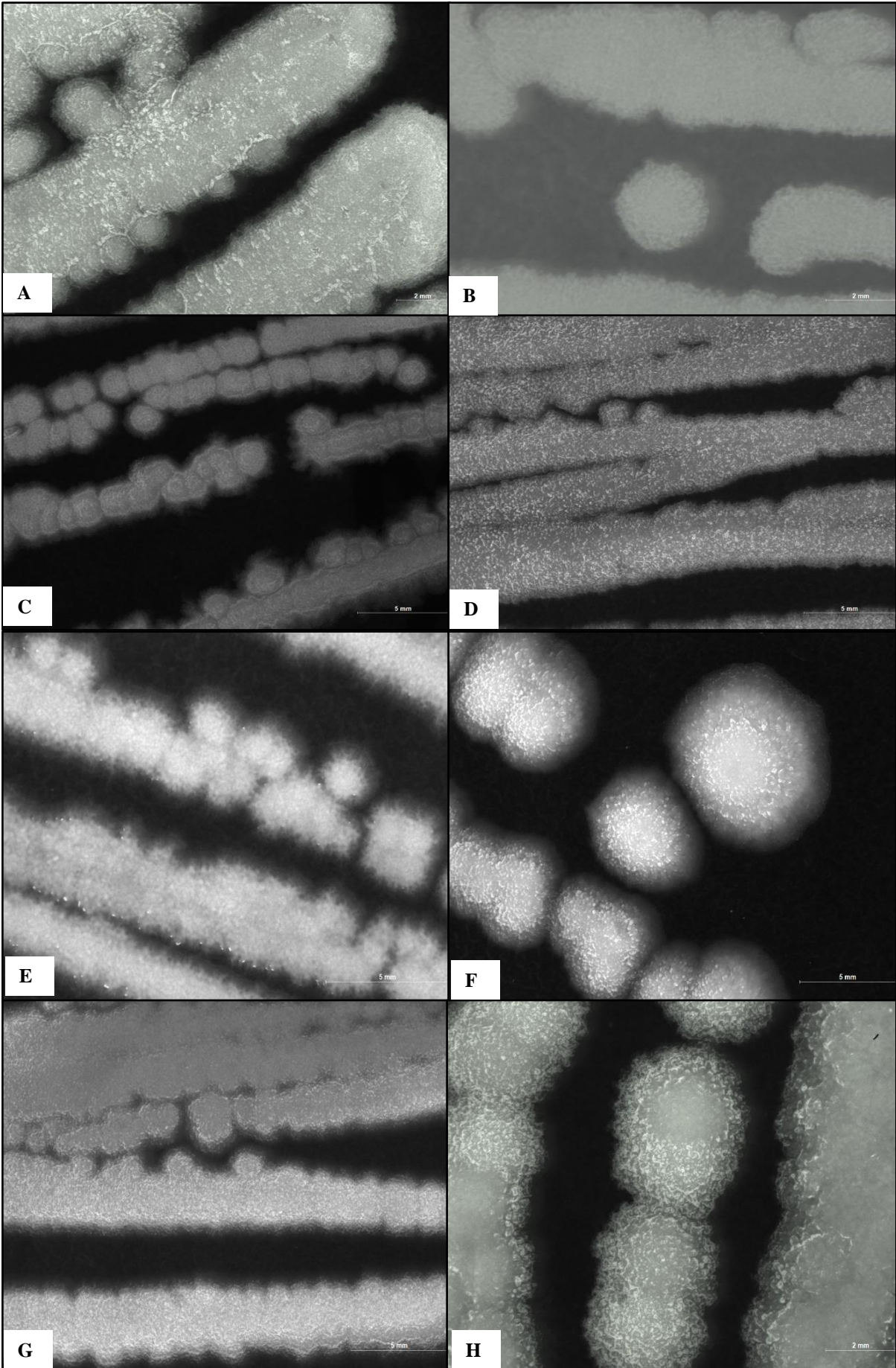


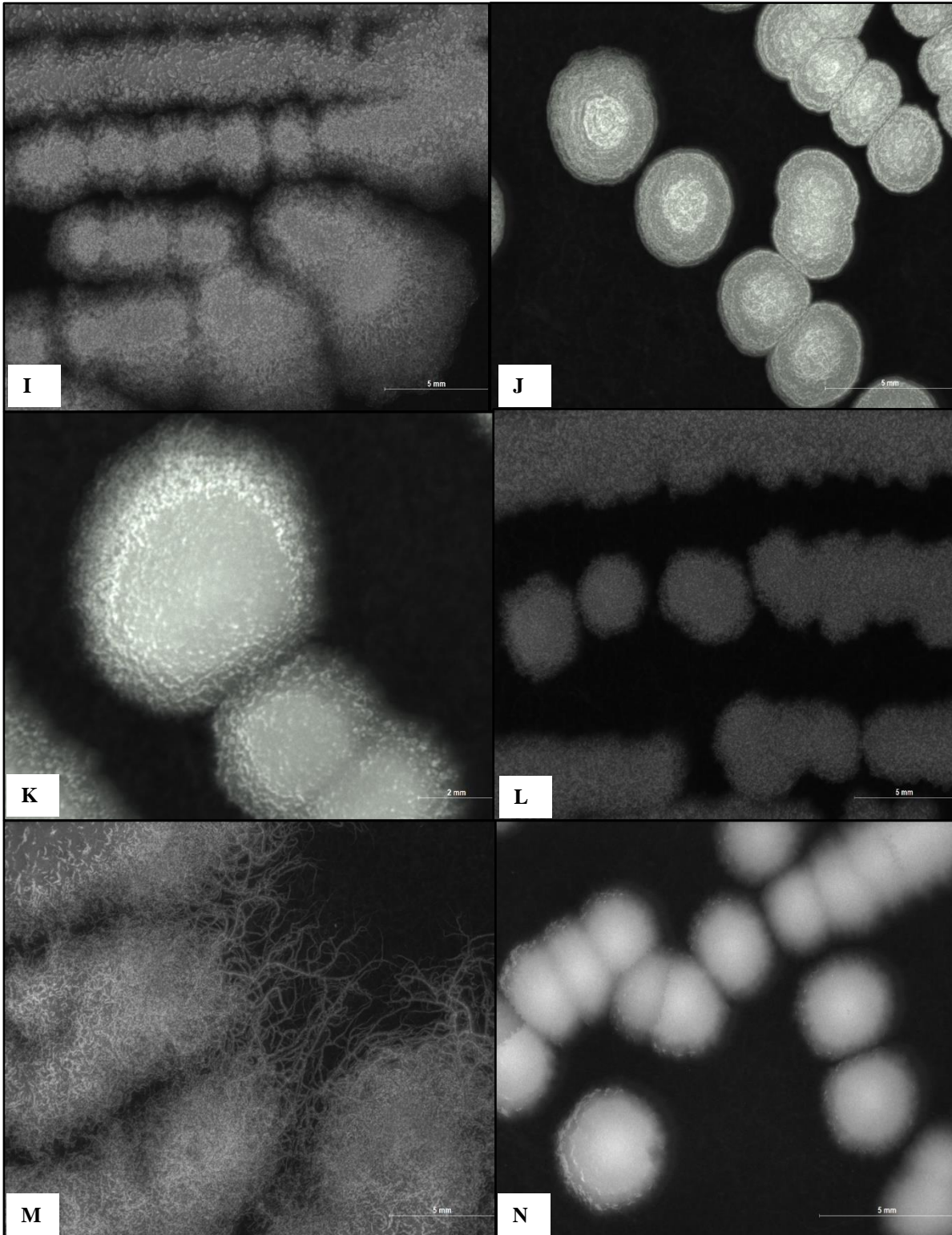




Figuras 3. Microscopia de transmissão das colônias das estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, em escala de 2 mm a 5 mm. **A** – *B. amyloliquefaciens* (S2784); **B** - *B. amyloliquefaciens* (S2536); **C** e **D** - *B. amyloliquefaciens* (S2785); **E** - *B. amyloliquefaciens* (S2788); **F** - *B. amyloliquefaciens* (S2791); **G** – *B. subtilis* (S2776); **H** – *B. subtilis* (S2794); **I** – *B. subtilis* (S2796); **J** – *B. subtilis* (S2896); **K** – *B. pumilus* (S2783); **L** - *B. pumilus* (S2795); **M** – *B. atrophaeus* (S2792); **N** – *B. licheniformis* (S2777); **O** – *B. spizizenii* (S2893); **P** – *B. amyloliquefaciens* (S2787).

As espécies do grupo *Bacillus cereus s.l* apresentaram características morfológicas bastantes similares entre si, principalmente quanto a forma, cor e estrutura das colônias, sendo essas em sua maioria circulares, granuladas ou lisas e brancas/opacas. A espécie de *B. mycoides* foi a única exceção do grupo com relação a morfologia, uma vez que a mesma apresentou uma conformação filamentosa e micelial (Figuras 4).

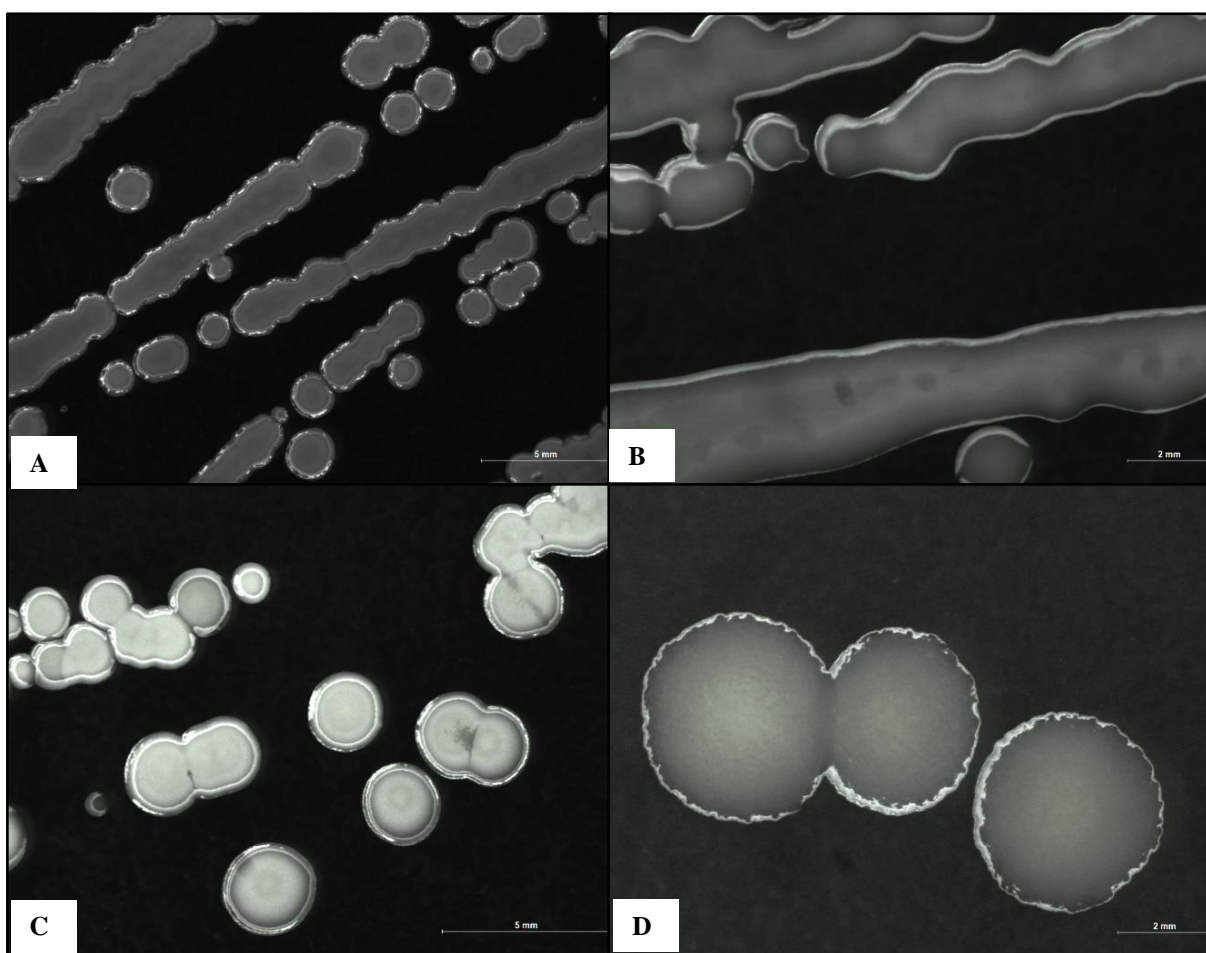


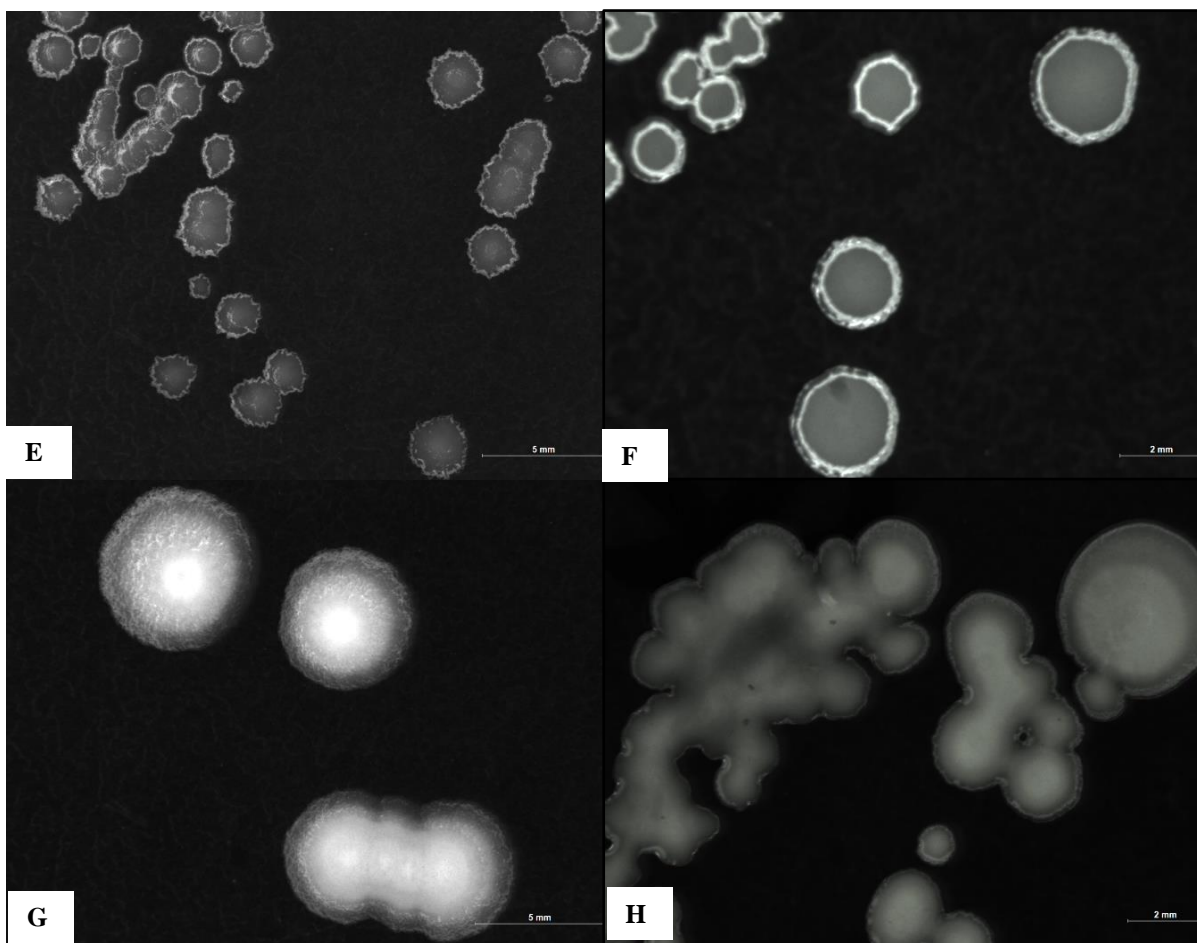


Figuras 4. Microscopia de transmissão das colônias das estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, em escala de 2 mm a 5 mm. **A** – *B. cereus* (S0167); **B** - *B. thuringiensis* (S2566); **C** - *B. cereus* (S0663); **D** - *B. cereus* (S0953); **E** - *B. thuringiensis kurstaki* (S1450); **F** - *B. thuringiensis azawai* (S1576); **G** – *B. thuringiensis sotto* (S0615); **H** – *B. thuringiensis*

israelensis (S1989); **I** – *B. thuringiensis israelensis* (S2782); **J** – *B. tropicus* (S0043); **K** – *B. luti* (S1624); **L** – *B. toyonensis* (S1647); **M** – *B. mycooides* (S2786); **N** – *B. paranthracis* (S2781).

As espécies do gênero *Lysinibacillus* (S0002, S0127 e S2894) desenvolveram colônias translúcidas, com formato circular e margens lisas, e consistência mucosa. A coloração dessas espécies foi de marrom para as cepas S0002 e S0127 e creme para S2894. As duas estirpes de *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438) inicialmente exibiram colônias mucosas e pequenas, posteriormente secas, opacas e com bordas onduladas. As estirpes de *Priestia megaterium* (S1338) e *Priestia aryabhatai* (S2538) apresentaram em comum colônias circulares, margens inteiras e lisas. A consistência e coloração foram diferentes, em que a S1338 apresentou colônias mucosas, opacas e brancas, enquanto a S2538 obteve colônias aquosas, brilhosas, levemente opacas e com colorações cremes alaranjados (Figuras 5).





Figuras 5. Microscopia de transmissão das colônias das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.* e *Brevibacillus spp.*, em escala de 2 mm a 5 mm. **A** – *Lysinibacillus sphaericus* (S0002); **B** - *Lysinibacillus sphaericus* (S0127); **C** - *Lysinibacillus capsici* (S2894); **D** - *Lysinibacillus capsici* (S2894); **E** – *Brevibacillus laterosporus* (S1438); **F** - *Brevibacillus laterosporus* (S1431); **G** – *P. megaterium* (S1338); **H** – *P. aryabhatai* (S2538).

A avaliação citomorfológica das estirpes proporcionou caracterizações de espécies com células vegetativas em formato de bastonete, com ou sem formação em cadeia, com ou sem mobilidade flagelar, e com comprimento variando de 0,7 a 2 μm . Além disso, observou-se a formação de inclusões proteicas em formato bipiramidal, cuboide e/ou esférico em estirpes de *B. thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* (Tabela 2).

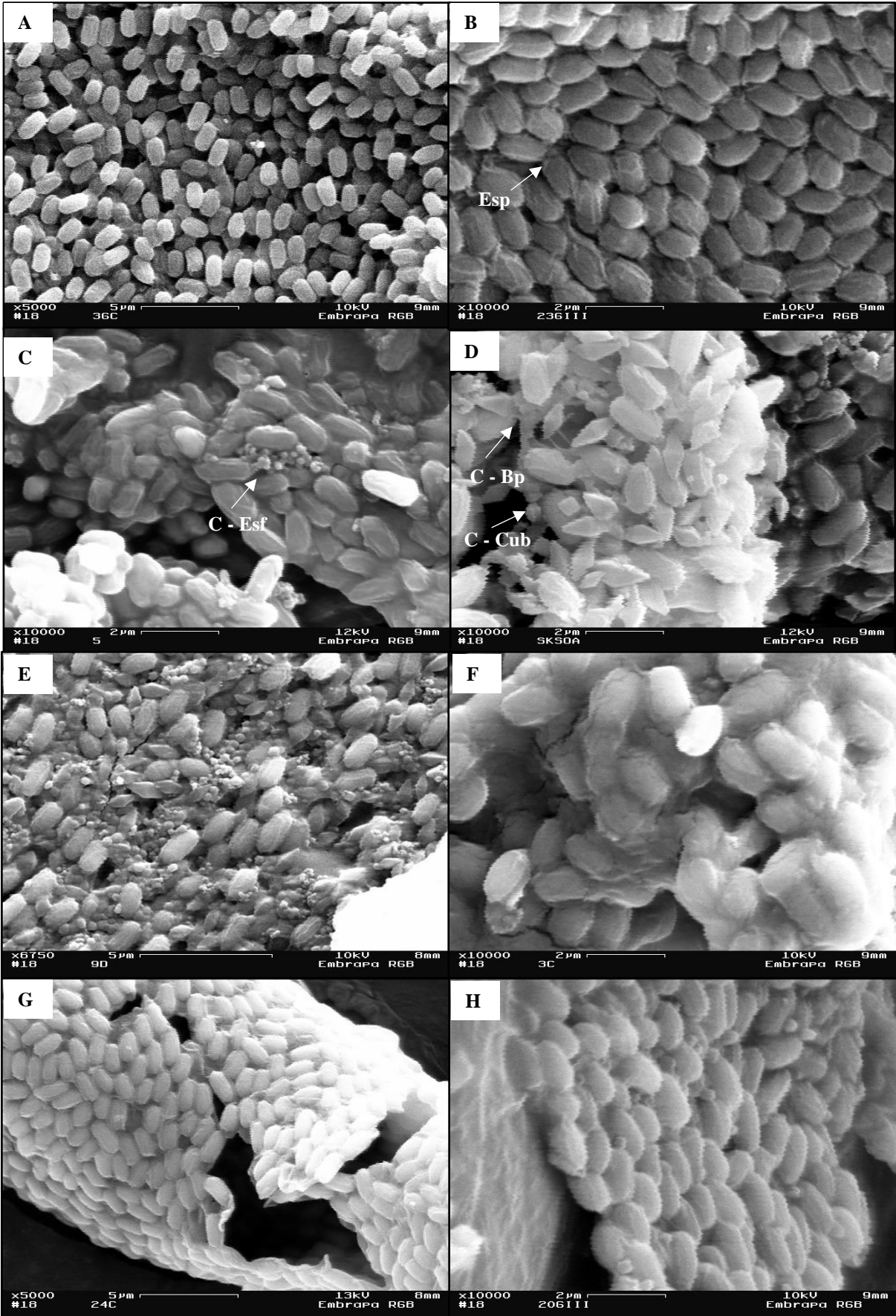
Tabela 2. Citomorfologia das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* Em que foram avaliados o **CCV** (comprimento da célula vegetativa), **LCV** (largura da célula vegetativa), **ED** (esporângio distendido), **FES** (formato do esporo), **PES** (posição do esporo no esporângio), **IP** (inclusões proteicas), **Mo** (mobilidade). Definição dos esporos: **OV** = ovalado; **ELP** = elipsoides, **ELI** = elíptico, **CI** = cilíndrico, **ESF** = esférico, **C** = central, **PC** = paracentral, **ST** = subterminal, **T** = terminal. + = positivo, - = negativo.

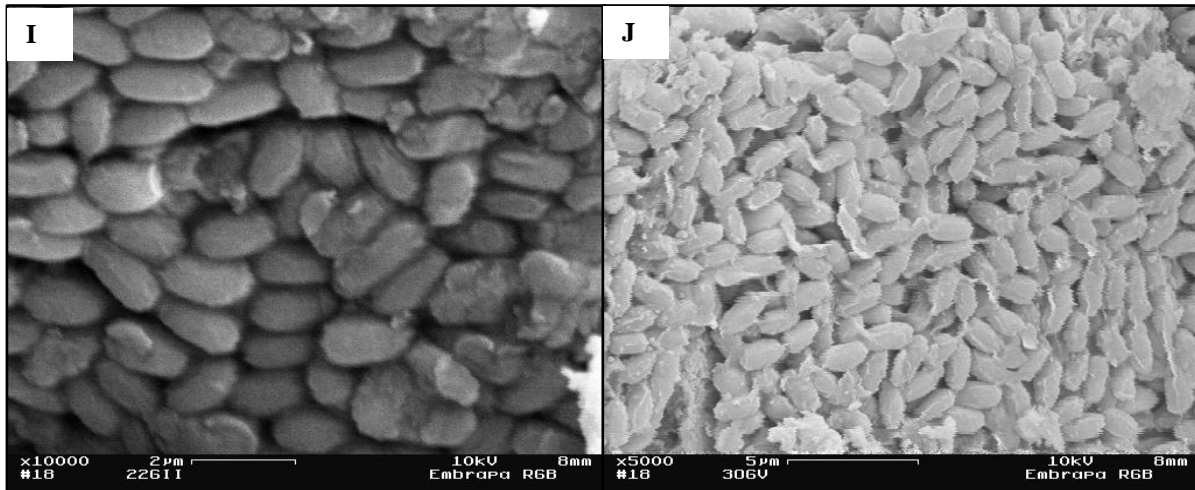
Espécie	CCV (µm)	LCV (µm)	ED	FES	PES	IP (Cristal)	Mo
<i>B. cereus</i>	1-2 µm	1 µm	-	ELP	ST	-	-
<i>B. tropicus</i>	1 µm	1 µm	-	ELP	ST	-	-
<i>B. mycoides</i>	1-2 µm	1 µm	-	ELI	C - PC	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	1-2 µm	1 µm	-	ELI	ST	+	-
<i>L. sphaericus</i>	2 µm	0.7-0.9 µm	+	ESF	T	+	+
<i>L. capsici</i>	2 µm	0.7-0.9 µm	+	ESF	T	-	+
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1 µm	0.7-0.9 µm	-	CIL	C - PC	-	+
<i>B. subtilis</i>	1 µm	0.7-0.9 µm	-	CIL	C - PC	-	+
<i>B. atrophaeus</i>	1 µm	0.7 µm	-	CIL	ST	-	+
<i>B. spizizenii</i>	0,7 µm	0.7 µm	-	ESF	C	-	+
<i>B. pumilus</i>	0,8 µm	0.7 µm	-	CIL	C	-	+
<i>B. licheniformis</i>	1 µm	0.7 µm	-	CIL	C	-	+
<i>P. megaterium</i>	1-2 µm	1 µm	-	OV	C	-	-
<i>P. aryabhatai</i>	1-2 µm	1 µm	-	OV	C	-	-
<i>Brev. laterosporus</i>	1 µm	0.8- 1 µm	+	OV	C	-	+

As espécies pertencentes ao grupo *B. cereus s.l.* apresentaram células vegetativas com comprimento entre 1 µm a 2 µm, largura de 1 µm, formação de longas cadeias e sem mobilidade no meio de cultura. Os esporos apresentaram formato elipsoide e elípticos, com posição no esporângio não distendido (inchado) em subterminal e terminal (Figuras 6).

Nas espécies de *B. thuringiensis* (S1450, S0615, S1576, S1989, S2782) foi constatado a formação de inclusões proteicas, durante o processo de esporulação. Esses cristais apresentaram conformações do tipo bipiramidal, cuboide e esférica. Para as cepas S1450, S1576 e S0615 verificou a presença de proteínas com formato do tipo bipiramidal, enquanto, para a cepa S2566 constatou-se uma combinação de cristais nas formas bipiramidal e cuboide. Porém, nas estirpes S2782 e S1989 houve a formação de cristais do tipo esférico.

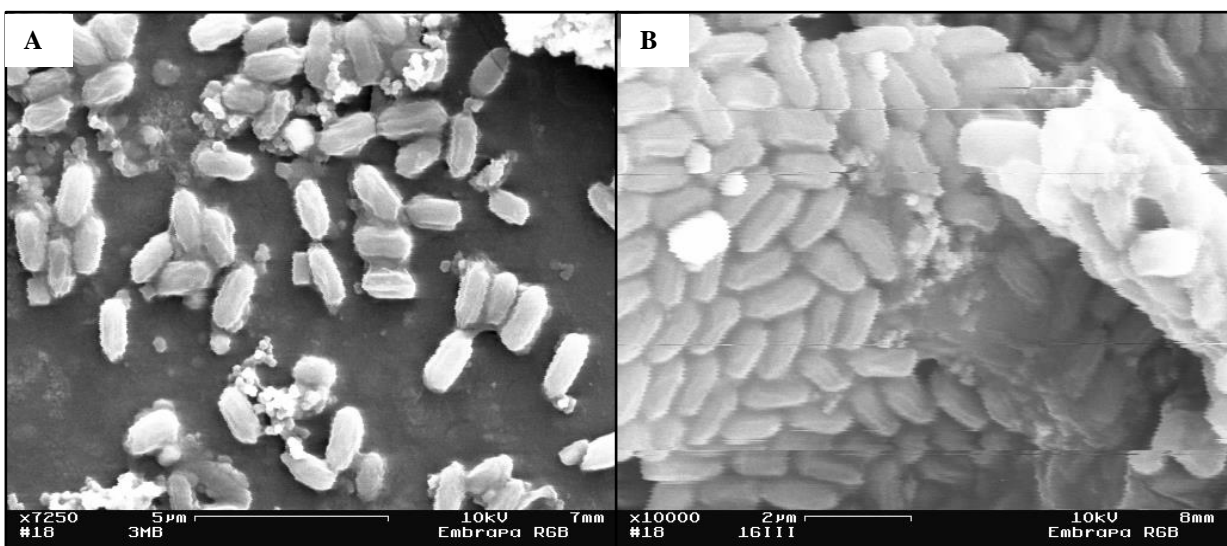
A forma do cristal é uma indicação de seu conteúdo de proteínas Cry e, portanto, é usada como primeiro critério visual de classificação de isolados de Bt (LÓPEZ-MEZA; IBARRA, 1996; MAHALAKSHMI *et al.*, 2012). Além disso, de acordo com Monnerat *et al.* (1999), Jain *et al.* (2017) e Nair *et al.* (2018), normalmente isolados de Bt com cristais do tipo bipiramidais e cuboides, abrigam um complexo de genes *cryIA*, *cryIIA*, *cryIB*, *cryID*, *cry2*, *cry9* e *vip3a*, aos quais geralmente são das subespécies *aizawai* e *kurstaki*. Entretanto, proteínas com conformação esférica possuem atividade entomocida a dípteros, sendo normalmente, condicionada a quatro proteínas principais, *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* e *cyt1A*, típicas da subespécie *israelensis* (FEDERICI *et al.*, 2003; MELATTI *et al.* 2005).

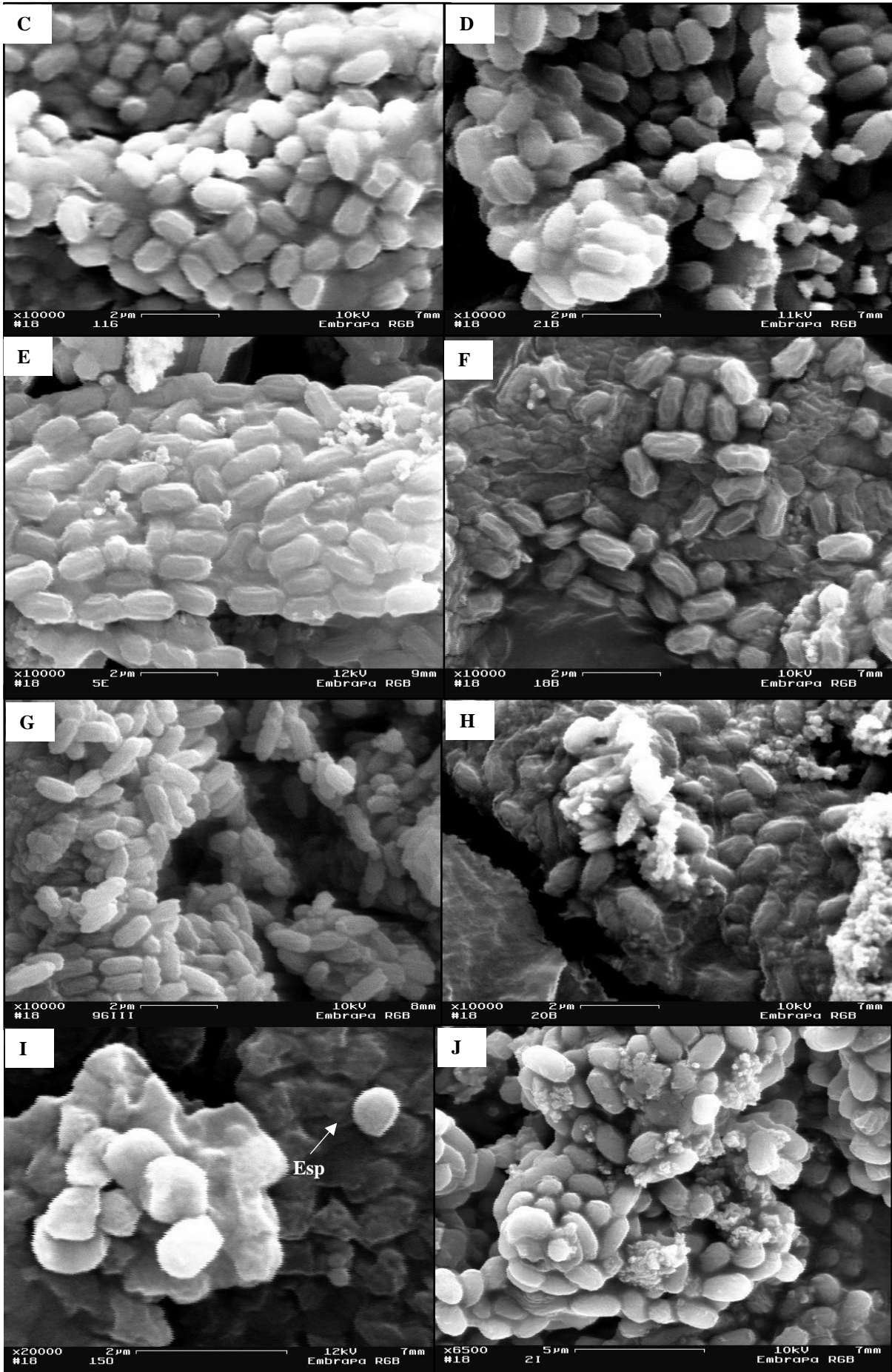




Figuras 6. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Bacillus cereus sensu lato*. **A** – *B. cereus* (S0663); **B** – *B. cereus* (S0953), **C** – *B. thuringiensis israelensis* (S1989), **D** – *Bacillus thuringiensis* (S2566), **E** – *B. thuringiensis azawai* (S1576), **F** – *B. mycoides* (S2786), **G** – *B. tropicus* (S0043), **H** – *B. toyonensis* (S1647), **I** – *B. luti* (S1624), **J** – *B. paranthracis* (S2781). (10.000 x amplificação). Escala entre 2 e 5 µm. Esp = esporo, C = cristal, C – Esf = cristal esférico, C – Bp = cristal bipiramidal, C – Cub = cristal cuboide.

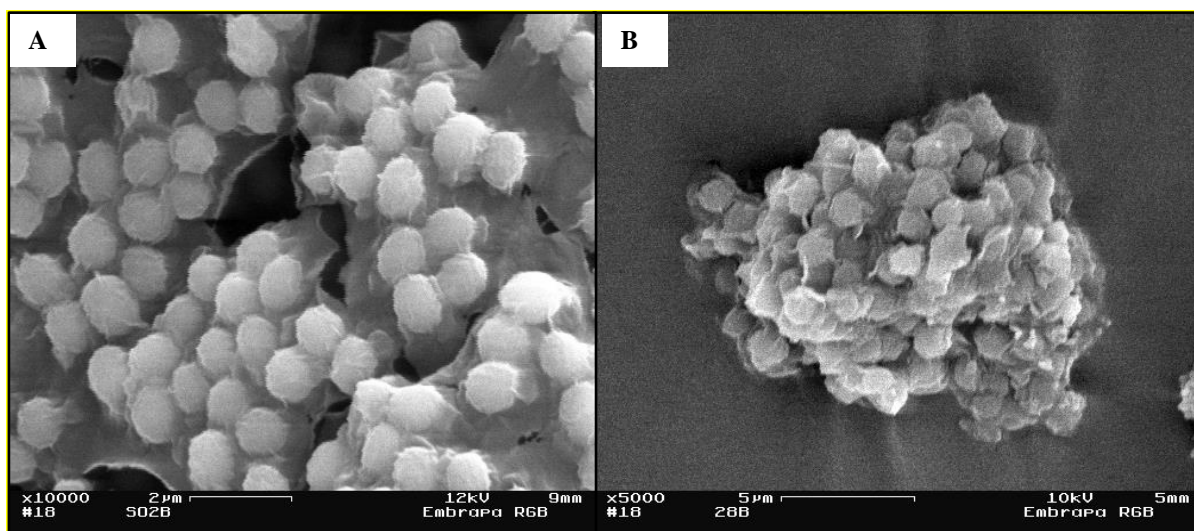
As espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis s.l* apresentaram células vegetativas curtas, com comprimento entre 0.7 µm a 1 µm, largura de 0.7 µm a 0.9 µm, móveis, com e sem formação em cadeia. Grande parte das cepas apresentaram esporos em formato cilíndrico, no entanto, a espécie *B. spizizenii* apresentou esporos esféricos. A posição do esporo foi central e paracentral e não houve a presença de esporos distendidos no esporângio e inclusões proteicas visíveis (Figuras 7).





Figuras 7. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Bacillus subtilis sensu lato*. **A** – *B. amyloliquefaciens* (S2787); **B** – *B. amyloliquefaciens* (S2536), **C** – *B. subtilis* (S2796), **D** – *Bacillus subtilis* (S2794), **E** – *B. amyloliquefaciens* (S2784), **F** – *B. amyloliquefaciens* (S2785), **G** – *B. pumilus* (S2795), **H** – *B. licheniformis* (S2777), **I** – *B. spizizenii* (S2893), **J** – *B. atrophaeus* (S2792). (10.000 x amplificação). Escala entre 2 e 5 µm. Esp = esporo.

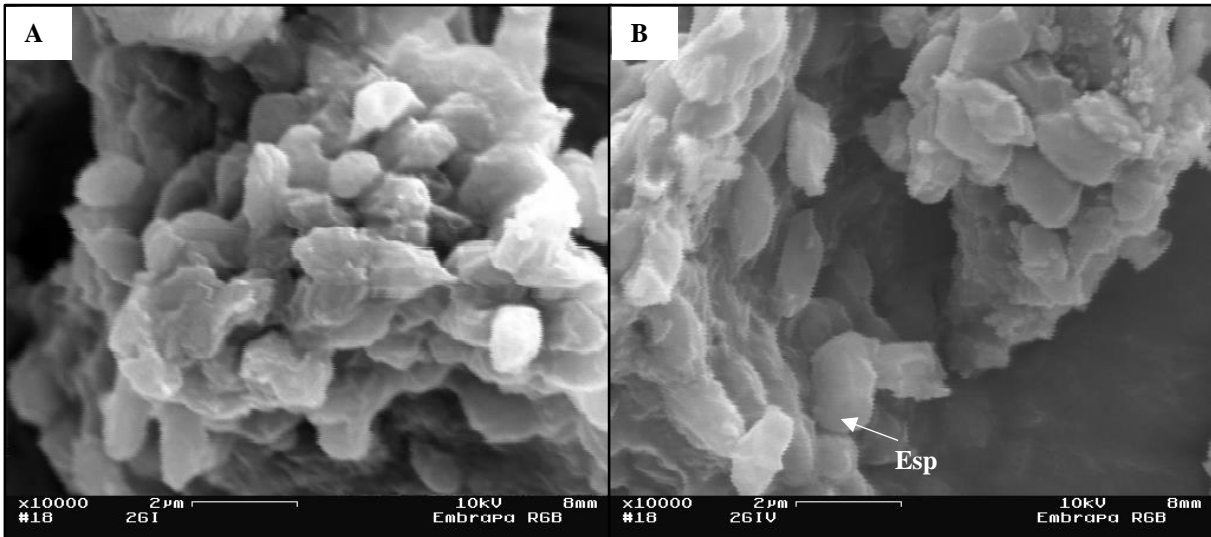
As espécies de *Lysinibacillus spp.* produziram células vegetativas com comprimento de 2 µm, largura de 0.7 a 0.9 µm, sem a formação de cadeias, bastante móveis no meio e esporângios distendidos e inchados, sendo semelhantes ao formato de uma “raquete”. Os esporos possuem formato esférico, e posição terminal no esporângio. Foi constatado a presença de inclusões proteicas, também em formato esférico, presas aos esporos, nas espécies de *L. sphaericus*. No entanto, não foi detectado cristais na espécie *L. capsici*. De acordo com literatura, algumas cepas de *L. sphaericus* são tóxicas e consideradas patogênicas para larvas de mosquito (EL-BENDARY, 2006) (Figuras 8).



Figuras 8. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Lysinibacillus spp.* **A** – *Lysinibacillus sphaericus* (S0002); **B** – *Lysinibacillus capsici* (S2894). (10.000 x amplificação). Escala entre 2 e 5 µm.

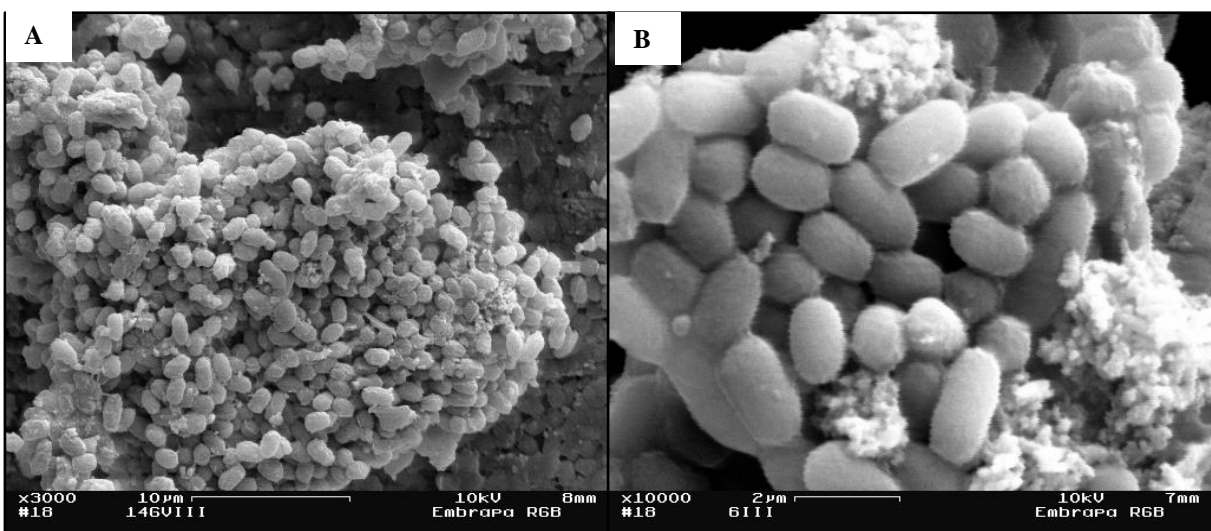
As espécies de *Brevibacillus laterosporus* possuem células vegetativas com 1 µm de comprimento, largura entre 0.8 µm a 1 µm, móveis e com esporângio distendido, semelhante ao formato de uma “jangada” ou “canoa”. Os esporos são ovalados grandes, sendo a posição dos mesmos definida em central. De acordo com OLIVEIRA *et al.* (2004) algumas cepas de

Brevibacillus laterosporus produzem inclusões cristalinas de diferentes formas e tamanhos, liberadas durante a lise celular do esporângio, porém não foi detectado a presença dessas inclusões nesses dois isolados (Figuras 97).



Figuras 9. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *Brevibacillus laterosporus*. **A** – *Brevibacillus laterosporus* (S1438); **B** – *Brevibacillus laterosporus* (S1431). (10.000 x amplificação). Escala de 2 µm. Esp = esporo.

As espécies de *P. megaterium* e *P. aryabhatai* apresentaram células vegetativas com comprimento 1 µm, largura de 1 µm, sem mobilidade no meio. Os esporos apresentaram formato ovalado em posição central no esporângio (Figuras 10).



Figuras 10. Microscopia de varredura as estirpes do grupo *P. megaterium* e *P. aryabhatai*. **A**

– *P. megaterium* (S1338); **B** – *P. aryabhatai* (S2538). (10.000 x amplificação). Escala de 2 e 10 µm.

Entende-se que a caracterização morfológica e citomorfológica são parâmetros essenciais para compreensão da fisionomia das espécies bacterianas. E foi por meio desses parâmetros que iniciou-se o processo de identificação de microrganismo. No entanto, somente a análise morfológica não é suficiente para identificar uma espécie bacteriana, uma vez que a composição do meio de cultura e as condições de incubação podem influenciar fortemente na morfologia das mesmas, alterando detalhes como forma, elevação, textura da superfície, cor e consistência das colônias (RABINOVITCH *et al.*, 2017). Desse modo, aliar a caracterização morfológica com outros métodos de identificação, como por exemplo, bioquímico ou molecular, podem garantir uma identificação 100% concisa e precisa desses microrganismos.

3.6. CONCLUSÕES

As propriedades morfológicas e citomorfológicas das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* foram consideradas características relevantes e determinante no estudo da diversidade das populações desses gêneros.

As divergências morfológicas observadas foram na estirpe de *B. mycoides*, cuja forma da colônia foi filamentosa, na estirpe de *B. atrophaeus*, cuja coloração da colônia foi alaranjada, na cepa de *B. spizizenii*, ao qual apresentou esporos esféricos, diferindo-se das espécies pertencentes ao mesmo grupo, a ocorrência de proteínas cristalinas nas espécies de *B. thuringiensis* e *L. sphaericus* e, a divergência de morfologia devido ao tempo de incubação em três espécies de *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2785 e S2791).

Mesmo havendo características fenotípicas similares entre as espécies de mesmo grupo filogenético, constatou-se pequenas variações na forma e cor das colônias, presença de inclusões proteicas e formato de esporo que podem auxiliar na distinção dessas espécies.

3.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, P. A. C.; TATA, A.; DOS SANTOS, V. G.; BARREIRO, J. R.; SCHWAB, N. V.; DOS SANTOS, M. V.; EBERLIN, M. N.; FERREIRA, C. R. Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. **RSC advances**, v. 3, n. 4, p. 994-1008, 2013.

DE VOS, P; GARRITY, G.M; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHELEIFER, K. H.; WHITMAN, W. B. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3: **The Firmicutes**. Springer Science, Business Media, 2009.

EL-BENDARY, M. A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. **Journal of basic microbiology**, v. 46, n. 2, p. 158-170, 2006.

FEDERICI, B. A.; PARK, H. W.; BIDESHI, D. K.; WIRTH, M. C.; JOHNSON, J. J.; SAKANO, Y.; TANG, M. Developing recombinant bacteria for control of mosquito larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 23, n. sp2, p. 164-175, 2007.

HOFLING, J. F.; GONÇALVES R. B. Microscopia de luz em microbiologia: microscopia bacteriana e fúngica. Editora Artmed 1ª. ED. 2008.

JAIN, D.; SITA, SUNDA, D.; SANADHYA, S.; DHRUBA, NATH, J. KHANDELWAL, S. K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

KAUFMANN, S. H.; SCHAIBLE, U. E. 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 10, p. 469-475, 2005.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M; WASHINGTON, C. W. Diagnóstico Microbiológico. Editora Médica e Científica 5ª. ED. Rio de Janeiro. 2001.

LÓPEZ-MEZA, J. E.; IBARRA, J. E. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1306-1310, 1996.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. **Microbiologia de Brock**, 14ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 960 p.

MAHALAKSHMI, A.; SUJATHA, K.; KANI, P.; SHENBAGARATHAI, R. Distribution of cry and cyt genes among indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates with mosquitocidal activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 03, p. 216, 2012.

MAMOU, G.; MOHAN, G. B. M.; ROUVINSKI, A.; ROSENBERG, A.; BEN-YEHUDA, S. Early developmental program shapes colony morphology in bacteria. **Cell reports**, v. 14, n. 8, p. 1850-1857, 2016.

MELATTI, V.; BATISTA, A.; DEMO, C.; PRAÇA, L.; BROD, C.; MONNERAT, R.G. (2005). Determinação da suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* a diferentes subespécies de *Bacillus thuringiensis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** **88**, 14p. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current microbiology**, v. 39, n. 3, p. 159-162, 1999.

NAIR, K.; AL-THANI, R.; AL-THANI, D.; AL-YAFEI, F.; AHMED, T.; JAOUA, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and cry gene content. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 708, 2018.

OLIVEIRA, E. J.; RABINOVITCH, L.; MONNERAT, R. G.; PASSOS, L. K. J.; ZAHNER, V. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control. **Applied Environ. Microbial**, v. 70, n. 11, p. 6657-6664, 2004.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1º Ed. Instituto Oswaldo Cruz. Laboratório de Fisiologia Bacteriana, 2015, 160 p.

SOUSA, A. M.; MACHADO, I.; PEREIRA, M.O. **Phenotypic switching: an opportunity to bacteria thrive**. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2011.

VARGAS-FLORES, T.; KUNO-VARGAS, A. Morfologia bacteriana. **Revista de Actualización Clínica**, v. 49, n. 02, p. 2594-2598, 2014.

WEILE, J.; KNABBE, C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. **Anal. Bioanal. Chem**, v. 394, p. 731–742, 2009.

CAPÍTULO 4. RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS COMO UMA CARACTERÍSTICA TAXONÔMICA DAS ESPÉCIES DE *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.*

RESUMO

Testes de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados bacterianos são importantes provas bioquímicas para isolar, selecionar, erradicar ou limitar o crescimento de uma estirpe. Esses métodos possuem abordagens de identificação relativamente simples, práticas e funcionais. O objetivo desse trabalho foi determinar o perfil de resistência à antibióticos de 37 cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* como uma premissa de isolamento e característica taxonômica. E confrontar os protocolos de isolamento de *Bacillus* descritos pela OMS 1985 e 1987. Assim, para determinar os perfis de resistência foram adotados os métodos de disco-difusão, contendo 20 tipos de antibióticos, e método por diluição em ágar, com placas contendo meio EMBRAPA-ágar e 23 antibióticos em sete concentrações: 30, 70, 110, 150, 200, 250 e 300 µg/mL. Os resultados de resistência a antimicrobianos por disco-difusão indicaram que 95% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um ou mais dos 20 antibióticos avaliados. Grande parte das estirpes foram resistentes aos antibióticos do grupo dos β-lactâmicos, como penicilina, oxacilina, ampicilina, cefazolina, ceftriaxona, entre outros. O grupo *B. subtilis sensu lato* apresentou maior suscetibilidade aos antimicrobianos testados, diferentemente das espécies pertencentes ao grupo *B. cereus sensu lato* que foram resistentes a maioria dos antibióticos avaliados. Em diluição em ágar os casos mais pontuais de resistência ao antimicrobiano e possível produto de isolamento para espécie foram: sulfametoxazol a 150 µg/mL para *B. toyonensis*, clortetraciclina a 110 µg/mL para *B. tropicus*, estreptomomicina a 300 µg/mL para *Lysinibacillus sphaericus*, vancomicina a 150 µg/mL e cotrimoxazol a 200 µg/mL para *B. spizizenii*, rifampicina a 200 µg/mL para *B. atrophaeus*. Além disso, os resultados obtidos por esse estudo contradizem os apresentados nos protocolos de isolamento da OMS (1985 e 1987), uma vez que houve uma diversidade de estirpes resistentes a penicilina, e não somente *B. thuringiensis*, como trata o protocolo. Conclui-se que os antibióticos auxiliam na compreensão do perfil bioquímico dessas espécies, contudo, poucos foram os antibióticos eficientes na diferenciação e na caracterização de espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.*, uma vez diversas estirpes, principalmente aquelas pertencentes ao mesmo grupo filogenético apresentaram padrões de resistência bastante similares.

Palavras-chaves: Suscetibilidade; Antibiograma; Disco-Difusão; Diluição em Ágar.

ABSTRACT

Antimicrobial susceptibility tests of bacterial isolates are important biochemical tests to isolate, select, eradicate or limit the growth of a strain. These methods have relatively simple, practical and functional identification approaches. The objective of this work was to determine the antibiotic resistance profile of 37 bacterial strains belonging to the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* and *Brevibacillus* as an isolation premise and taxonomic characteristic. And compare the Bacillus isolation protocols described by the WHO 1985 and 1987. Thus, to determine the resistance profiles, the disk diffusion methods were adopted, containing 20 types of antibiotics, and the agar dilution method, with plates containing EMBRAPA medium. -agar and 23 antibiotics in seven concentrations: 30, 70, 110, 150, 200, 250 and 300 µg/mL. The results of antimicrobial resistance by disk diffusion indicated that 95% of the isolates showed resistance to at least one or more of the 20 antibiotics evaluated. Most of the strains were resistant to antibiotics from the β-lactam group, such as penicillin, oxacillin, ampicillin, cefazolin, ceftriaxone, among others. The *B. subtilis sensu lato* group showed greater susceptibility to the tested antimicrobials, unlike the species belonging to the *B. cereus sensu lato* group that were resistant to most of the antibiotics evaluated. In agar dilution, the most punctual cases of antimicrobial resistance and possible isolation product for the species were: sulfamethoxazole at 150 µg/mL for *B. toyonensis*, chlortetracycline at 110 µg/mL for *B. tropicus*, streptomycin at 300 µg/mL for *Lysinibacillus sphaericus*, 150 µg/ml vancomycin and 200 µg/mL cotrimoxazole for *B. spizizenii*, 200 µg/mL rifampicin for *B. atrophaeus*. Furthermore, the results obtained by this study contradict those presented in the WHO isolation protocols (1985 and 1987), since there was a diversity of penicillin-resistant strains, and not just *B. thuringiensis*, as the protocol addresses. It is concluded that antibiotics help to understand the biochemical profile of these species, however, few antibiotics were efficient in the differentiation and characterization of *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* and *Brevibacillus spp.*, since several strains, mainly those belonging to the same phylogenetic group, showed very similar resistance patterns.

Keywords: Susceptibility; Antibiogram; Disc-Diffusion; Agar Dilution.

4.1. INTRODUÇÃO

Na identificação da maioria das espécies bacterianas, as investigações bioquímicas desempenham um grande papel na caracterização e classificação de cepas. A tendência desse método é refinar cada vez mais a identificação, para que não seja necessário a utilização de testes em excesso, simplificando assim o método de identificação. Além disso a identificação bioquímica fornece uma ideia do que esses microrganismos são capazes de fazer, sendo possível a discriminação de diferentes linhagens da mesma espécie por perfis bioquímicos específicos, uma vez que muitas linhagens de mesma espécie podem possuir características bioquímicas distintas (MARTINS, 2018).

É comprovado que os antibióticos possuem a capacidade de promover o processo de co-seleção bacteriana, baseando-se no perfil de resistência e/ou suscetibilidade das espécies (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006). Em termo genérico o agente antimicrobiano é utilizado para referir-se a substâncias naturais, ou seja, de origem biológica (antibióticos) ou a substâncias sintéticas (quimioterapêuticos) (MOTA *et al.*, 2010). Porém, em tese, o termo antibiótico é comumente utilizado para definir todos os tipos de agentes microbianos. Os antibióticos podem ser classificados, conforme a estrutura celular ou o sistema que afetam, sendo compostos bactericidas, quando há a destruição total da bactéria suscetível, ou como compostos bacteriostáticos, quando há a inibição reversível do crescimento bacteriano. Porém, em uma definição geral, os antibióticos são agentes seletivos tóxicos aos microrganismos, que induzem a morte celular dos mesmos (WALSH, 2005; FOX, 2015).

Os antibióticos classificados como β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas) possuem a função de inibir a síntese da parede celular, uma vez que as substâncias são análogas a D-alanil-D-alanina, responsável por formar a parte terminal dos peptídeos de reticulação (pentapeptídeos), aos quais são necessários para a formação de ligações cruzadas, entre os peptidoglicanos nas paredes celulares bacterianas (LAGACE´-WIENS; RUBINSTEIN, 2012).

A inibição da síntese de peptidoglicano, constituinte da parede celular, pode ocasionar autólise enzimática da mesma, sem essa impermeabilidade, a alta pressão osmótica, presente dentro da célula, rompe as membranas interna e/ou externa das bactérias. Alterações no citoplasma, contendo DNA e ribossomos que sintetizam proteínas e enzimas, bem como adulterações na integridade da membrana citoplasmática, que envolve a célula e mantém o conteúdo celular intacto, pode ocasionar a morte das células bacterianas (PELCZAR *et al.*, 1997, FOX, 2015).

Os antimicrobianos sintéticos de amplo espectro classificados em quinolonas, e seus derivados fluoroquinolonas, sulfonamidas e oxazolidinonas exercem ação antibacteriana através da interação com o DNA girase e das topoisomerasas bacterianas II e IV, aos quais participam juntas na replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA (GUIMARÃES *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012).

Além disso, existem inúmeras classificações e formulações de antibióticos de grande importância antibacteriana, dentre estas estão os macrolídeos (eritromicina), tetraciclina, daptomicina, platemicina, peptídios cíclicos (glicopéptidos, lipopeptídeos), bem como estreptograminas, lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, entre outros, sendo alguns destinados a inibirem a síntese de RNA (transcrição bacteriana), ligando-se à subunidade β da RNA-polimerase em bactérias, cloroplastos e mitocôndrias (rifamicina) (GUIMARÃES *et al.*, 2010; MADIGAN *et al.*, 2016). Ainda, alguns antibióticos são produzidos por bactérias, que possuem a função primordial de inibir a síntese proteica de outras espécies bacterianas, como por exemplo os aminoglicosídeos, que incluem a estreptomicina (*Streptomyces griseus*), e seus derivados, como a canamicina, neomicina e gentamicina (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Entende-se que a identificação de espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Bacillus* e gêneros correlacionados é sempre desafiadora, devido, principalmente, a variabilidade fenotípica encontrada nesses organismos. No entanto, a identificação dessas espécies com base nos resultados de testes de suscetibilidade é algo possível de ser alcançado, uma vez que existem diferentes níveis de suscetibilidade e resistência, dessas espécies, a determinados grupos de antibióticos, que podem ser consideradas características adequadas para a identificação (REVA *et al.*, 1995).

4.2. OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de resistência a antibiótico de 37 cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* como uma premissa de isolamento e característica taxonômica das espécies.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos das espécies *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* pelo método de disco-difusão e/ou antibiograma;

- Determinar o perfil de resistência a antimicrobianos das espécies *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* pelo método de difusão em ágar;
- Realizar uma comparação entre os dois métodos;
- Confrontar os protocolos de isolamento de *Bacillus* descritos pela OMS 1985 e 1987;
- Correlação de genes de resistência à antibióticos detectados no genoma das estirpes sequenciadas

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Seleção, cultivo e preparo das estirpes

Foram selecionadas 37 estirpes, pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, ao qual foram identificadas previamente por sequenciamento genético e qPCR, conforme descrito nos Capítulos 1 e 2, originando em 14 estirpes pertencem ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, sendo seis isolados de *B. thuringiensis* (S1450, S1576, S2782, S0615, S2566 e S1989), três de *B. cereus sensu stricto* (S0953, S0663, S0167), um *B. mycoides* (S2786), um *B. tropicus* (S0043), *B. luti* (S1624), *B. toyonensis* (S1647), *B. paranthracis* (S2781) e 16 estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, sendo cinco *B. subtilis sensu stricto* (S2794, S2796, S2896, S2790, S2776), seis *B. amyloliquefaciens* (S2785, S2784, S2787, S2788, S2791, S2536), dois *B. pumilus* (S2783 e S2795), um *B. atrophaeus* (S2792) e um *B. spizizenii* (S2893). As outras estirpes foram definidas como sendo *Priestia megaterium* (*B. megaterium*) (S1338), *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*) (S2538), *Lysinibacillus capsici* (S2894), *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127), *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438).

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura Embrapa-líquido por 72h a 30 °C (MONNERAT *et al.*, 2007). Para os dois métodos, a turvação da solução bacteriana foi ajustada conforme a escala de 0,5 Mac Farland Standart ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

4.4.2. Disco-Difusão

O método de disco-difusão (BAUER *et al.*, 1966), da marca Cefar Diagnóstica Ltda©, lote D0030 foi utilizado para verificar a ação antimicrobiana sobre as estirpes em estudo. Assim, foram utilizados os antibióticos: rifampicina (5 µg/mL); cloranfenicol (30 µg/mL); vancomicina (30 µg/mL); clindamicina (2 µg/mL); eritromicina (15 µg/mL); penicilina G (10 µg/mL); oxacilina (1 µg/mL); levofloxacino (5 µg/mL); ciprofloxacina (5 µg/mL); cotrimoxazol (25 µg/mL); tetraciclina (30 µg/mL); gentamicina (10 µg/mL), ceftazidima (30 µg/mL); ampicilina (10 µg/mL); cefazolina (30 µg/mL); amicacina (30 µg/mL); amoxicilina + ácido clavulânico (20/10 µg/mL); cefepima (30 µg/mL); azitromicina (30 µg/mL); ceftriaxona (30 µg/mL).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo realizado em triplicata. Uma porção de 2 mL do inóculo bacteriano foi semeado por toda a superfície da placa de Petri (15 cm) contendo meio de cultura Embrapa-ágar e, com auxílio de pinças esterilizadas foram depositados os discos contendo os antibióticos. Além disso, na determinação do controle positivo e negativo foram depositadas sobre a superfície das placas de Petri, discos de papeis filtros embebidos com dH₂O Mili Q autoclavada.

As placas de Petri foram então acondicionadas em estufa a 30 °C por 24 h. Após esse período de incubação, as zonas de inibição foram mensuradas com auxílio de um paquímetro, graduado em milímetros. As determinações das zonas de inibição foram baseadas e adaptadas conforme Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019, em que foram consideradas espécies resistentes com o diâmetro do halo de inibição < 14 mm ou suscetíveis com diâmetro do halo de inibição > 15 mm.

4.4.3. Diluição em Ágar

O método por diluição em ágar consistiu no preparo de placas contendo EMBRAPA-ágar (MONNERAT *et al.*, 2007) com diferentes concentrações de antibióticos. Assim, foram selecionados 23 antibióticos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) em forma de pó, como penicilina G, clindamicina, eritromicina, vancomicina, rifampicina, cefazolina, ceftriaxona, cloranfenicol, ampicilina, oxacilina, tetraciclina, lincomicina, claritromicina, polimixina B, clortetraciclina, sulfametoxazol, canamicina, azitromicina, cotrimoxazol, cloxacilina monohidratada, estreptomicina, amicacina e levofloxacino.

Para construção das soluções estoques, os antibióticos foram solubilizados pelos solventes, água estéril (penicilina G, clindamicina, vancomicina, ceftriaxona, oxacilina, estreptomicina, cloxacilina monohidratada, canamicina, levofloxacino e polimixina B), álcool

etílico 100% (cefazolina, cloranfenicol, ampicilina, clortetraciclina, tetraciclina, amicacina, lincomicina, claritormicina, azitromicina e cotrimoxazol) e dimetilsulfureto (rifampicina e sulfametoxazol). Posteriormente, essas soluções foram esterilizadas por filtro (unidade de filtro acionada por seringa MILLEX-GP de 0,45 µm – Millipore).

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs - µg/mL) foram definidas em 30, 70, 110, 150, 200, 250 e 300 µg/mL para todos os antibióticos avaliados. Essas concentrações foram diluídas em 50 mL de meio Embrapa-ágar em estado liquefeito (60 °C) e adicionados em placas de Petri. Essas placas foram então, acondicionadas em estufa por 72h a 30 ° C, a fim detectar qualquer possível contaminante no meio.

Passado esse período, iniciou-se o ensaio pela inserção de papeis filtros, anteriormente autoclavados, embebidos com solução bacteriana. Esses discos foram dispostos em quatro pontos da placa e o ensaio foi realizado em triplicata. Ao fim, as placas foram acondicionadas em estufa a 30 °C, sendo a primeira avaliação realizada após 24 h, e a segunda após 48 h. A avaliação consistiu na verificação do crescimento bacteriano sobre a ação do antibiótico em função da CIM.

4.5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1. Disco-difusão

O teste de resistência a antimicrobianos por disco-difusão indicou que 95% dos isolados de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* foram resistentes a pelo menos um ou mais dos 20 antibióticos testados, sejam os mesmos pertencentes a uma classe farmacológica semelhante ou a diferentes grupos químicos.

Houve uma maior resistência aos antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos, sendo 70% das estirpes resistentes à oxacilina, 65% à penicilina, 49% à ampicilina e 35% a amoxicilina + ácido clavulânico. Também foi constatado, que grande parte das cepas foram resistentes à compostos membros das cefalosporinas, grupo químico também pertencente aos β-lactâmicos, como a cefepima (49%), ceftazidima (49%), ceftriaxona (27%) e cefazolina (25%).

O comportamento de resistência à compostos originados de outras classes farmacológicas também foi constatado, uma vez que 70% das cepas foram resistentes a azitromicina, um composto da classe dos macrolídios. Além disso, 34% foram resistentes à

cotrimoxazol, um antimicrobiano do grupo das sulfonamidas, 16% a rifampicina, do grupo dos macrocíclicos, e 13% a clindamicina, uma lincosamida.

Poucas foram as espécies resistentes a cloranfenicol (5%), eritromicina (5%) e vancomicina (2%), e todas as cepas foram suscetíveis a amicacina, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacino e tetraciclina (Figura 1).

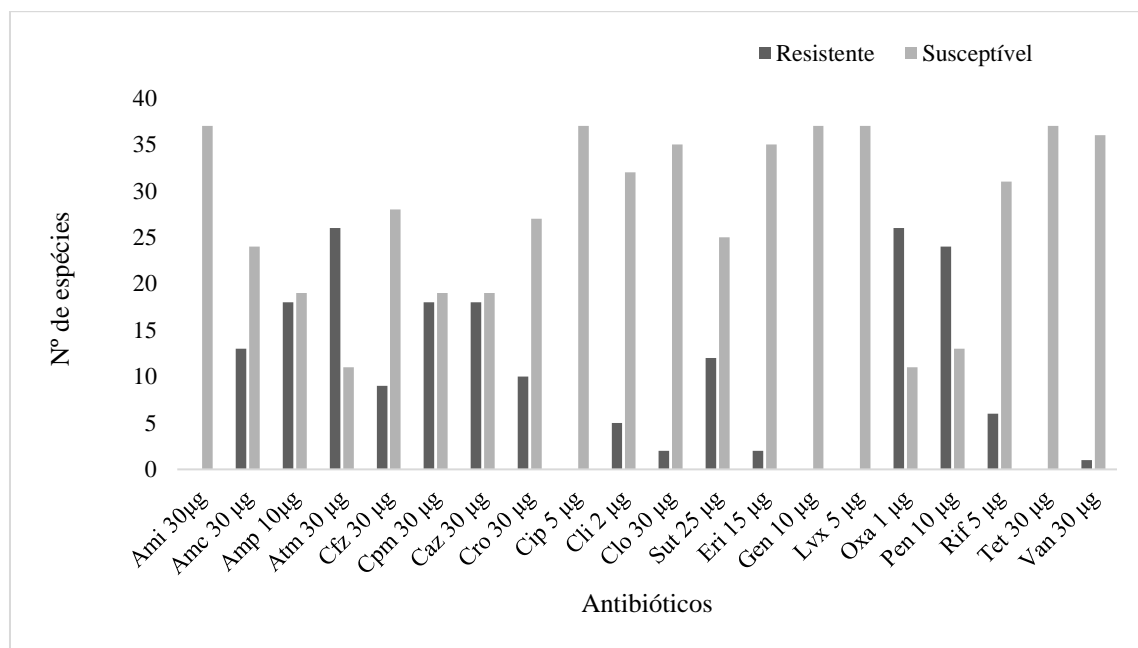


Figura 1. Perfil de resistência a antibióticos por disco-difusão de espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* com base no diâmetro da zona de inibição (mm); (preto) resistência, (cinza) suscetível.

A maioria das espécies pertencentes ao grupo *Bacillus cereus sensu lato* foram resistentes aos antibióticos da classe dos β -lactâmicos, com exceção apenas de uma cepa de *B. cereus* (S0953), ao qual foi suscetível à cefepima, ceftazidima, ceftriaxona e cefazolina. A estirpe S1624 (*B. luti*) foi suscetível a ceftazidima e as cepas S2786 (*B. mycoides*) e S2781 (*B. paranthracis*) foram sensíveis a ceftazidima e ceftriaxona. Entre os isolados de *B. thuringiensis* houve um comportamento similar de resistência aos antibióticos, contudo, o isolado S2566 (*B. thuringiensis*) foi resistente à clindamicina e eritromicina, enquanto os isolados S1989 e S2782 apresentaram resistência a rifampicina.

De acordo com a literatura, espécies pertencentes ao grupo *Bacillus cereus s.l.* são naturalmente resistentes à antibióticos β -lactâmicos, devido principalmente ao seu conteúdo β -lactamases e/ou por possuírem o gene de resistência *metallo-beta lactamase* em seus genomas,

sendo esse gene detectado no genoma das estirpes sequenciadas do grupo *B. cereus*. Além disso, alguns estudos revelam que essas espécies também possuem resistência a outros antibióticos comumente usados, como cloranfenicol, gentamicina, imipenem, eritromicina, tetraciclina e a combinação de trimetoprim/sulfametoxazol (HARIRAM; LABBE, 2015; OWUSU-KWARTENG *et al.*, 2017; FRENTZEL *et al.*, 2018; GYÖRGY *et al.*, 2021). Ademais, o mesmo comportamento de resistência foi observado por Luna *et al.* (2007) em espécies do grupo *B. cereus s.l.*, especificamente *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides* e *B. pseudomycoides*. Esses autores constataram que essas espécies foram resistentes à amoxicilina, ampicilina, ceftriaxona, penicilina e oxacilina, e um único *Bt* apresentou resistência intermediária a clindamicina, sendo muito semelhante ao que foi observado nesse estudo.

Em contrapartida, as estirpes pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato* foram mais suscetíveis aos antibióticos do que as estirpes do grupo *B. cereus s.l.* A título de exemplo, os isolados S2785 (*B. amyloliquefaciens*) e S2796 (*B. subtilis*) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados.

Além disso, foi verificado um padrão de resistência heterogêneo interespecies e intraespecies nesse grupo filogenético. Por exemplo, a cepa S2794 foi o único *B. subtilis* do grupo a ser resistente a ampicilina e a cloranfenicol, enquanto a cepa S2896 foi resistente apenas à penicilina.

As cepas de *B. pumilus*, S2783 e S2795 foram unicamente resistentes à cefepima, entretanto, a estirpe S2783 foi resistente também à azitromicina, ceftazidima e oxacilina, enquanto a S2795 foi resistente a apenas à cotrimoxazol e cloranfenicol. Ao contrário desses resultados, Irkitova *et al.* (2019) constataram em estudo que o nível de suscetibilidade de três cepas de *B. pumilus* foi homogêneo, ou seja, semelhante entre as estirpes. Além disso, esses autores indicaram que um nível diverso de suscetibilidade à antibióticos pode sugerir uma maior variabilidade genética entre bactérias de mesma espécie.

Também foi constatado que a espécie de *B. spizizenii* (S2893) foi resistente à vancomicina, rifampicina e eritromicina. Enquanto, a cepa S2777, um *B. licheniformis* foi resistente à azitromicina, clindamicina e oxacilina. A estirpe S2792 foi resistente a apenas rifampicina. Os perfis de resistência das estirpes de *B. amyloliquefaciens* foram bastante similares entre si, sendo constatada resistência a ampicilina, azitromicina, oxacilina e penicilina entre as cepas (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de resistência das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* Em que: Amicacina (Ami), Amoxicilina + Ácido clavulânico (Amc), Ampicilina (Amp), Azitromicina (Atm), Cefazolina (Cfz), Cefepima (Cpm), Ceftazidmia (Caz), Ceftriaxona (Cro), Ciprofloxacino (Cip), Clindamicina (Cli), Cloranfenicol (Clo), Cotrimoxazol (Sut), Eritromicina (Eri), Gentamicina (Gen), Levofloxacino (Lvx), Oxacilina (Oxa), Penicilina (Pen), Rifampicina (Rif), Tetraciclina (Tet), Vancomicina (Van). **R** = espécies resistentes; **(-)** = espécies suscetíveis.

Antibióticos

Estirpes	Ami 30 µg	Amc 30 µg	Amp 10µg	Atm 30 µg	Cfz 30 µg	Cpm 30 µg	Caz 30 µg	Cro 30 µg	Cip 5 µg	Cli 2 µg	Clo 30 µg	Sut 25 µg	Eri 15 µg	Gen 10 µg	Lvx 5 µg	Oxa 1 µg	Pen 10 µg	Rif 5 µg	Tet 30 µg	Van 30 µg
S0002	-	-	-	R	-	-	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-
S0043	-	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R	R	-	-
S0127	-	-	-	R	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
S0167	-	R	R	R	-	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-
S0615	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S0663	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-
S0953	-	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-
S1338	-	-	R	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S1431	-	-	R	R	-	R	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-
S1438	-	-	-	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
S1450	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-

Continuação...

Estirpes	Ami 30 µg	Amc 30 µg	Amp 10µg	Atm 30 µg	Cfz 30 µg	Cpm 30 µg	Caz 30 µg	Cro 30 µg	Cip 5 µg	Cli 2 µg	Clo 30 µg	Sut 25 µg	Eri 15 µg	Gen 10 µg	Lvx 5 µg	Oxa 1 µg	Pen 10 µg	Rif 5 µg	Tet 30 µg	Van 30 µg
S1576	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S1624	-	R	R	R	-	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S1647	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	-	-
S1989	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	-	-
S2536	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2538	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2566	-	R	R	R	R	R	R	R	-	R	-	R	R	-	-	R	R	-	-	-
S2776	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2777	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
S2781	-	R	R	R	-	R	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-
S2782	-	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	R	R	R	-	-
S2783	-	-	-	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
S2784	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-
S2785	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2786	-	-	-	R	-	R	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-
S2787	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S2788	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S2790	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2791	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-
S2792	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-

Continuação...

Estirpes	Ami 30 µg	Ame 30 µg	Amp 10µg	Atm 30 µg	Cfz 30 µg	Cpm 30 µg	Caz 30 µg	Cro 30 µg	Cip 5 µg	Cli 2 µg	Clo 30 µg	Sut 25 µg	Eri 15 µg	Gen 10 µg	Lvx 5 µg	Oxa 1 µg	Pen 10 µg	Rif 5 µg	Tet 30 µg	Van 30 µg
S2794	-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-
S2795	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-
S2796	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2893	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	R	-	-	R	R	R	-	R
S2894	-	-	-	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-
S2896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-

4.5.2. Diluição em Ágar

Para melhor compreensão e visualização desses resultados, vide Apêndice III. Em uma análise comparativa entre os dois ensaios de perfil de resistência por disco-difusão e diluição em ágar, constatou-se que os resultados obtidos por ambos os ensaios foram similares, uma vez que houve suscetibilidade das 37 cepas a amicacina e levofloxacino, e resistência a antibióticos do grupo β -lactâmicos por quase todos isolados, inclusive os do grupo *B. cereus*.

No entanto, foram observadas pequenas divergências no comportamento das estirpes sobre alguns compostos, como por exemplo ao uso do cloranfenicol, em que algumas cepas foram resistentes a esse fármaco em disco-difusão, e quando diluído em ágar verificou-se que todas as espécies foram suscetíveis a esse antibiótico. O mesmo fato foi constatado com o uso da azitromicina, em que 70% das estirpes foram resistentes a esse composto por disco-difusão, porém quando administrado em ágar, apenas as cepas S1989 e S2566 foram resistentes.

Esses resultados, portanto, revelam a existência de variações espécie- específicas nas resistências antimicrobianas das estirpes, bem como a existência de características intrínsecas atribuídas a cada espécie (ADIMPONG *et al.*, 2012). Além disso, pequenas variações na temperatura, composição do meio e solubilização do antibiótico, podem permitir que os antimicrobianos acessem enzimas, que inibam, retardam ou ativem o mecanismo de resistência na espécie (LUNA *et al.*, 2007).

Em uma avaliação geral, poucos foram os antibióticos eficientes na diferenciação e caracterização das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.*, uma vez que houve um alto índice de espécies resistentes aos antibióticos testados. Assim, verificou-se que 89% dos isolados foram resistentes a sulfametoxazol, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 70 $\mu\text{g/mL}$ entre as cepas, com exceção da estirpe S1647 (*B. toyonensis*), cuja CIM foi de 150 $\mu\text{g/mL}$, sendo esse um possível fator de identificação para a espécie. Um padrão semelhante de resistência foi observado com o antibiótico clortetraciclina, em que 43% das espécies foram resistentes a esse antimicrobiano a uma CIM de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 70 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, a cepa S0043 (*B. tropicus*) foi resistente até a CIM de 110 $\mu\text{g/mL}$.

Os antibióticos penicilina e polimixina B ocuparam o segundo maior índice de estirpes resistentes, representado por 81% das cepas. É perceptível que as espécies do grupo *B. cereus s.l.* foram as mais recorrentes, sendo a CIM, em grande parte, definido em 300 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, a resistência a esses compostos não foi somente exclusiva dessas espécies, mas

também de espécies como *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *Brevibacillus spp.* *Lysinibacillus spp.*, além de outras, que resistiram a ação desses compostos em CIMs de até 300 µg/mL.

O protocolo de isolamento e identificação de agentes de biocontrole produzido pela OMS de 1987 (WORD, 1987) descrevem que as espécies de *B. thuringiensis* e *B. cereus* são eficientemente isoladas e identificadas por penicilina, devido a resistência dessas espécies a esse antibiótico. De fato, isso é constatado nesse estudo, no entanto, o protocolo frisa que essas espécies são as únicas resistentes a esse antimicrobiano, fato esse desmitificado nesse trabalho, uma vez que houve um número diversificado de espécies de *Bacillus spp.* resistentes a esse composto, inclusive todo o grupo *B. cereus s.l.* Assim, realizar a caracterização de espécies de *B. thuringiensis* e *B. cereus* por essa técnica, pode levar à isolamentos e identificações errôneas, uma vez que várias bactérias do grupo *B. cereus sensu lato* foram resistentes a esse composto, e a outros antibióticos do grupo β-lactâmicos, bem como apresentam caracterizações morfológicas bastante similares entre si.

Desse modo, verificou-se que 70% cepas foram resistentes à ampicilina, oxacilina (57%), cefazolina (48%), cloxacilina monohidratada (46%) e ceftriaxona (38%). Entretanto, para esses antibióticos, com exceção da cefazolina, apenas as espécies pertencentes ao grupo *B. cereus s.l.* cresceram até a concentração máxima de 300 µg/mL. Houve também resistência das cepas S1338, S2538, S2566, S2777 e S2790 ao antibiótico clindamicina, sendo a S2566 (*B. thuringiensis*) a única estirpe resistente até CIM de 300 µg/mL. Esse mesmo comportamento de resistência foi observado com uso da eritromicina, em que houve três isolados resistentes até a CIM de 30 µg/mL, S1647, S2790, S2893 e duas estirpes resistentes até CIM de 70 µg/mL S2538 e S2566.

Em situações mais pontuais, em que o uso do antibiótico se tornou um fator de isolamento e identificação para a espécie, verificou-se que os isolados de *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127) foram as únicas resistentes a estreptomicina sob a CIM de 300 µg/mL. No entanto, esse comportamento não foi replicado na estirpe S2894 pertencente ao mesmo gênero. Isso indica que este antibiótico pode ser um bom produto para ser utilizado no isolamento de espécies de *L. sphaericus* (WORD, 1985). Seguindo essa mesma premissa, a cepa S2792, *B. atrophaeus* foi resistente a rifampicina a 200 µg/mL. A cepa S2893, *B. spizizenii* foi resistente à vancomicina na concentração de 150 µg/mL e à cotrimoxazol na CIM de 200 µg/mL. O isolado S1431, após 48h de incubação foi resistente ao antibiótico canamicina a 150 µg/mL. A espécie de *B. thuringiensis* S2566 foi resistente a claritromicina a 110 µg/mL. A

azitromicina as estirpes S1989 e S2566, duas espécies de *B. thuringiensis* foram resistentes a 70 µg/mL e 200 µg/mL respectivamente.

A resistência bacteriana aos antimicrobianos deve-se principalmente as propriedades intrínsecas, ou seja, as características fenotípicas naturais de cada espécie, ou pela aquisição de genes de resistência advindos de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, ou a mutação de genes (EUROPEAN COMMISSION, 2005, EFSA, 2012, HERNÁNDEZ *et al.*, 2011). Essas propriedades adquiridas ou fenotípicas podem tornar as bactérias capazes de inativar rapidamente antibióticos específicos através da degradação, exportação dos antibióticos para fora da célula através do sistema de efluxo ou alteração do sítio alvo do antibiótico (EUROPEAN COMMISSION, 2005, BUTAYE, 2003, EFSA, 2012).

Ao usar ensaios clássicos de testes de resistência fenotípica, como métodos de disco-difusão e diluição em ágar, não é possível distinguir a resistência entre intrínseca e/ou adquirida (EFSA, 2012). Assim, a análise de sequência baseada no genoma torna possível detectar a presença de elementos genéticos móveis portadores de genes de resistência (AGERSØ *et al.*, 2019).

Diante desse contexto, através da análise do genoma das estirpes sequenciadas (Capítulo 1), verificou-se a presença de genes de resistência a antibióticos, sendo em maior parte presentes nas espécies pertencentes ao grupo *B. cereus s.l.*, como S2781, S0043, S2566, S0953, S2786 (Tabela 3). Nessas cepas foram detectados genes de resistência à penicilina (*bla*), cloranfenicol (*cat*), tetraciclina (*tetV* e *MMR peptide*), ampicilina (*bla 1*, *bla 2*, *bla 3*), clindamicina (*speG*), oxacilina (*fruB*, *gmk*, *hpt*, *purB*, *prsA*, *relA*), ceftriaxona (*Metallo-beta-lactamase*), polimixina B (*phoB*), clortetraciclina (*tetA*, *tetD*, *tetC*, *TetM/TetO*), sulfametoxazol (*folP*, *dhps*), amicacina (*aac(6')*), cloxacilina monohidratada (*mecA1* e *mecA2*), eritromicina (*ermB*) e vancomicina (*vanW*, *vanRB*, *vanR*, *vanY*).

Para as espécies sequenciadas do grupo *B. subtilis s.l.*, como S2536, S2784, S2788, S2785, S2787, S2791, S2794, S2795, S2796 e S2896 foram detectados os genes de resistência à cefazolina (*ampC*), à clortetraciclina (*tetD*) e à lincomicina (*irmrA* e *irmrB*). No entanto, apenas a estirpe S2791 (*B. amyloliquefaciens*) foi resistente a lincomicina a 70 µg/mL.

Não foram encontrados genes de resistência aos antibióticos estreptomicina, claritromicina, rifampicina, levofloxacino, azitromicina, cotrimoxazol e canamicina em nenhuma estirpe sequenciada. Também não foram detectados genes de resistência nas estirpes S2777, S2893, S2894, S1338, S2538.

De fato, a presença de alguns genes de resistência corrobora com os resultados de perfis de resistência obtidos pelos métodos de disco-difusão e por diluição em ágar, principalmente para as espécies do grupo *B. cereus s.l.* Todavia, é perceptível que existem divergências na comparação de alguns resultados, como por exemplo, a presença de genes de resistência a vancomicina detectados nos genomas das espécies do grupo *B. cereus s.l.*, sendo as mesmas suscetíveis a esse antimicrobiano quando realizados testes *in vitro*. No entanto, na cepa S2786 verificou-se a ocorrência do gene de resistência à amicacina, *aac (6')*, em seu genoma, porém a mesma foi suscetível a esse antimicrobiano, sendo esse fato explicado, teoricamente, pela não expressão do gene na espécie.

Também foi encontrada na estirpe de *Brevibacillus laterosporus* (S1438) a presença do gene de resistência a clortetraciclina (*tetD*), no entanto, essa cepa foi suscetível a esse antimicrobiano, enquanto a cepa S1431, outro *Brev. laterosporus*, foi o que apresentou resistência a esse antibiótico em uma CIM de 30 µg/mL, desse modo, observa-se há uma variabilidade de resistência dentre espécies.

Assim, em uma análise geral, é cabível dizer que a presença do gene não condiciona a expressão do mesmo no isolado, uma vez que a presença de um agrupamento gênico ou de um gene isolado em uma determinada cepa, não garante que a estirpe em questão, seja capaz de produzir ou expressar o metabólito esperado, uma vez que pode ocorrer silenciamento de genes (HARWOOD *et al.*, 2018).

Ainda, a ausência ou a não detecção de um determinado gene de resistência, não exclui a possibilidade da espécie ser resistente a um antibiótico, visto que existem uma infinidade de genes que possivelmente não foram explorados durante a análise da genômica comparativa.

Tabela 3. Triagem dos genes de resistência das espécies sequenciadas.

Antibióticos	Genes/Protein id	Estirpes
Penicilina	<i>Beta-lactamase (Bla) – EEN02991.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2786, S2781
	<i>Beta-lactamase (Bla) – EEN02341.1</i>	S2566, S0953, S2786
Cloranfenicol	<i>Chloramphenicol acetyltransferase (cat) – EEN03078.1</i>	S2566, S0953, S0043
	<i>Chloramphenicol acetyltransferase (cat) – EEN03042.1</i>	S2566, S0953, S2786, S0043

Tetraciclina	<i>Tetracycline resistance determinant tetV (tetV) – EEN03616.1</i>	S2566, S2786, S0043, S2781
	<i>Tetracycline resistance protein, metal-tetracycline/H⁺ antiporter (MMR peptide)</i>	S2566, S0953, S0043
Ampicilina	<i>Beta-lactamase – EEM56506.1</i>	S2781, S0043, S0953, S2786
	<i>Beta-lactamase 2 – EEM58965.1</i>	S2781, S0043, S0953,
	<i>Beta-lactamase 3 – EEM56128.1</i>	S2566, S0953, S2786
Clindamicina	<i>diamine N-acetyltransferase (spermidine acetyltransferase) (speG) – AAU15475.1</i>	S2781, S2566, S0043, S0953
Cefazolina	<i>Cephalosporinase (ampC) – AEK89513.1</i>	S2784, S2788, S2785, S2787, S2791, S2536
Ceftriaxona	<i>Metallo-beta-lactamase – EEN03296.1</i>	S2566, S0953, S2781, S0043, S2786
	<i>Metallo-beta-lactamase – EEN03019.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2781
	<i>Metallo-beta-lactamase – EEN02654.1</i>	S2566, S0953
	<i>Metallo-beta-lactamase – EEN02524.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2781
Oxacilina	<i>1-phosphofructokinase (fruB) – AAT60541.1</i>	S2781, S0043, S2786, S0953
	<i>guanylate kinase (gmk) – AAT60627.1</i>	S2781, S0043, S0953, S2566, S2786
	<i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hpt) – AAT60973.1</i>	S0043, S2781, S2786, S2566, S0953

	<i>adenylosuccinate lyase (purB) – AAT61303.1</i>	S0043, S2781, S2566, S0953, S2786
	<i>protein export protein prsA (prsA) – AAT62352.1</i>	S2781, S0043
	<i>GTP diphosphokinase (GTP pyrophosphokinase) (relA) – AAT63691.1</i>	S0043, S2781, S2566, S0953, S2786
Polimixina B	<i>Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein phoP – EEN01039.1</i>	S2566, S0953, S2781, S0043, S2786
	<i>Alkaline phosphatase synthesis transcriptional regulatory protein phoP – EEM98933.1</i>	S2566, S0953, S2781, S0043, S2786
Clortetraciclina	<i>tetA – AKR35333.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2786
	<i>tetD – QHM17925.1</i>	S2794, S2796, 2896, S2536, S2784, S2788, S2787, S2791, S2785, 1438
	<i>tetC – VIJ07022.1</i>	S2566
	<i>TetM/TetO – EEN02562.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2786, S2781
Sulfametoxazol	<i>Dihydropteroate synthase (folP) – ABK83487.1</i>	S2781, S0043, S2566, S0953, S2786
	<i>Dihydropteroate synthase (dhps) – EEM43996.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2781, S2786
Amicacina	<i>6'-N-acetyltransferase type Ib (aac(6)-Ib) – A0A1I6C487</i>	S2786
Cloxacilina Monohidratada	<i>Adapter protein mecA 1 – EEN04193.1</i>	S2566, S0953, S2781, S0043, S2786

	<i>Adapter protein mecA 2 – EEN03867. 1</i>	S2566, S0953, S2781, S0043, S2786
Eritromicina	<i>ermB – AAL91931.1</i>	S2566
	<i>Vancomycin B-type resistance protein (vanW) – EEN04719.1</i>	S2781, S0043, S2786, S0953
	<i>Two-component response regulator (vanRB) – EEN04276.1</i>	S0953
	<i>Two-component response regulator (vanR) – EEN03596.1</i>	S2781, S0043
Vancomicina	<i>carboxypeptidase VanY/endolysin of Bacillus cereus – EEM42132.1</i>	S2566, S0953, S0043, S2781, S2786
	<i>Peptidase M15B and M15C DD-carboxypeptidase VanY/endolysin – EEM37774.1</i>	S2566, S953, S2786
	<i>Vancomycin B-type resistance protein vanW – EEM36962.1</i>	S0953, S0043, S2781, S2786
	<i>Vancomycin B-type resistance protein vanW – EEM34690.1</i>	S0953, S2566, S2786
	<i>ImrA - AHZ14288.1</i>	S2785, S2536, S2791, S2784, S2788, S2787
Lincomicina	<i>ImrB - AHZ14287.1</i>	S2785, S2536, S2791, S2784, S2788, S2787

4.6. CONCLUSÕES

Os resultados dos perfis de resistências entre os métodos foram de forma geral similares, havendo pequenas variações entre cada método, como a existência de espécies resistentes a determinado antibiótico pela técnica de disco-difusão, porém suscetíveis quando diluídas em ágar.

Os antibióticos auxiliaram na compreensão do perfil bioquímico dessas espécies, contudo, poucos foram os antibióticos eficientes na diferenciação e na caracterização das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.*, uma vez diversas estirpes, principalmente aquelas pertencentes ao mesmo grupo filogenético apresentaram padrões de resistência bastante similares.

As espécies do grupo *Bacillus cereus sensu lato* formaram o maior índice de espécies resistentes nesse estudo, devido principalmente pela existência de vários genes de resistência detectados em seus genomas. Ademais, as espécies pertencentes a esse grupo são difíceis de serem separadas somente pela ação do antibiótico, o que poderia levar a interpretações e identificações ambíguas para essas bactérias.

Os resultados obtidos por esse estudo contradizem os apresentados nos protocolos de isolamento da OMS (1985 e 1987), uma vez que houve uma diversidade de estirpes resistentes a penicilina, e não somente *B. thuringiensis*, como trata o protocolo.

4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIMPONG, D. B.; SØRENSEN, K. I.; THORSEN, L.; STUER-LAURIDSEN, B.; ABDELGADIR, W. S.; NIELSEN, D. S.; JESPERSEN, L. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin *operon* and bacitracin biosynthesis. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 22, p. 7903-7914, 2012.

AGERSØ, Y.; BJERRE, K.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E.; NIELSEN, B.; SIEZEN, R.; STUER-LAURIDSEN, B.; WELS, M.; ZEIDAN, A.A. Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. **PLoS one**, v. 14, n. 1, p. e0210363, 2019.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J. V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 4, p. 176-182, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standard – 28th ed. M100**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2019.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 2003.

EFSA PANEL ON ADDITIVES AND PRODUCTS OR SUBSTANCES USED IN ANIMAL FEED (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 2740, 2012.

FOX, A. **Antibiotics that affect the cell envelope**. 2015. Disponível em: <https://www.microbiologybook.org/fox/antibiotics1.htm>. Acesso em janeiro de 2020.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 3, n. 6, p. 223, 2005.

FRENTZEL, H.; KRAUSHAAR, B.; KRAUSE, G.; BODI, D.; WICHMANN-SCHAUER, H.; APPEL, B.; MADER, A. Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. **Food Control**, v. 83, p. 90-98, 2018.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.

GYÖRGY, É.; LASLO, É.; ANTAL, M.; ANDRÁS, C. D. Antibiotic resistance pattern of the allochthonous bacteria isolated from commercially available spices. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 8, p. 4550-4560, 2021.

HARIRAM, U.; LABBE, R. Spore prevalence and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates from US retail spices. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 3, p. 590-596, 2015.

HARWOOD, C. R.; MOUILLON, J. M.; POHL, S.; ARNAU, J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HERNÁNDEZ, A.; SANCHEZ, M. B.; MARTÍNEZ, J. L. Quinolone resistance: much more than predicted. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 22, 2011.

IRKITOVA, A. N.; GREBENSHCHIKOVA, A. V.; DUDNIK, D. E. Antibiotic susceptibility of bacteria from the *Bacillus subtilis* group. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 9, n. 3, p. 363-366, 2019.

KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; COLLINS, J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010.

LUNA, V. A.; KING, D. S.; GULLEDGE, J.; CANNONS, A. C.; AMUSO, P. T.; CATTANI, J. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre® automated microbroth dilution and Etest® agar gradient diffusion methods. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 555-567, 2007.

MARTINS, P. H. R. Ampliação, caracterização fenotípica e estruturação da Coleção de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos nativas do solo do Distrito Federal. 2018. v. 100 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

MOTA, L. M.; VILAR, F. C.; DIAS, L. B.; NUNES, T. F.; MORIGUTI, J. C. Uso racional de antimicrobianos. **Medicina**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2010.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Characterization of Brazilian *Bacillus thuringiensis* strains active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, p. 291-295, 2007.

OWUSU-KWARTENG, J.; WUNI, A.; AKABANDA, F.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

REVA, O. N.; VYUNITSKAYA, V. A.; REZNIK, S. R.; KOZACHKO, I. A.; SMIRNOV, V. V. Antibiotic susceptibility as a taxonomic characteristic of the genus *Bacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 409-411, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as microbial larvicide**. Geneva: UNDP: World Bank: WHO, 24p. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR), 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of an informal consultation on the detection, isolation, identification, and ecology of biocontrol agent disease vectors**. WHO Mimeograph Document, 87 p., 1987.

WALSH, C. **Antibiotics: actions, origins, resistance**. **Natural Product Reports**, v. 22, p. 304-305, 2005.

CAPÍTULO 5 - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DOS GÊNEROS *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* POR ESPECTROMETRIA DE MASSA - MALDI TOF

RESUMO

A Espectrometria de Massa - MALDI-TOF MS é uma metodologia extremamente rápida e eficaz, que vem sendo utilizada em laboratórios de microbiologia em todo o mundo, inclusive no Brasil, para identificação bacteriana, bem como para verificação de alguns mecanismos de resistência e tipagem de amostras. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi realizar a abordagem comparativa por MALDI-Biotyper® visando à identificação de 37 isolados de *Bacillus* e espécies de gêneros correlacionados, advindos da Coleção Bacteriana de Invertebrados – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As 37 cepas foram selecionadas e destinadas a dois ensaios de identificação, em que o primeiro ensaio consistiu na identificação das 37 cepas por meio do confronto com o banco de dados privado e disponível no software MALDI-Biotyper®. Nesse ensaio, verificou-se que apenas uma estirpe, dentre 37 em estudo, foi identificada 100% a nível de gênero e espécie pela plataforma comercial MALDI-Biotyper®, sendo a estirpe S2786, denominada como *B. mycooides*. O segundo ensaio consistiu-se na criação de um banco de dados suplementar pela inserção dos espectros obtidos das 37 cepas anteriores. Posteriormente, realizou-se a identificação dessas cepas, como forma de validação do método, por meio do confronto com o banco de dados suplementar criado. Os resultados obtidos nesse segundo ensaio indicaram que apenas 9 cepas foram identificadas corretamente. Para as 28 cepas restantes não foi possível determinar uma identificação viável e contundente. Conclui-se que a identificação das espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* foi comprometida nesse estudo, visto que a biblioteca privada disponível na plataforma comercial MALDI-Biotyper® apresenta restrição no número e na diversidade de espécies registradas, pertencentes a esses gêneros. Além disso, a identificação das espécies por MALDI-Biotyper® mostrou-se restrita, uma vez que houve limitações por parte do software em identificar pontos de distinção que poderiam ser relevantes na diferenciação de espécies, principalmente daquelas espécies próximas filogeneticamente.

Palavras-chaves: MALDI-Biotyper®; *Bacilli*; Banco de dados.

ABSTRACT

Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS is an extremely fast and effective methodology, which has been used in microbiology laboratories all over the world, including Brazil, for bacterial identification, as well as for verifying some resistance mechanisms and typing of samples. Thus, the objective of this work was to carry out a comparative approach by MALDI-Biotyper[®] aiming at the identification of 37 *Bacillus* isolates and species of correlated genera, from the Bacterial Collection of Invertebrates — Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. The 37 strains were selected and destined for two identification trials, in which the first trial consisted of identifying the 37 strains by comparing them with the private database available in the MALDI-Biotyper[®] software. In this assay, it was found that only one strain, among 37 in the study, was 100% identified at the genus and species level by the commercial platform MALDI-Biotyper[®], being the strain S2786, called *B. mycooides*. The second trial consisted of creating a supplementary database by inserting the spectra obtained from the 37 previous strains. Subsequently, the identification of these strains was carried out, as a way of validating the method, through comparison with the supplementary database created. The results obtained in this second trial indicated that only 9 strains were correctly identified. For the remaining 28 strains, it was not possible to determine a viable and convincing identification. It is concluded that the identification of species belonging to the genera *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* and *Brevibacillus* was compromised in this study, since the private library available on the commercial platform MALDI-Biotyper[®] has a restriction on the number and diversity of registered species belonging to these genera. In addition, the identification of species by MALDI-Biotyper[®] proved to be restricted, since there were limitations on the part of the software in identifying points of distinction that could be relevant in the differentiation of species, especially those species that are phylogenetically close.

Keywords: MALDI-Biotyper[®]; *Bacilli*; Database.

5.1. INTRODUÇÃO

As linhagens de bactérias formadoras de esporos são agrupadas em 40 gêneros e sete famílias, sendo estas assim denominadas: Bacillaceae, Alicyclobacillaceae, Paenibacillaceae, Planococcaceae, Pasteuriaceae, Sporolactobacillaceae e Thermoactinomycetaceae, todas pertencentes a ordem *Bacillales*, classe *Bacilli* (GALPERIN *et al.*, 2013; LOGAN E HALKET, 2011; DE VOS *et al.*, 2009; LOGAN, 2009; FRITZE, 2004).

Os representantes desta ordem e classe são abundantes no solo, no ar e na água e sua biodiversidade é amplamente utilizada como fontes de enzimas industriais destinadas às indústrias alimentícia, têxtil, química e farmacêutica, como antibióticos (STAROSTIN *et al.*, 2015; ZHAO; KUIPERS, 2016). Além disso, muitas dessas espécies possuem elevado potencial de uso ambiental e agrícola, como na forma de bioinoculantes para a promoção de crescimento vegetal, solubilização de fósforo, fixação de nitrogênio, como biorremediadores de sistemas contaminados, e principalmente como biopesticidas para o controle de pragas e doenças de interesse agrícola e vetores de doença (GOI *et al.*, 2006; LANNA-FILHO *et al.*, 2010; RAMÍREZ *et al.*, 2014).

Dentro da classe *Bacilli*, o gênero que integra o maior número de espécies formadoras de endósporos é o gênero *Bacillus* (GORDON *et al.*, 1973). No entanto, ao longo de 30 anos, a sistemática de classificação deste gênero foi substancialmente revisada, e algumas espécies, antes pertencentes ao gênero *Bacillus*, deram origem a novos gêneros, considerados filogeneticamente correlacionados, como *Lysinibacillus*, *Brevibacillus*, *Priestia* e *Paenibacillus*, entre outros (STAROSTIN *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2020). Porém, existe uma dificuldade em distinguir e identificar algumas espécies deste grupo pelos métodos clássicos de identificação devido às semelhanças entre espécies intimamente relacionadas que compartilham um padrão de características fenotípicas, bioquímicas e genéticas, como nas sequências do gene 16S rRNA (BRANQUINHO *et al.*, 2014; CELANDRONI *et al.*, 2019;).

A espectrometria de massa MALDI-TOF (ionização de dessorção a laser assistida por matriz com determinação de massa por tempo de voo) tem sido considerada uma técnica rápida e confiável para identificação de bactérias em diferentes níveis taxonômicos quando comparada aos métodos convencionais, como alguns testes fenotípicos e genéticos (KEYS *et al.*, 2004; CLARK *et al.*, 2013).

A identificação microbiana realizada por MALDI-TOF/MS tem como princípio a comparação de espectros de massa obtidos do espécime estudado com espectros de cepas de referência depositados em um banco de dados (biblioteca). Essa comparação é realizada com o

auxílio de um software específico para comparação de espectros, por exemplo, a plataforma comercial Biotyper (Bruker Daltonics) (MELLMANN *et al.*, 2009; EMONET *et al.*, 2010; STAROSTIN *et al.*, 2015).

Entretanto, diferentemente dos métodos de identificação baseados em DNA, os quais se beneficiam de grandes repositórios públicos de sequências de DNA, os espectros de referência MALDI-TOF/MS não são universais, mas sim particulares, estando disponíveis apenas comercialmente. Além disso, essas referências microbiológicas são fortemente focadas em aplicações clínicas e ambientais, onde mesmo organismos comumente encontrados em amostras agrícolas ou de alimentos não são muitas vezes reconhecidos pelos sistemas MALDI-TOF/MS padrão e comercial (DRISSNER; FREIMOSER, 2017).

Assim, muitos desses problemas podem ser superados gerando espectros MALDI-TOF/MS de referência específicos para uma aplicação exclusiva em questão, de tal modo que alguns grupos de pesquisa precisam projetar seus próprios bancos de dados, algoritmos matemáticos e software internos como base comparativa (STAROSTIN *et al.*, 2015; RAHI *et al.*, 2016).

5.2. OBJETIVO GERAL

Identificar 37 isolados de *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*, advindos da Coleção Bacteriana de Invertebrados – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por espectrometria de massa – MALDI TOF MS e abordagem comparativa por MALDI-Biotyper®.

5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar quais dessas espécies bacterianas podem ser identificadas a partir dos espectros de referência disponíveis no banco de dados interno do MALDI-Biotyper;
- Avaliar a capacidade de identificação dos microrganismos a partir das referências criadas e identificar quais possíveis limitações foram geradas pelo software.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Cepas Bacterianas e Identificação Molecular

Foram selecionadas 37 estirpes, pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, ao qual foram identificadas previamente por sequenciamento genético e qPCR, conforme descrito nos Capítulos 1 e 2, originando em 14 estirpes pertencem ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, sendo seis isolados de *B. thuringiensis* (S1450, S1576, S2782, S0615, S2566 e S1989), três de *B. cereus sensu stricto* (S0953, S0663, S0167), um *B. mycoides* (S2786), um *B. tropicus* (S0043), *B. luti* (S1624), *B. toyonensis* (S1647), *B. paranthracis* (S2781) e 16 estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, sendo cinco *B. subtilis sensu stricto* (S2794, S2796, S2896, S2790, S2776), seis *B. amyloliquefaciens* (S2785, S2784, S2787, S2788, S2791, S2536), dois *B. pumilus* (S2783 e S2795), um *B. atrophaeus* (S2792) e um *B. spizizenii* (S2893). As outras estirpes foram definidas como sendo *Priestia megaterium* (*B. megaterium*) (S1338), *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*) (S2538), *Lysinibacillus capsici* (S2894), *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127), *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438).

5.4.2. Cultivo, extração e preparo das amostras para MALDI-TOF/MS

Inicialmente, os isolados bacterianos foram cultivados em meio de cultura Embrapa-líquido por 72 h. Posteriormente, esses isolados foram novamente cultivados por 72 h, porém em placas de Petri contendo meio de cultura Embrapa-ágar (MONNERAT *et al.*, 2007). Esses processos de cultivos tiveram como objetivo verificar a pureza da cultura, bem como garantir um material bem esporulado, fresco e ativo.

O cultivo para realização dos ensaios de identificação por MALDI TOF MS foi realizado em triplicata biológica, ou seja, três cultivos da mesma amostra. Assim, os cultivos das estirpes foram realizados a partir de repiques de colônias isoladas, adquiridas dos processos anteriores de inóculo. Esses cultivos foram feitos em meio de cultura Embrapa-ágar a 30 °C por 12 horas. É importante enfatizar que esse período de crescimento foi estabelecido anteriormente por análises preliminares. Além disso, esse período foi definido tanto para aquisição das MSPs (em inglês: *main spectra projection*) quanto para os espectros_test.

Passado o período de incubação de 12 h, realizou-se a extração do conteúdo proteico dos isolados, para posterior análise em espectrômetro de massa MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics, Alemanha), conforme Agustini *et al.* (2014) e Bezerra (2015), com modificações. Para a extração, foram transferidos um total de 10 mg de massa bacteriana para um tubo de polipropileno de 2 mL contendo 300 µL de água ultrapura e 900 µL de etanol

absoluto (99,9%), esse material foi então homogeneizado e posteriormente centrifugado por 2 minutos a 13000 rpm. Após a centrifugação, o precipitado bacteriano foi dissolvido em 50 μ L de solução aquosa de acetonitrila a 100% e 50 μ L de ácido fórmico a 70%.

O sobrenadante obtido da centrifugação das amostras foi misturado a uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -HCCA) (Bruker, ref. 8255344) numa proporção de 1:3 (v:v, μ L: μ L) e a mistura foi aplicada em uma placa de aço inoxidável polido, modelo MTX-96 da marca Bruker Daltonics contendo 96 poços para análise.

A solução de matriz foi preparada na concentração final de 5mg/mL de α -CHCA diluído em uma solução aquosa de 250 μ L de acetonitrila a 70% (V/V) (ACN 80%, PA – J. T. Baker, CAS n° 75-05-8), 50 μ L de ácido trifluoroacético diluído a 3% (V/V) (TFA 99%, PA – Mallinckrodt Chemicals) e 200 μ L água ultrapura.

5.4.3. Aquisição dos dados para a montagem das MSPs

Para a composição dos espectros de cada uma das estirpes, adotou-se os seguintes parâmetros: como triplicata biológica foram realizados três cultivos de cada cepa, sendo as mesmas aplicadas em três poços (*spots*) distintos, constituindo-se como triplicata técnica do plaqueamento. Para a análise espectrométrica de massa, foram adquiridos três espectros, triplicata de mensuração, de cada um dos poços (Figura 1). Portanto, 27 espectros foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics) após a devida calibração do equipamento usando o Protein Standard II (Bruker Daltonics). Os espectros, cuja faixa de massa foram de 2 kDa a 20 kDa, foram analisados e processados nos programas FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) e MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics).

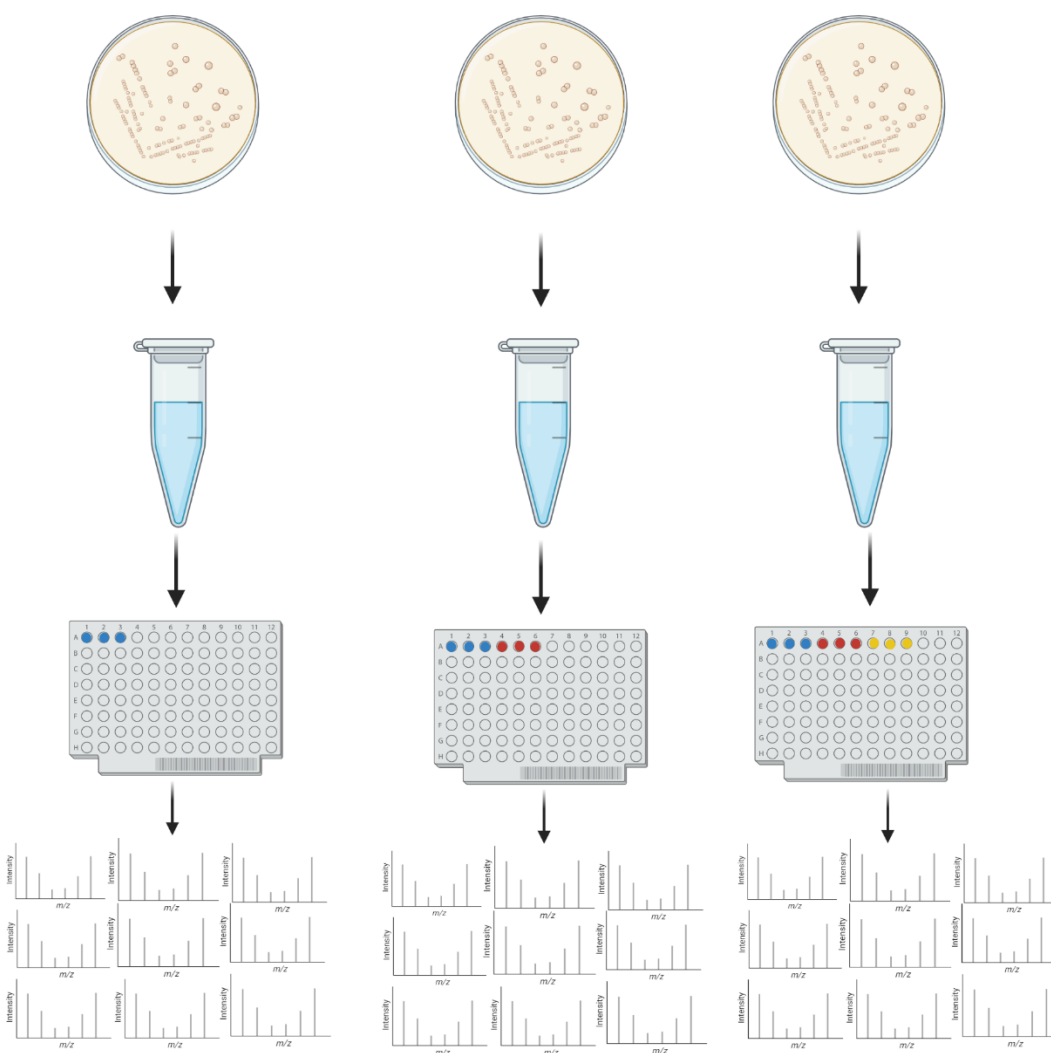


Figura 1. Panorama do ensaio de cultivo e aquisição dos dados para a montagem das MSPs. Fonte: A autora.

5.4.4. Ensaio de identificação preliminar via confronto com o banco de dados da plataforma Biotyper 3.0

Os 27 espectros foram importados pelo programa MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e submetidos a um procedimento de preparo de dados para as análises discriminatórias. Então, procedeu-se à comparação dos espectros individualmente com os espectros de referência constantes no banco de dados do Biotyper. Essa análise comparativa retorna valores de um indicador que apontam o quanto um dado espectro sob análise se iguala aos espectros de referência. Esse indicador [*score*], portanto, é o parâmetro quantitativo que permite avaliar o grau de certeza acerca da identificação das estirpes (Tabela 1). Assim, os resultados de saída do MALDI-Biotyper são geralmente expressos com valores de $\log(score)$

entre 0.000 e 3.000. Um *score* <1.700 indica que não foi possível identificar o gênero ou espécie da cepa; *score* entre 1.700 e 2.000 indica que a identificação pode ser confiável apenas em nível de gênero, enquanto um *score* \geq 2.000 indica que a identificação pode ser confiável tanto a nível de gênero, quanto a nível de espécie do microrganismo (MANZULLI *et al.*, 2021).

Tabela 1. Definição dos valores de pontuação (*scores*) atribuídos pelo programa MALDI Biotyper ao ensaio de identificação de bactérias contra a base de dados pré-estabelecida.

Pontuação	Descrição	Cor
2,300 — 3,000	Alta probabilidade de identificação da espécie.	Verde •
2,000 — 2,299	Segura identificação de gênero, provável identificação da espécie.	Verde •
1.700 — 1.999	Provável identificação do gênero.	Amarelo •
0.000 — 1.699	Sem identificação confiável.	Vermelha •

5.4.5. Montagem dos espectros principais (MSPs) das estirpes

Após a identificação prévia, os 27 espectros de cada estirpe foram devidamente processados¹ e usados para a composição dos respectivos MSPs², que passaram, então, a compor o banco de dados suplementar que ficaria à disposição para os procedimentos de identificação posteriores. Assim, para gerar os espectros da base dados, o programa MALDI-Biotyper processa os vários perfis de massa adquiridos do isolado e aplica um tratamento matemático padrão para condensar estes múltiplos espectros em um único espectro de referência, denominado como principal projeção espectral (em inglês: *main spectra projection* -MSP) ou espectro médio (FREIWALD; SAUER, 2009).

¹ Parâmetros do método de identificação 'MALDI BioTyper Preprocessing Standard Method_BiolCtrlProj': *i*) ajuste de massa: limite inferior, 2000 Da; limite superior, 20000 Da; resolução, 1; método, compressão de espectro com fator de compressão 10; *ii*) atenuação do traço: método, Stavitsky-Golay com tamanho do quadro de 25 Da; *iii*) subtração da linha de base: método, *Multipolygon* com janela de procura de 5 Da e 2 corridas; *iv*) normalização: método *Maximum Norm*; *v*) detecção dos picos: número máximo de picos, 100; limite de detecção do pico, 0,001; método de detecção dos picos, *Spectra Differentiation* com relação sinal/ruído estabelecida de 7.

² Parâmetros do método de composição dos MSPs 'BioTyper MSP Creation Standard Method': erro de massa máximo de cada Espectro, 2000 Da; erro de massa desejado para o MSP, 200 Da; frequência mínima desejada dos picos, 25%; número máximo de picos para compor o MSP: 70.

5.4.6. Ensaio de identificação via confronto com a biblioteca particular (MSPs)

Assim, logo após a criação do banco de dados suplementar realizou-se um segundo ensaio de identificação, a fim de verificar a capacidade de identificação do software, a partir das novas referências criadas (MSPs). Deste modo, para cada isolado (37) foram adquiridos nove espectros, denominados espectros-test, em espectrômetro MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics), sendo adotados seguintes parâmetros de aquisição: três cultivos independentes (triplicata biológica), aplicados em três poços (*spots*) distintos (triplicata técnica do plaqueamento), e apenas uma mensuração em cada poço (Figura 2). O cultivo também foi de 12 h em meio Embrapa-ágar.

Foi realizado novamente a calibração do equipamento, usando o Protein Standard II (Bruker Daltonics), e os espectros, cuja faixa de massa entre 2 kDa e 20 kDa foram analisados e processados nos programas FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) e MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics).

Esses nove espectros, relativos a cada estirpe, foram importados pelo programa MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e posteriormente, devidamente processados com vistas às análises discriminatórias. Então, procedeu-se à comparação dos espectros individualmente com os espectros de referência anteriormente inseridos no banco de dados do Biotyper.

Essa análise comparativa retorna valores de um indicador que apontam o quanto um dado espectro sob análise se iguala aos espectros de referência. Esse indicador [*score*], portanto, é o parâmetro quantitativo que permite avaliar o grau de certeza acerca da identificação das estirpes. Aqui foram seguidos, novamente, os valores de referência apresentados na Tabela 1.

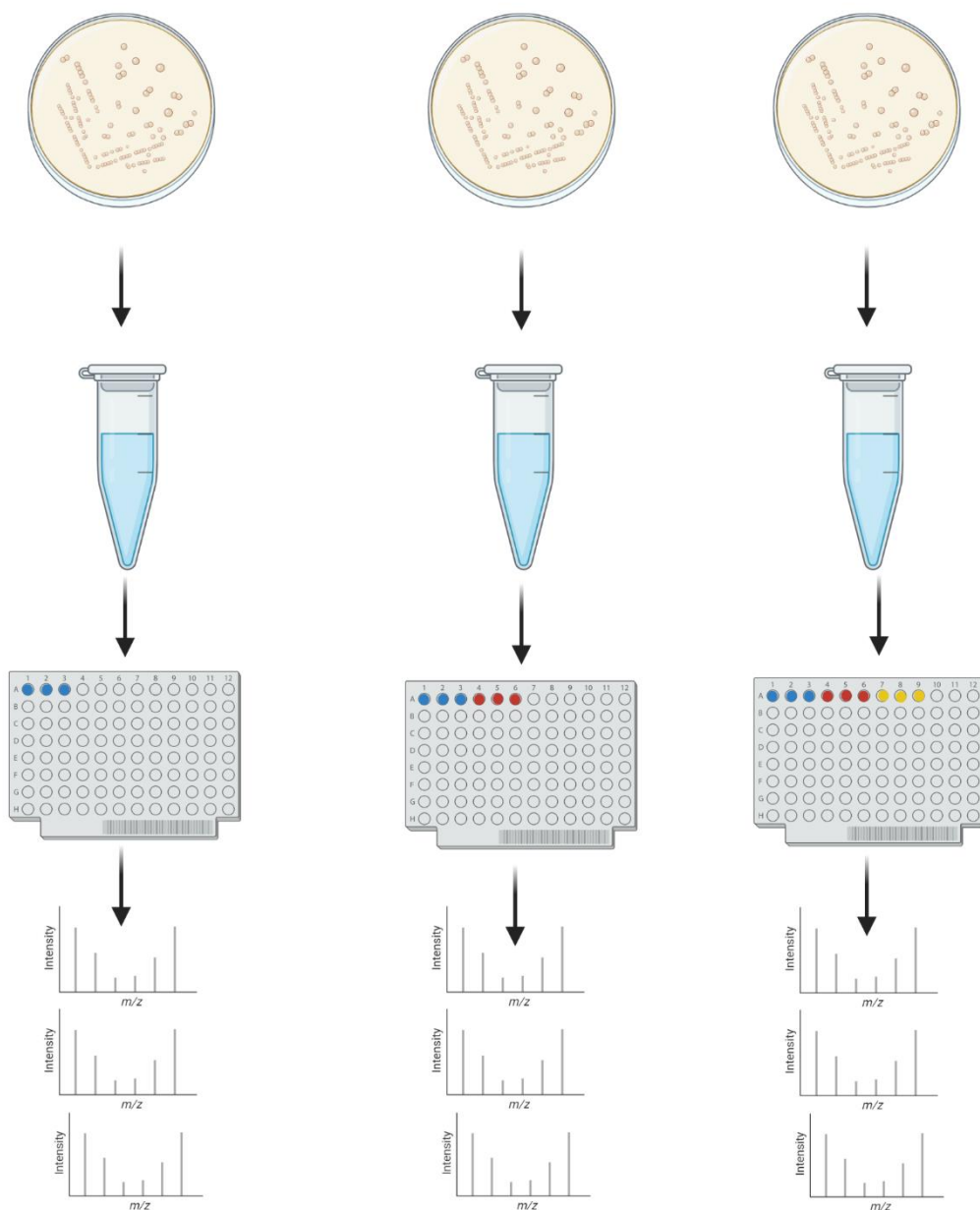


Figura 2. Panorama do ensaio de cultivo e aquisição dos dados para a montagem dos espectros_test. Fonte: A autora.

5.4.7. Processamento dos dados

Os gráficos dos espectros relativos a cada amostra foram processados pelo programa OriginPro8.5.

5.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises preliminares do ensaio identificação via confronto com a base de dados originalmente disponível no software comercial MALDI-Biotyper foram inconclusivas em nível de espécie para a maioria das estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* Dentre as 37 cepas, somente a cepa S2786 obteve pontuação suficiente para determinação segura da identificação de gênero e espécie (*score* 2,300 a 3,000), sendo a mesma definida com *Bacillus mycoides* pelo programa. A estirpe S2777 apresentou segura identificação de gênero e provável identificação da espécie (*score* 2,000 a 2,299), sendo a mesma, possivelmente definida, como sendo *Bacillus licheniformis*. Além disso, esses dois resultados corroboram com o que foi observado no Capítulo 1, em que essas duas estirpes foram identificadas por meio do sequenciamento genético como *B. mycoides* e *B. licheniformis*.

Entretanto, para as outras estirpes não houve identificação coerente em nível de filo, ordem, classe, gênero ou espécie. A plataforma padrão do MALDI-Biotyper contém espectros de referência de aproximadamente 6000 espécies, publicadas e validadas de microrganismos, de diferentes filios, ordens e classes, sendo predominantemente constituído por isolados de cunho clínico (AGUSTINI *et al.*, 2014) e contaminantes de alimentos (PAVLOVIC *et al.*, 2014). No entanto, para as espécies formadora de esporos, abrigados principalmente na classe *Bacilli*, o número de isolados decresce para 1.917, sendo esse, possivelmente, um indicativo da não identificação da maioria das espécies deste estudo, uma vez que grande parte desses isolados bacterianos não estão registrados dentro da plataforma comercial.

A partir desses resultados verificou-se a necessidade de se criar uma base de dados suplementar para constituir referências de comparação na rotina de identificação de amostras incógnitas. Desse modo, a biblioteca de referência da plataforma Biotyper (Bruker Daltonics) foi alimentada com 1026 espectros, obtidos dos 37 isolados bacterianos. Esta ação deu origem ao perfil proteico principal de cada cepa, ou seja, a MSP (Main Spectra Libray), no qual o espectro médio (MSP) foi calculado a partir dos 27 espectros adquiridos de cada estirpe, advindos do ensaio preliminar de identificação. Posteriormente como forma de validação dos dados e verificação da capacidade de identificação do software Biotyper por meio da biblioteca suplementar criada, realizou-se um segundo ensaio de identificação, a partir dos nove espectros independentes, conforme descrito em metodologia.

Assim, quando seguidas as condições rigorosas de identificação baseadas no *score* acima de 2.300, em todos os três cultivos independentes, verificou-se que 9 perfis peptídicos, dentre as 37 cepas em estudos obtiveram correspondência com as MSPs de origem, ou seja,

com o espectro inserido no banco de dados, e identificações confiáveis a nível de gênero e espécie (> 2.3), sendo essas S0002, S1338, S2566, S2777, S2783, S2785, S2784, S2794, S2796 e S0043 (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos isolados sob um ou mais cultivos independentes, em um *score* > 2,3.

<i>Score</i> > 2,3			Identificação dos isolados por técnica de referência	Identificação segura (2 ou + cultivos ID)	Identificação coincidente	Identificação não coincidente	Elemento de confusão
Número de cultivos							
1	2	3					
*0	1	0	S0167 – <i>Bacillus cereus</i>	1	0	1	S0043 – <i>B. tropicus</i>
0	0	1	S0002 – <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	1	0	-
0	1	0	S0127 – <i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1	0	1	S0002 – <i>Ly. sphaericus</i>
0	0	1	S1338 – <i>Bacillus megaterium</i>	1	1	0	-
1	0	0	S1450 – <i>Bacillus thuringiensis kurstaki</i>	0	1	0	-
0	1	0	S1576 – <i>Bacillus thuringiensis azawai</i>	1	1	0	-
1	0	0	S1989 – <i>Bacillus thuringiensis israelenses</i>	0	1	0	-
1	0	0	S2538 – <i>Priestia aryabhattai</i>	0	0	1	S1338 – <i>P. megaterium</i>
0	0	1	S2566 – <i>Bacillus thuringiensis</i>	1	1	0	-
0	0	1	S2776 – <i>Bacillus subtilis</i>	1	0	1	S2794 – <i>B. subtilis</i>
0	0	1	S2777 – <i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	0	-
0	1	0	S2781 – <i>Bacillus paranthracis</i>	1	1	0	-
0	1	0	S2782 – <i>Bacillus thuringiensis israelenses</i>	1	0	1	S1989 – <i>B. thuringiensis</i>
0	0	1	S2783 – <i>Bacillus pumilus</i>	1	1	0	-
0	0	1	S2784 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1	0	1	S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>
0	0	1	S2785 – <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	0	-
1	0	0	S2786 – <i>Bacillus mycoides</i>	0	1	0	-
0	1	0	S2787 – <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	1	0	-
1	0	0	S2791 – <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	1	S2536 – <i>B. amyloliquefaciens</i>
1	0	0	S2792 – <i>Bacillus atrophaeus</i>	0	1	0	-
0	0	1	S2794 – <i>Bacillus subtilis</i>	1	1	0	-

Continuação...

<i>Score > 2.3</i>			Identificação dos isolados por técnica de referência	Identificação segura (2 ou + cultivos ID)	Identificação coincidente	Identificação não coincidente	Elemento de confusão
Número de cultivos 1	2	3					
0	0	1	<i>S2796 – Bacillus subtilis</i>	1	1	0	-
1	0	0	<i>S2893 – Bacillus intestinalis</i>	0	1	0	-
0	0	1	<i>S0043 – Bacillus tropicus</i>	1	1	0	-
0	1	0	<i>S0615 – Bacillus thuringiensis sotto</i>	1	0	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>
0	1	0	<i>S0663 – Bacillus cereus</i>	1	1	0	-
1	0	0	<i>S0953 – Bacillus cereus</i>	0	0	1	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>
0	0	0	<i>S1431 – Brevibacillus laterosporus</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S1438 – Brevibacillus laterosporus</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S1624 – Bacillus luti</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S1647 – Bacillus toyonensis</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S2536 – Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S2788 – Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S2790 – Bacillus subtilis</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S2795 – Bacillus pumilus</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S2894 – Lysinibacillus capsici</i>	0	0	0	-
0	0	0	<i>S2896 – Bacillus subtilis</i>	0	0	0	-

*Onde (1) corresponde a sim; (0) corresponde a não.

No entanto, quando impostas as mesmas condições de grau de certeza de identificação, isto é, $score > 2.3$, sem a obrigatoriedade de compatibilidade com a MSP de origem, de dois cultivos independentes, esse resultado se altera, resultando em 19 espécies identificadas (Tabela 2 e Apêndice IV). Desses 19 casos, apenas um isolado não obteve identificação coincidente com a espécie estabelecida por seqDNA/qPCR, sendo este o caso da S0167.

No procedimento de identificação por MALDI-Biotyper do isolado S0167 (*B. cereus*, por qPCR) como S0043 (*B. tropicus*, por seqDNA), verifica-se um grau maior de identidade entre os espectros teste do isolado S0167 (S0167_tst) com os espectros de referência do isolado S0043 (S0043_ref) (Apêndice IV). No entanto, destaca-se pelo menos três pontos de distinção entre esses espectros: os íons 2.012 Da, presente apenas nos espectros S0167_tst, o íon 2.670 Da, presente apenas nos espectros S0167_tst, e o íon 6.304 Da, presente nos espectros S0043_ref. É visualmente notável entre os grupos de espectros a diferença da proporção da intensidade do íon 3.804 Da em relação aos demais íons, isto é, nos espectros S0043_ref o íon 3.804 Da é muito mais intenso que os demais íons, enquanto nos espectros S0167_tst a intensidade de outros íons são equiparáveis à intensidade do íon 3804 Da. Embora não seja aconselhável tomar a intensidade de um íon como valor quantitativo confiável para fins comparativos, não é esperado que materiais idênticos exibam padrões espectrométricos assim tão díspares (Figura 1). Assim, é possível identificar uma limitação do software, neste caso em específico, no reconhecimento de elementos de identidade e distinção dos espectros comparados, o que pode ter gerado essa comparação equívoca.

De acordo com Wieser *et al.* (2012), uma desvantagem no uso do método de identificação baseado em MALDI-TOF/MS é que algumas espécies não possuem diferenças suficientes em suas sequências de proteínas ribossômicas para serem distinguidas, principalmente as espécies intimamente ligadas.

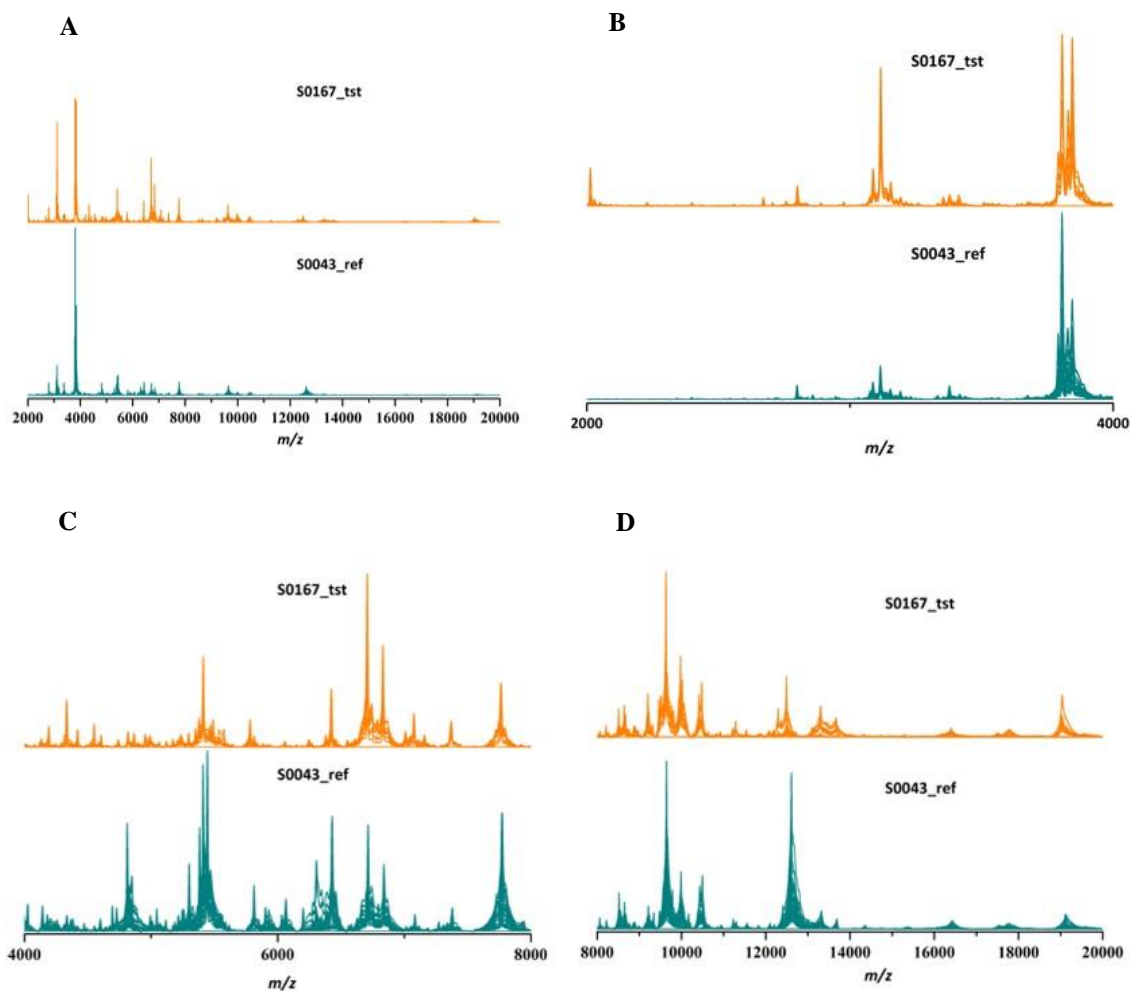


Figura 3. Perfil espectrométrico em análise comparativa dos isolados S0043 e S0167. **A** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167. **B** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167 entre as massas de 2 kDa a 4 kDa. **C** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167 entre as massas de 4 kDa a 8 kDa. **D** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S0043 e os espectros teste da estirpe S0167 entre as massas de 8 kDa a 20 kDa.

Seguindo os mesmos parâmetros de identificação, cinco estirpes (S0127, S2776, S2782, S2784 e S0615), das 19 identificadas, em dois ou mais cultivos, obtiveram uma identificação correta a nível de espécie, porém sem compatibilidade com a MSP de origem (espectro do isolado inserido no banco de dados) (Tabela 2). A exemplo disso, constatou-se que a cepa S0127, caracterizada como *Lysinibacillus sphaericus* por qPCR, foi identificada como S0002,

também identificada como *Lysinibacillus sphaericus* por qPCR. É visível que os espectros S0127_test são, de fato, muito semelhantes aos espectros S0002_ref, assim como se constata uma semelhança considerável entre os espectros S0127_ref e os espectros S0002_ref. Nesses casos, a identificação equívoca do isolado se deve sobretudo a uma proximidade das estirpes, sendo a identificação a nível de espécie considerada correta, porém é perceptível que existe uma limitação da abordagem de identificação do software MALDI-Biotyper em aprofundar e distinguir as semelhanças e diferenças presentes entre os espectros desses isolados (Figura 2).

Além destes dois casos, o isolado S2776 (*B. subtilis*, por qPCR) foi identificado como sendo o isolado S2794 (*B. subtilis*); o isolado S2782 (*B. thuringiensis israelenses*, por qPCR) foi identificado como sendo o isolado S1989 (*B. thuringiensis israelenses*, qPCR); o isolado S2784 (*B. amyloliquefaciens*, por seqDNA) foi identificado como sendo o isolado S2788 (*B. amyloliquefaciens*, por seqDNA); o isolado S0615 (*B. thuringiensis sotto*, por qPCR) foi identificado como sendo o isolado S1450 (*B. thuringiensis*, por seqDNA). Assim, com esses resultados observa-se que mesmo ocorrendo a identificação inequívoca com a MSP de origem, é perceptível que o software consegue realizar a identificação correta de algumas espécies.

Em uma análise mais rigorosa, no qual são considerados todos os três cultivos independentes, com *score* acima de 2,3, verificou-se que 18 estirpes não obtiveram identificações contundentes e confiáveis a nível de gênero e espécie. Porém, ao reduzir o rigor da análise para um cultivo independente (com *score* acima de 2,3), essa realidade se altera, uma vez que oito isolados bacterianos foram identificados pelo software sob esse critério de identificação. Entretanto, não seria plausível concluir que apenas um cultivo independente seria suficiente para determinar a identificação contundente e confiável da espécie.

Assim, ao explorar mais esses resultados, verifica-se que desses oito isolados bacterianos, apenas cinco cepas apresentaram identificação compatível com seu material de origem (MSP), sendo S1450, S1989, S2786, S2792 e S2893. E as outras três cepas apresentaram correspondência de perfil com outro isolado de referência, sendo um deles com o isolado de mesma espécie, como a S2791 (*B. amyloliquefaciens*) identificada equivocadamente como S2536 (*B. amyloliquefaciens*) e, dois com identificação equívoca da espécie, como a S0953 (*B. cereus*) identificada como sendo a S2782 (*B. thuringiensis israelenses*) e S2538 (*P. aryabhatai*) como sendo a S1338 (*P. megaterium*).

De acordo com Rao *et al.* (2019), a identificação equívoca entre as espécies *P. aryabhatai* e *P. megaterium* seria condizente com a real proximidade entre elas, uma vez que os autores, após realizarem testes morfológicos, bioquímicos e moleculares, baseado na

sequência 16 rRNA, reclassificaram a espécie *P. aryabhatai* (*B. aryabhatai*) como sendo um sinônimo heterotípico posterior de *P. megaterium* (*B. megaterium*), porém essa tese foi refutada por Gupta *et al.* (2022). Além disso, mesmo que os espectros de ambas as estirpes (S2538 e S1338) possuam sinais iônicos em comum, é perceptível a existência de alguns pontos de distinção entre seus espectros, que garantem a individualidade das duas espécies. Assim, os íons divergentes observados foram: 3.283 Da, 4.307 Da, 4.576 Da, 5.803 Da, 7.006 Da, 7.231 Da e 9.172 Da, para S1338; e 3.086 Da, 5.642 Da, 6.854 Da e 8.904 Da, para S2538 (Figura 3). Além disso, na análise dos *primers* por qPCR não houve identificação cruzada entre essas espécies, indicando serem diferentes (Capítulo 2).

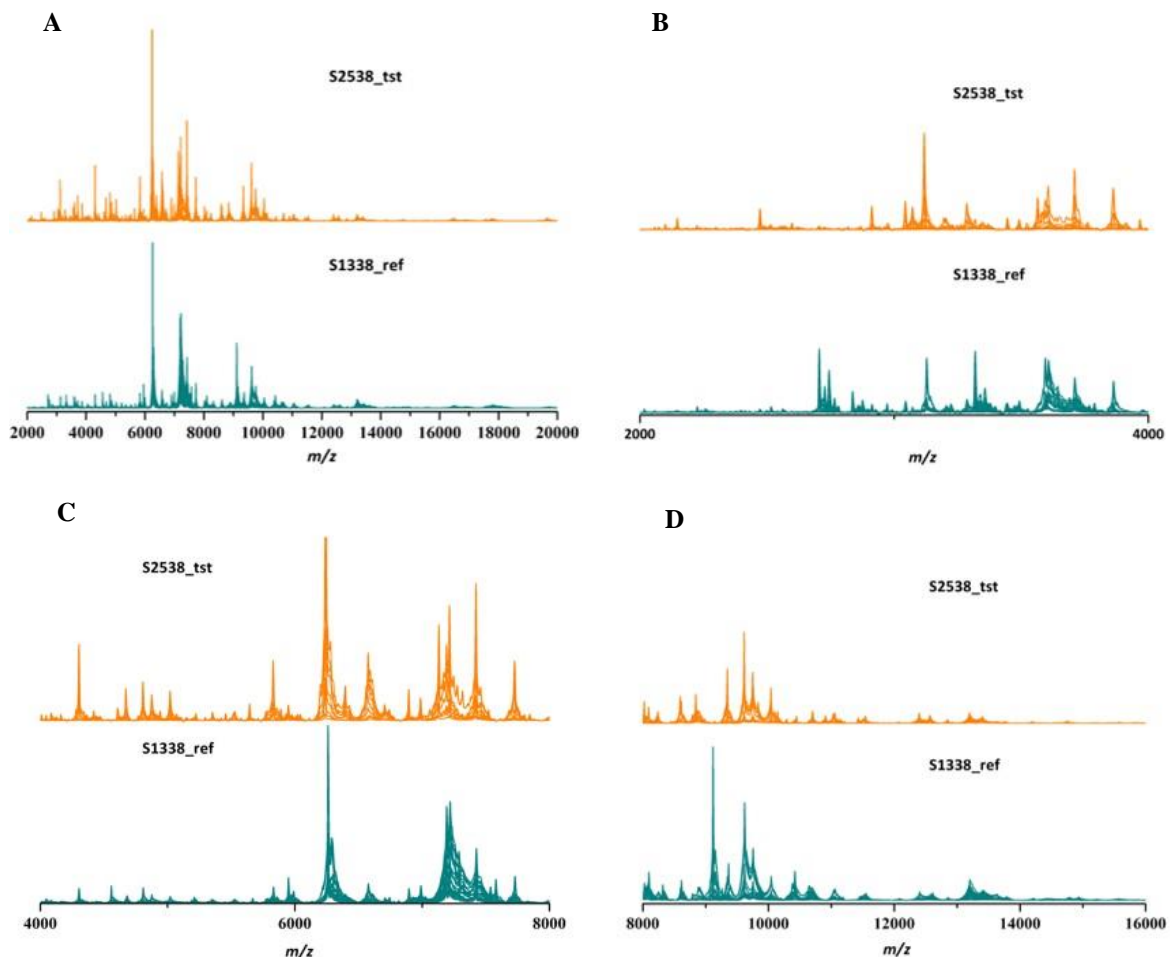


Figura 4. Perfil espectrométrico em análise comparativa dos isolados S2538 e S1338. **A** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538. **B** – Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538 entre as massas de 2 kDa a 4 kDa. **C** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe

S2538 entre as massas de 4 kDa a 8 kDa. **D** - Panorama de comparação entre os espectros de referência da estirpe S1338 e os espectros teste da estirpe S2538 entre as massas de 8 kDa a 16 kDa.

Para as 10 estirpes restantes (S1431, S1438, S2536, S2788, S1624, S1647, S2790, S2795, S2893, S2896), não houve identificação confiável dos isolados, sobretudo por carência de um grau de confiança suficiente para a identificação, com um *score* > 2.300. Entretanto, para os isolados S1431, S1624, S1647 e S2536 houve a identificação em nível de gênero (*Brevibacillus* e *Bacillus*), com *scores* > 1.700 e < 1.999, em dois ou mais cultivos.

Entende-se que as inconsistências na identificação e correspondência desses isolados com seu material de origem, ou com quaisquer espécies do grupo a que pertençam, podem estar relacionadas à rápida formação de endósporos, mesmo em um período curto de cultivo (12h). Essa tese é elucidada pelos autores Lasch *et al.* (2009) e Shu e Yang (2017), em que os mesmos descrevem que a variabilidade da composição celular de endósporos vegetativos afeta diretamente a identificação de membros do gênero *Bacillus*, sendo necessário um método que possa analisar proteínas totais de células vegetativas sem interferência de endósporos. Além disso, pequenas variações nas condições de cultura, extração e aquisição do material biológico podem comprometer a identificação, uma vez que a espectrometria de massa é extremamente sensível a variações externas.

A capacidade de processamento do software também pode influenciar na identificação precisa dessas amostras, uma vez que durante o processamento de alguns espectros, particularmente no que tange ao reconhecimento dos picos, alguns íons não foram reconhecidos e, portanto, não foram usados nas comparações. Esse baixo aproveitamento das informações poderia ser determinante na distinção e identificação de algumas espécies, bem como na separação destes isolados em subespécies, como no caso dos *B. thuringiensis*. De acordo com Freiwald e Sauer (2009), para uma análise proteômica bem-sucedida em linhagens estreitamente relacionadas, recursos informatizados adicionais, os quais atribuam maior peso aos sinais de massa mais significativos e conservados, podem levar à identificação até das subespécies dos isolados bacterianos.

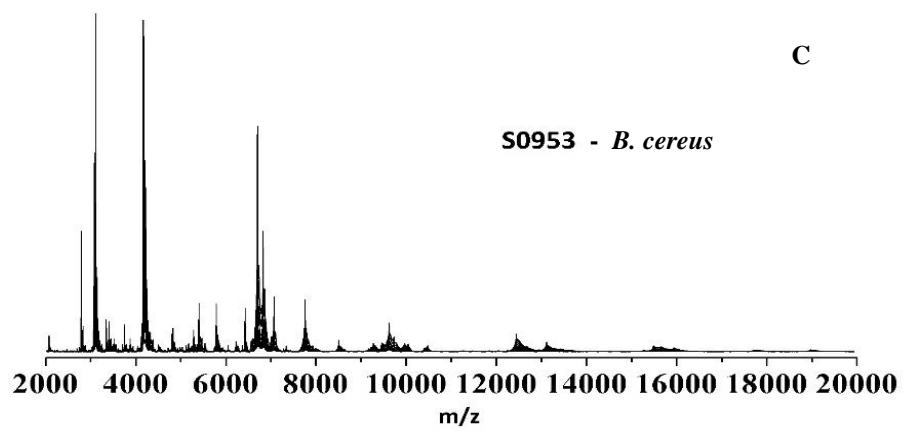
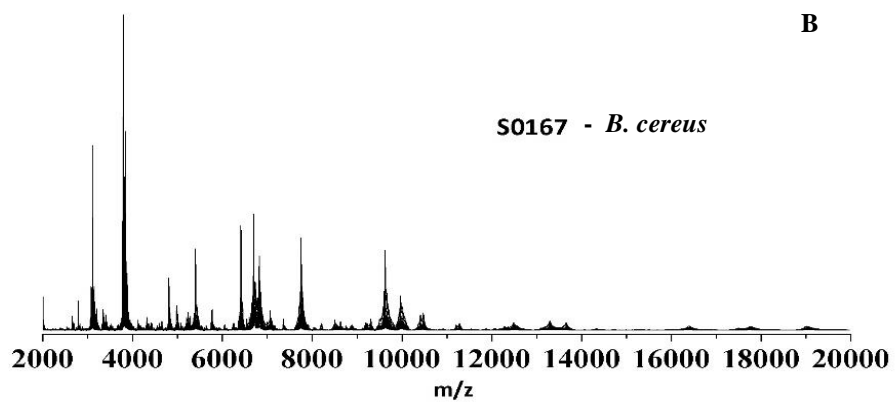
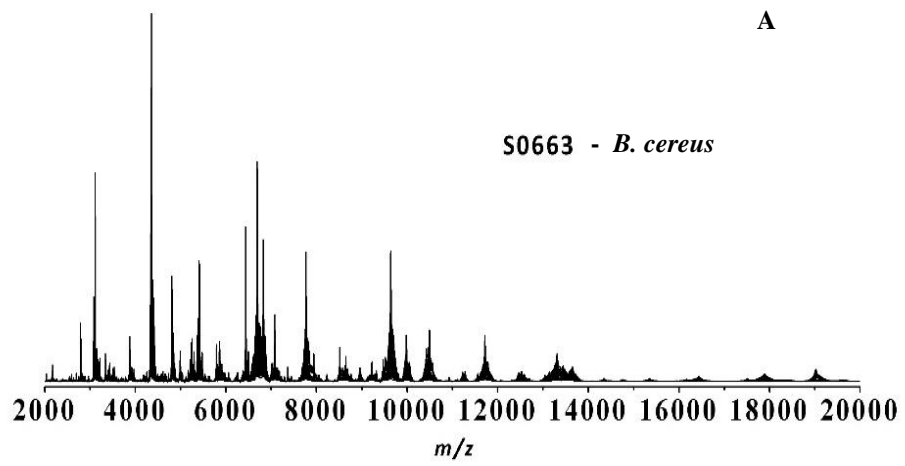
A comparação de espectros de massa desconhecidos e de referência, envolve a análise do espectro total e o reconhecimento de apenas picos distintos. A análise de picos específicos é mais seletiva, pois “mensura” picos específicos para determinado microrganismo, excluindo aqueles que são originados de ruído de fundo ou fatores exógenos (MANZULLI *et al.*, 2021).

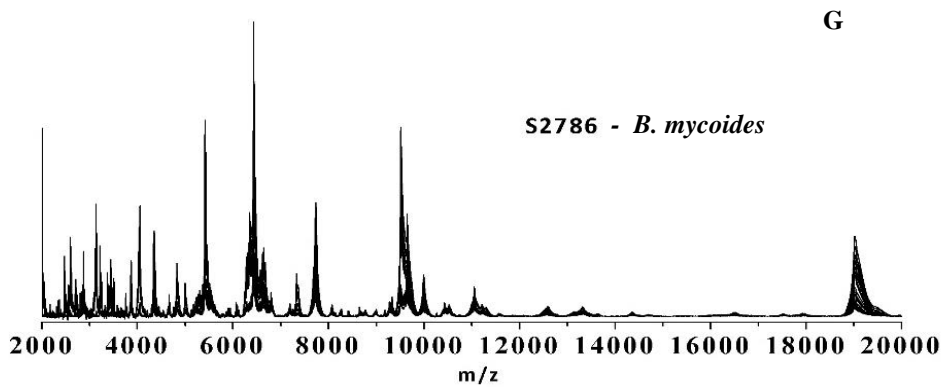
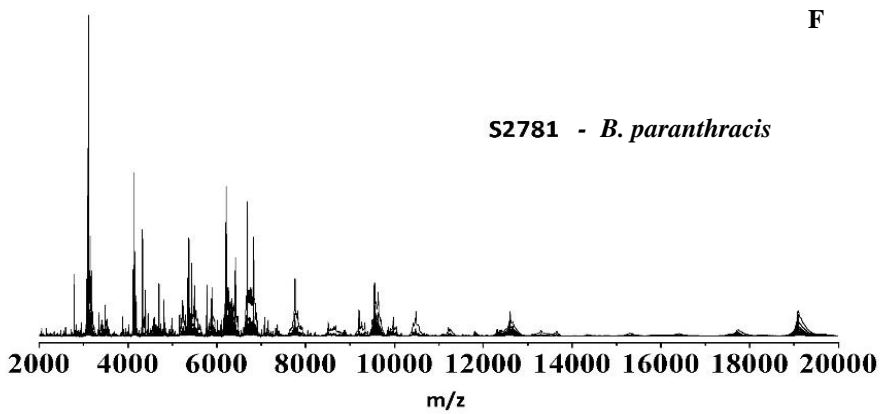
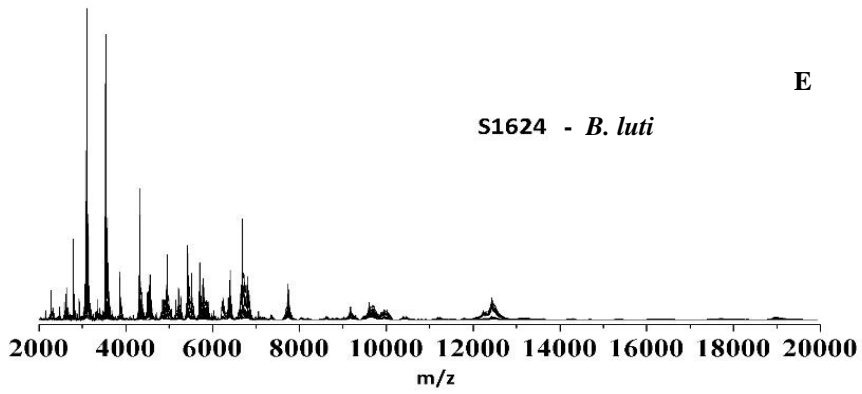
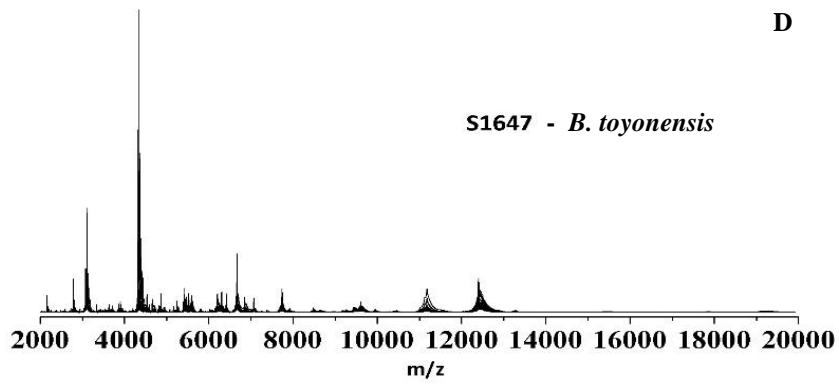
Assim, em uma análise geral do estudo, verifica-se que essas identificações confusas entre espécies, devem-se também pela semelhança da composição dos perfis espectrométricos em isolados pertencentes à mesma espécie e/ou de mesmo clado filogenético, como por exemplo os grupos *Bacillus cereus sensu lato* e *Bacillus subtilis sensu lato*. Além disso, ocorrência de perfis similares foi mais notável entre as estirpes de *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens*, haja vista que essas espécies estão em maior número nesse estudo.

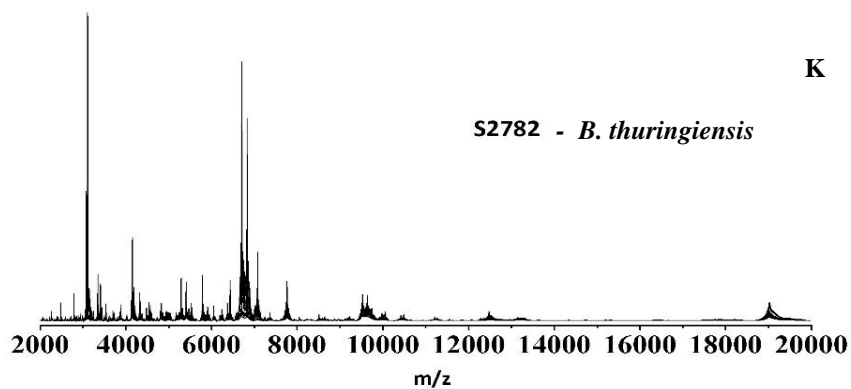
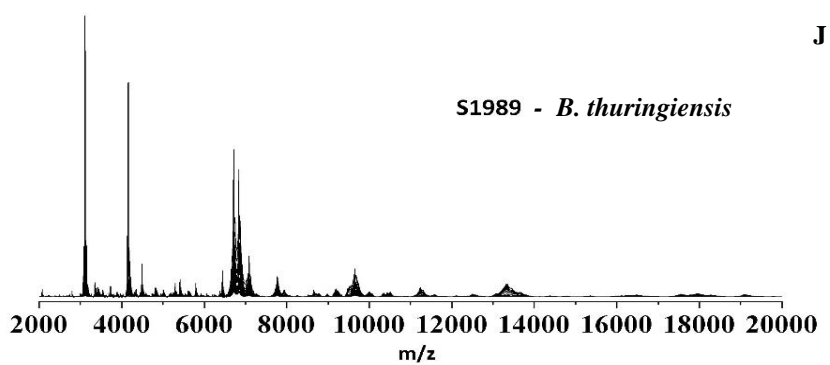
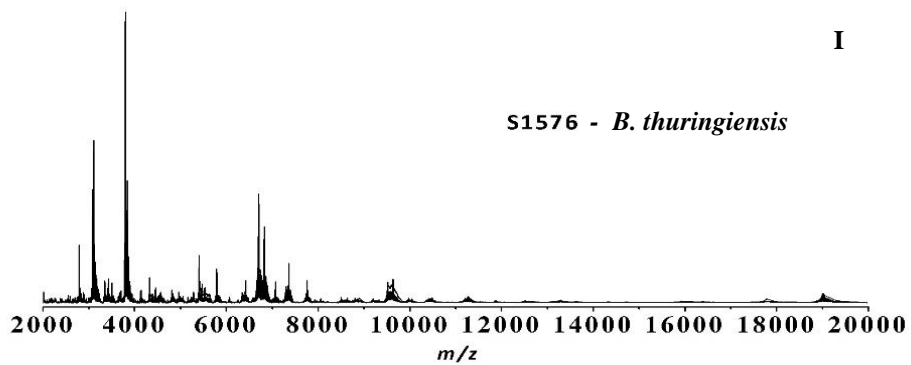
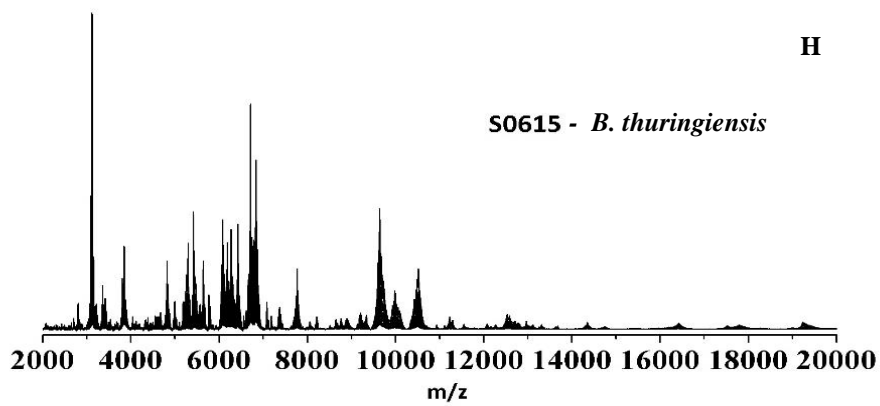
Entretanto, apesar de existir essa similaridade de perfis proteicos, observa-se a existência de elementos (íons) de distinção nesses espectros, que poderiam subsidiar a discriminação entre os isolados de mesma espécie ou de mesmo clado filogenético. No entanto, esses elementos de distinção não foram plenamente aproveitados, uma vez que a plataforma comercial MALDI-Biotyper limitou-se em processar sinais iônicos espécies-específicos, ou seja, íons específicos de cada espécie que poderiam auxiliar na distinção das mesmas. Assim, essa limitação do mecanismo comparativo do software ficou evidente em espécies do grupo *B. cereus s.l.*, *B. amyloliquefaciens*, *P. aryabhatai* e *Lysinibacillus sphaericus*.

Todavia, quando realizada uma análise visual e pura dos espectros, sem o processamento do software, verifica-se que entre os perfis espectrométricos do grupo *B. cereus s.l.* existe a ocorrência de picos específicos para cada espécie. Por exemplo, para a espécie de *B. paranthracis* (S2781) houve a presença de íons característicos de 4.724 Da, 5.505 Da, 6.856 Da, 7.405 Da. Em *B. mycoides* houve seis íons característicos de 2.003 Da, 2.920 Da, 4.007 Da, 4.781 Da, 5.010 Da e 9.330 Da. As espécies de *B. luti* (S1624) e *B. toyonensis* (S1647), mesmo identificadas apenas em nível de gênero, apresentaram alguns elementos distintivos, como os íons de 2.307 Da, 5.198 Da e 9.195 Da e 2.196 Da (S1624) e 4.410 Da, 5.248 Da e 6.903 Da (S1647), respectivamente.

Os perfis proteicos dos isolados de *B. cereus* e *B. thuringiensis*, no entanto, foram bastante similares entre si, ocorrendo apenas pequenas variações nos valores de íons, como por exemplo, íons de 3.387 Da, 4.889 Da, 5.442 Da, 6.854 Da, 7.776 Da, 10.428 Da, 19.137 Da presentes nas estirpes de *B. thuringiensis*, e íons de 2.792 Da, 3.089 Da, 5.406 Da, 6.400 Da, 6.900 Da, 9.614 Da, 10.014 Da, 13.310 Da, 19.010 Da presente nas cepas de *B. cereus* (Figuras 4).







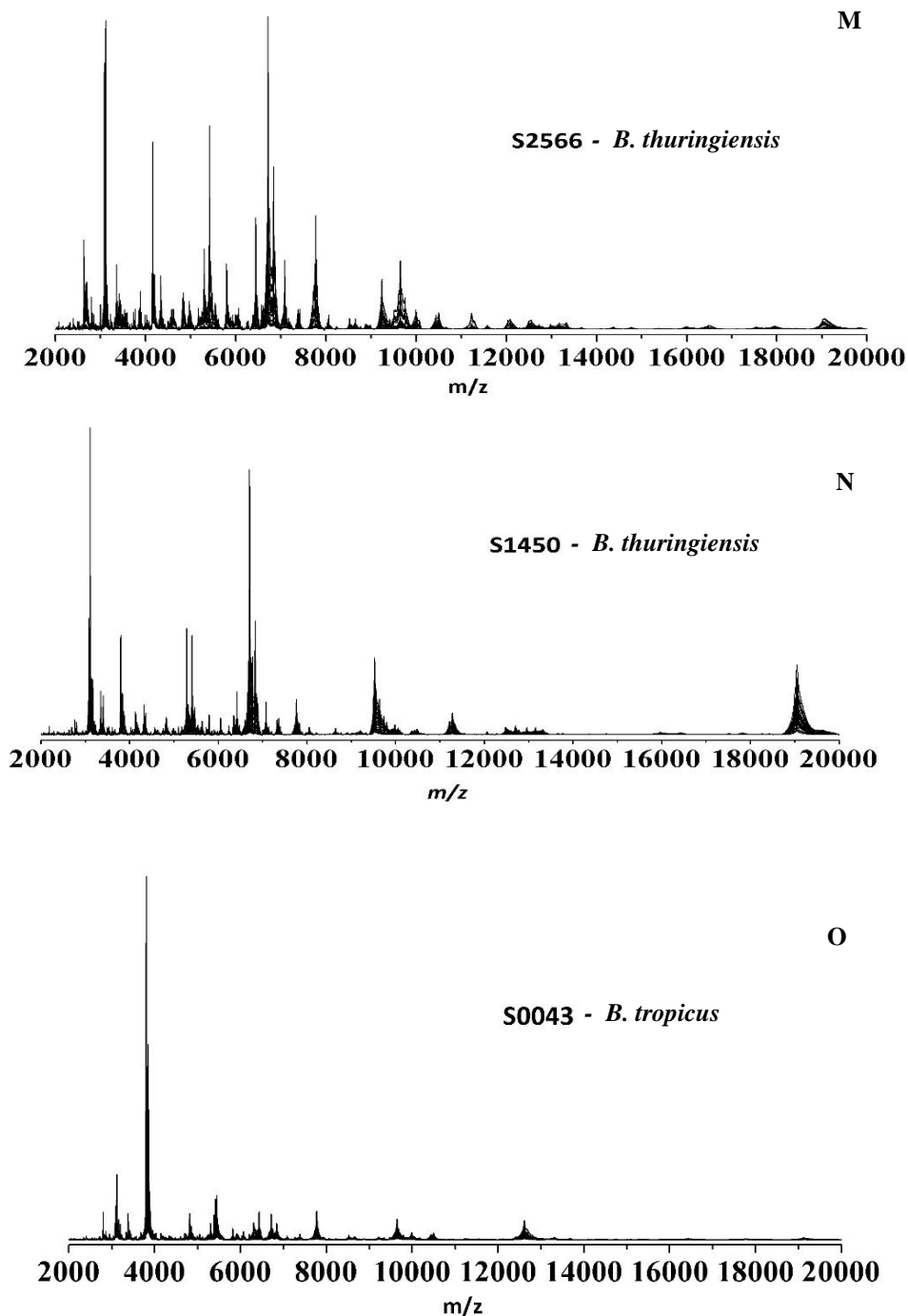


Figura 5. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do grupo *Bacillus cereus sensu lato* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** - *B. cereus* (S0663); **B** - *B. cereus* (S0167); **C** - *B. cereus* (S0953); **D** - *B. toyonensis* (S1647); **E** - *B. luti* (S1624); **F** -

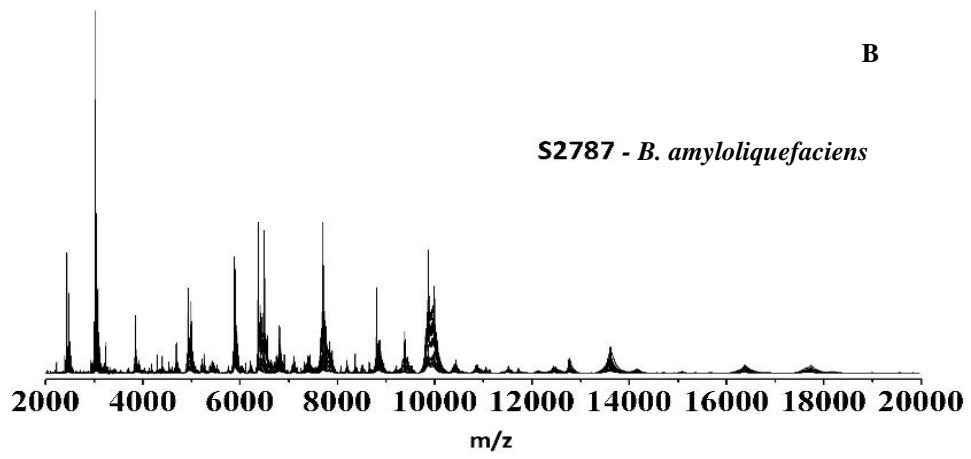
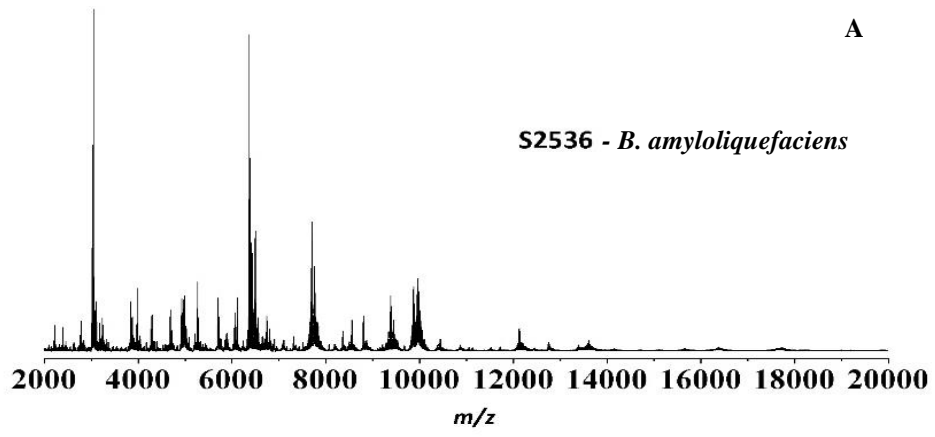
B. paranthracis (S2781); **G** – *B. mycoides* (S2786); **H** – *B. thuringiensis sotto* (S0615); **I** – *B. thuringiensis azawai* (S1576); **J** – *B. thuringiensis israelensis* (S1989); **K** - *B. thuringiensis israelensis* (S2782); **L** – *B. thuringiensis* (S2566); **M** – *B. thuringiensis kurstaki* (S1450); **N** - *B. tropicus* (S0043).

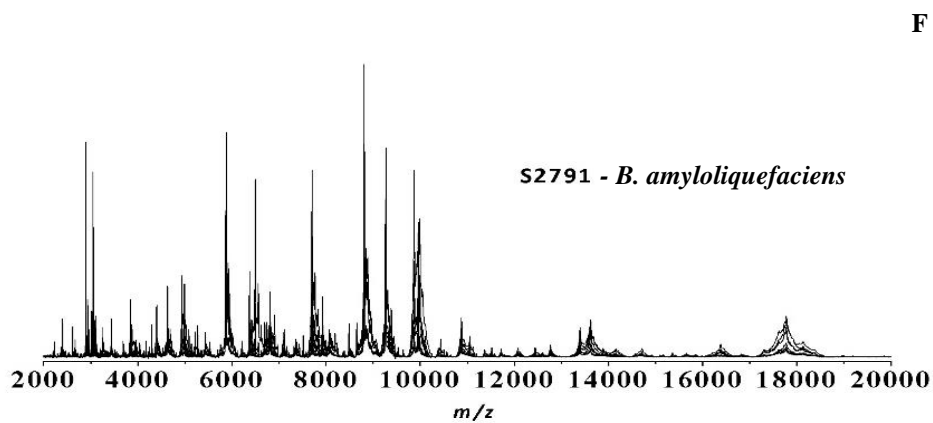
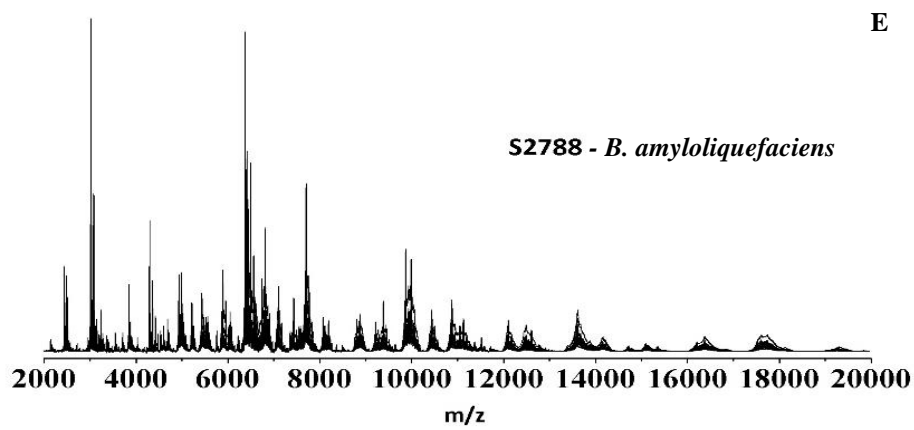
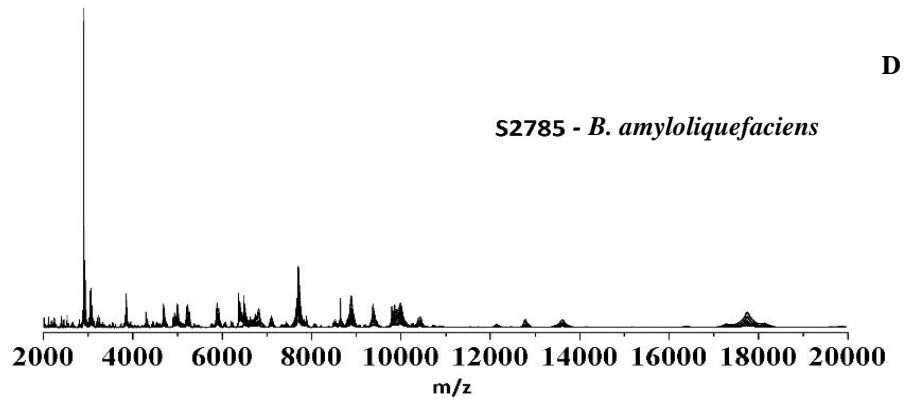
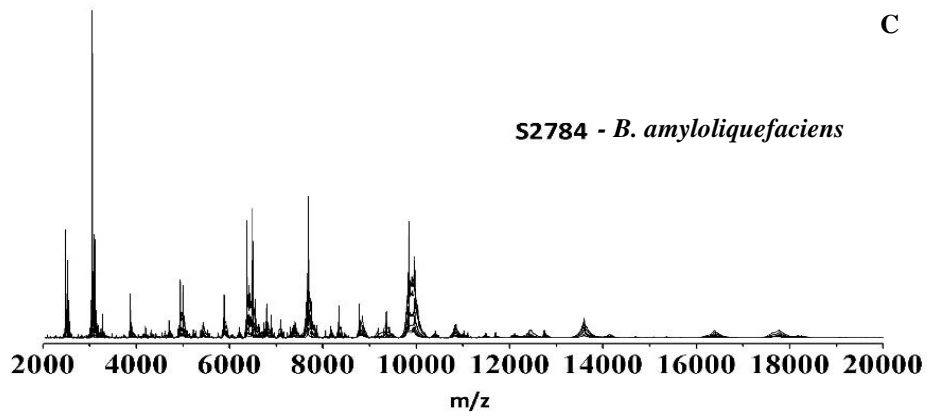
As espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis s.l* exibiram muitos elementos de distinção em seus perfis espectrométricos de massa. A título de exemplo, a cepa de *B. licheniformis* apresentou íons típicos de 4.535 Da, 7.479 Da, 8.082 Da, 9.091 Da e 12.616 Da. No isolado de *B. atrophaeus* houve a presença de sinais iônicos de 3.254 Da, 5.930 Da, 6.767 Da, 6.939 Da, 7.301 Da, 8.201 Da, 8.501 Da e 10.857 Da. Enquanto *Bacillus spizizenii*, outra espécie do grupo, teve picos específicos com valores de Da de 3.591, 5.109, 5.634, 7.211, 10.927, 11.734, 15.417. E para as espécies de *B. pumilus* íons de Da de 3.645, 4.258, 6.863 e 10.749 foram detectados.

Entre os espectros das espécies de *B. amyloliquefaciens* houve muitos íons em comuns, como 2.290 Da, 3.042 Da, 3.865 Da, 4.293 Da, 4.702 Da, 6.522 Da, 6.793 Da, 7.723 Da, 9.909 Da, 13.612 Da, 17.758 Da, no entanto, essas espécies diferiram das outras estirpes do grupo *B. subtilis s.l* por apresentarem sinais iônicos com valores de 2.228 Da, 3.848 Da, 4.707 Da, 6.416 Da, 13.600 Da e 17.749.

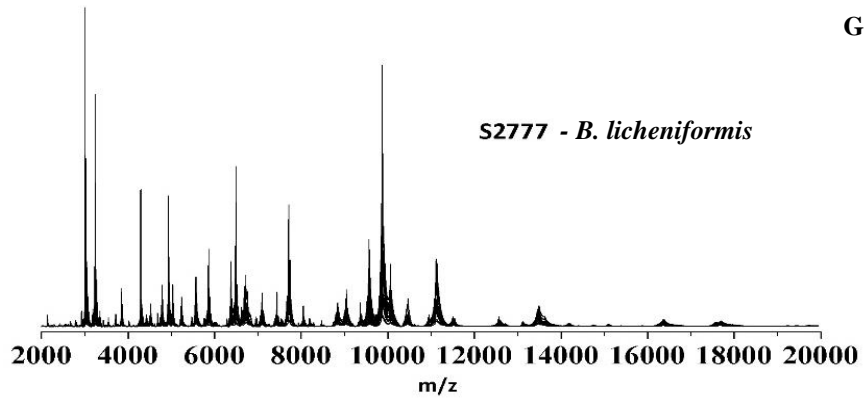
Na identificação da estirpe S2787 por espectrometria de massa – MALDI TOF MS, foi possível verificar a semelhança que a cepa possui com as outras espécies de *B. amyloliquefaciens*, uma vez que houve apenas a presença de dois íons específicos e distintos entre essas cepas, cujos valores são 4.433 Da e 7.462 Da. Assim, pela caracterização bioquímica da cepa S2787, por espectrometria de massa MALDI TOF é possível confirmar que essa cepa é um *B. amyloliquefaciens*.

Em conjunto, os isolados de *B. subtilis* apresentaram apenas um íon divergente das outras estirpes do grupo, sendo de 3.280 Da, porém, as espécies de *B. subtilis* obtiveram massas proteicas diferentes entre si. Como por exemplo, na cepa S2776 houve o aparecimento de íons de 5.083, 6.673 e 12.258 Da, enquanto na cepa S2896 ocorreram íons de 4.568, 5.366, 6.919, 9.120 e 10.110 Da. Estirpe S2790 íons com valores de 7.250, 8.498, 10.848 Da, e íons de 3.427, 5.788, 6.673, 8.191, 9.159, 11.562, 18.306 Da para S2796 (Figura 5).

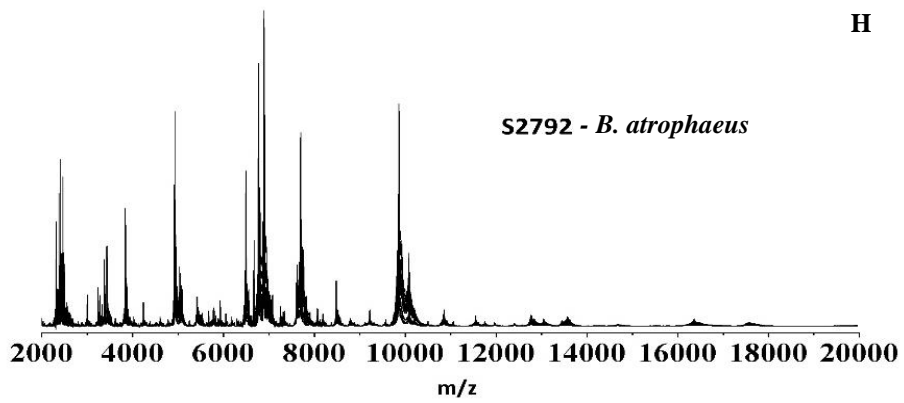




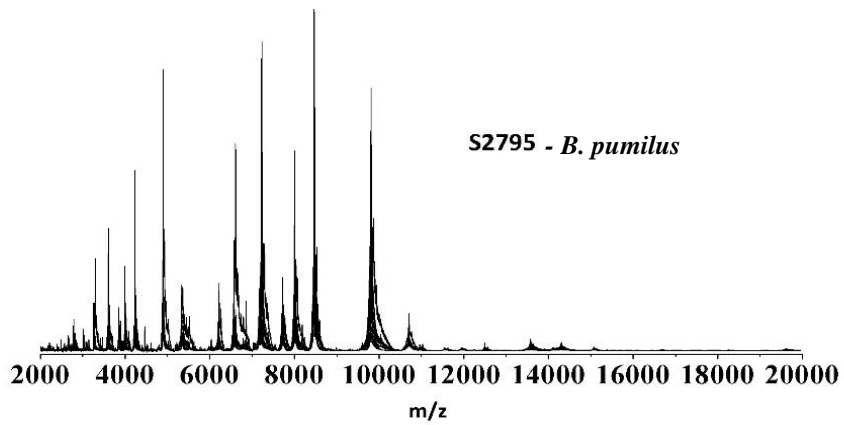
G



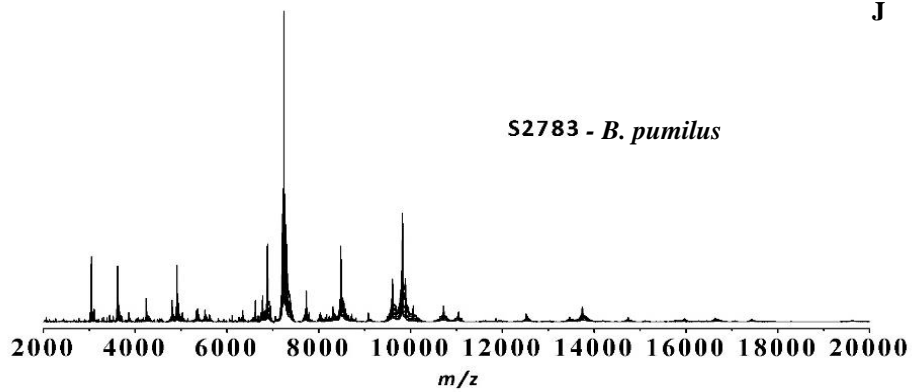
H

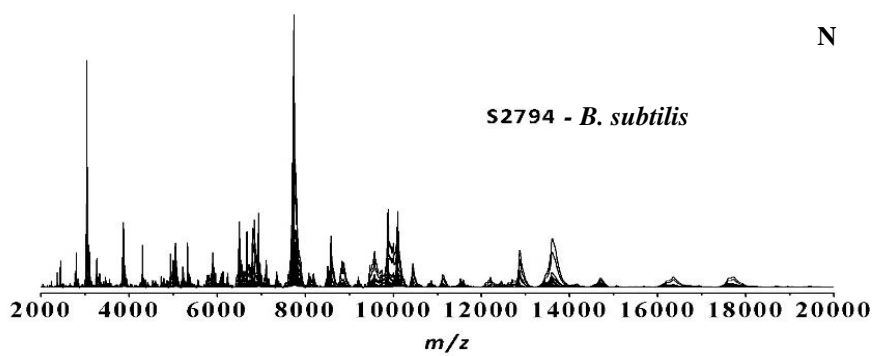
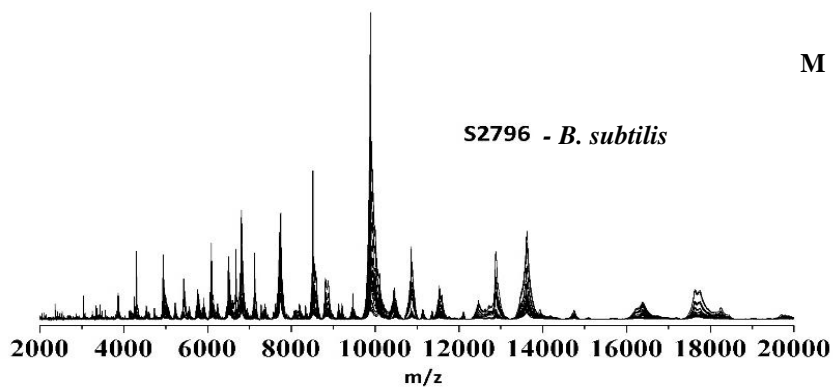
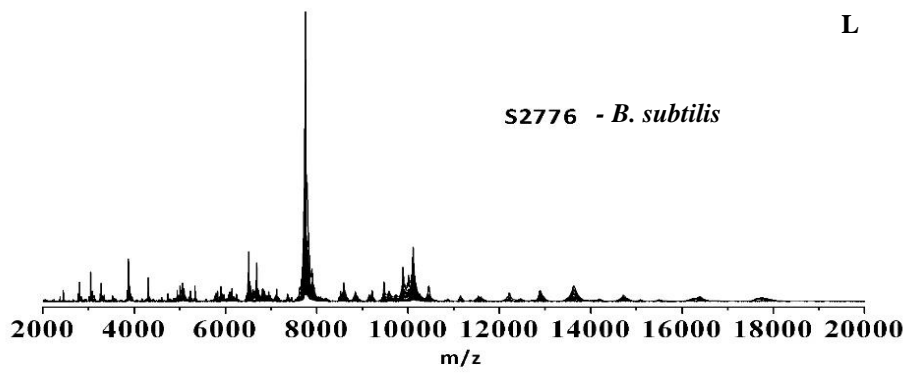
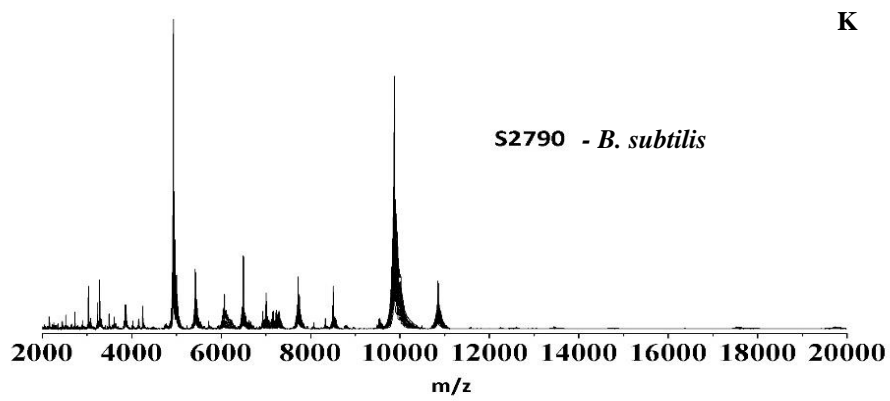


I



J





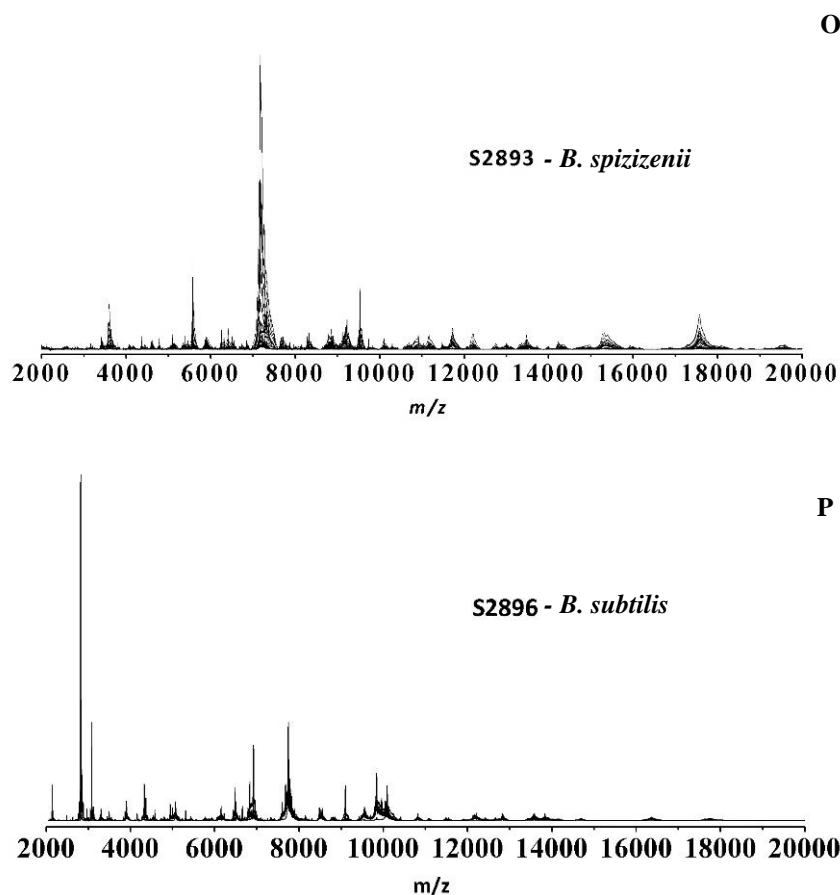


Figura 6. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do grupo *Bacillus subtilis sensu lato* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** – *B. amyloliquefaciens* (S2536); **B** - *B. amyloliquefaciens* (S2787); **C** – *B. amyloliquefaciens* (S2784); **D** - *B. amyloliquefaciens* (S2785); **E** - *B. amyloliquefaciens* (S2788); **F** - *B. amyloliquefaciens* (S2791); **G** – *B. licheniformis* (S2777); **H** – *B. atrophaeus* (S2792); **I** – *B. pumilus* (S2795); **J** – *B. pumilus* (S2783); **K** – *B. subtilis* (S2790); **L** - *B. subtilis* (S2776); **M** – *B. subtilis* (S2796); **N** – *B. subtilis* (S2794); **O** – *B. spizizenii* (S2893); **P** – *B. subtilis* (S2896).

Os espectros obtidos das cepas pertencentes ao gênero *Lysinibacillus* foram extremamente similares entre si, ocorrendo pequenas variações na intensidade dos sinais iônicos ou alguns picos de íons com valores próximos. Além disso, o íon de 7.500 Da, detectado nas três cepas, parece ser um sinal iônico característico do gênero (Figura 6).

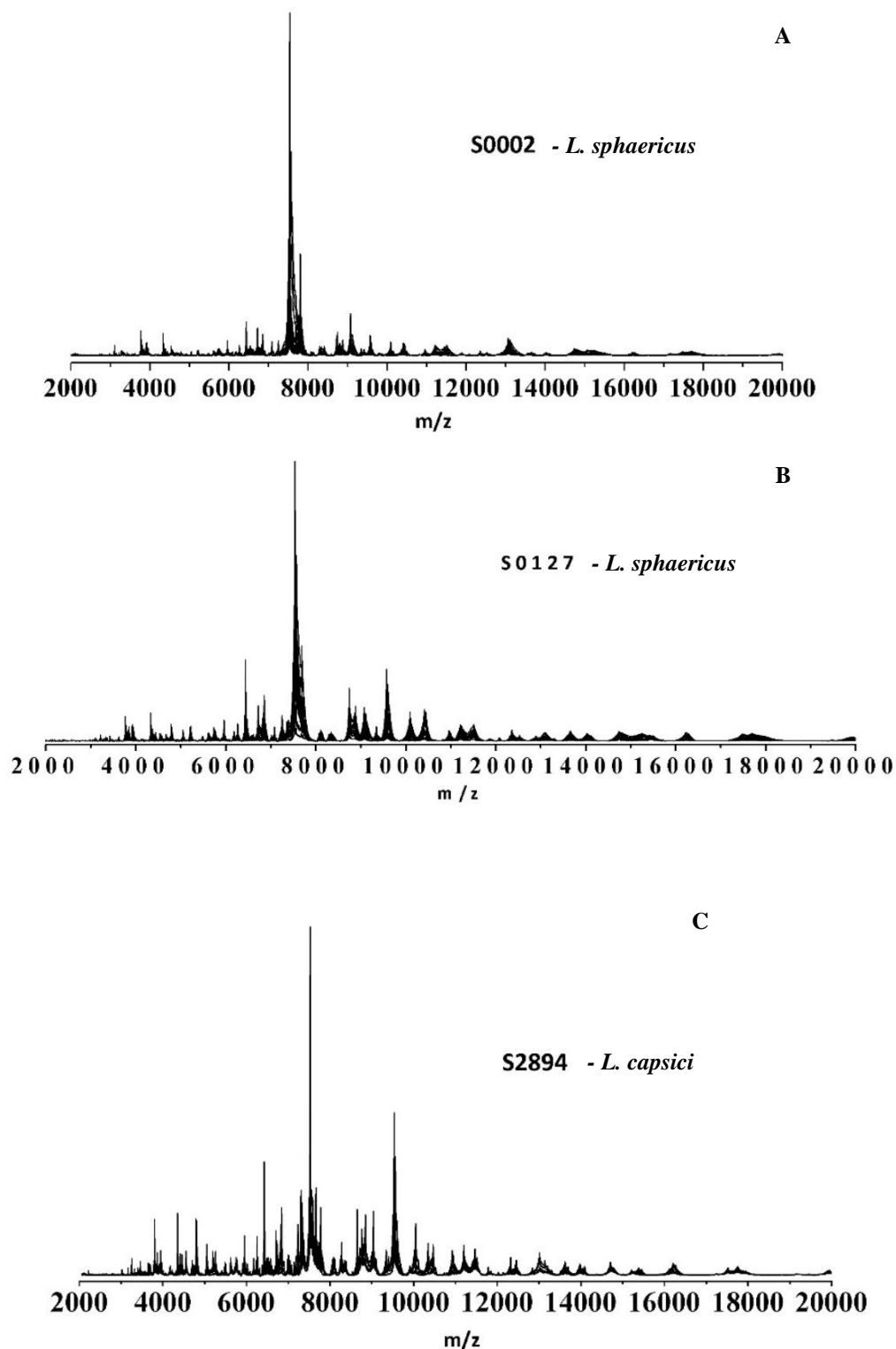


Figura 7. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do gênero *Lysinibacillus* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI-Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** e **B** - *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127); **C** - *Lysinibacillus capsici* (S2894).

Em contraste com os resultados anteriores, as espécies de *Brevibacillus laterosporus* não obtiveram quaisquer índices de compatibilidade ou identificação, sendo seus respectivos espectros notavelmente distintos entre si (Figura 7). Essa discrepância nos perfis proteicos das duas cepas levantou a hipótese de que a baixa temperatura de acondicionamento da amostra (S1431) logo após a extração, poderia ter ocasionado a precipitação de proteínas no extrato. Proteínas essas que seriam determinantes na formação de seus espectros e na identificação da cepa. No entanto, para fundamentar essa hipótese foram realizados dois ensaios adicionais de acondicionamento com a amostra S1431, ao qual o primeiro ensaio consistiu em realizar o processo de extração e o acondicionamento da amostra em gelo, e o segundo ensaio em temperatura ambiente. Entretanto, os resultados adquiridos demonstraram que a qualidade do material proteico independente da temperatura utilizada no processo de extração e no acondicionamento da amostra, uma vez que os perfis adquiridos da S1431, nesses dois processos, foram similares. Desse modo, não foi constatado qualquer precipitação de proteínas no extrato proteico devido a temperaturas mais baixas de acondicionamento.

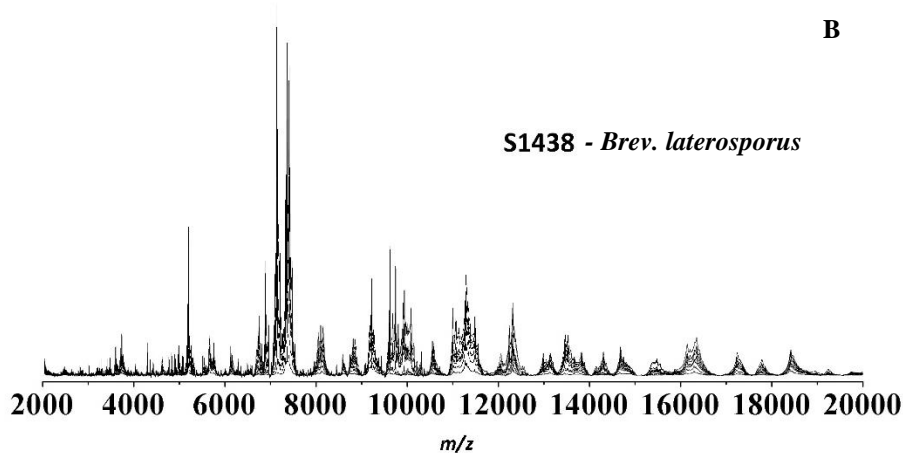
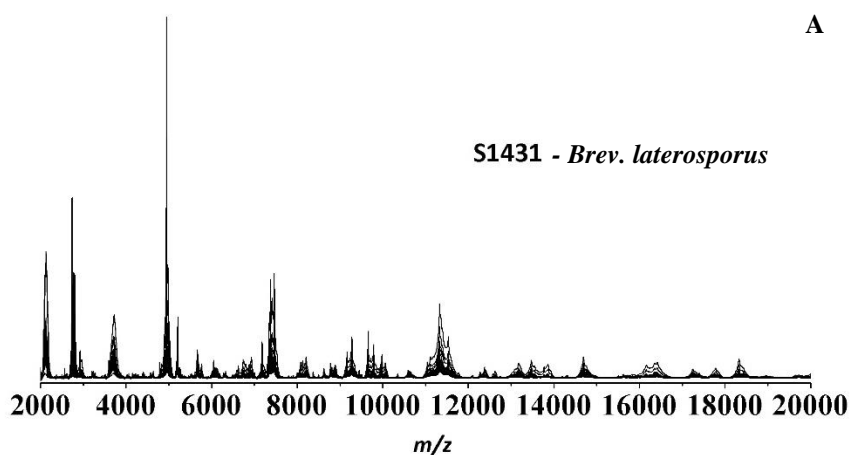


Figura 8. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do gênero *Brevibacillus* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** e **B** – *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438).

Com relação aos espectros de referência (MSP) das estirpes S2538 e S1338, *P. aryabhatai* e *P. megaterium*, verificou-se que entre as duas espécies houve o compartilhamento de sinais iônicos similares, em que o íon de 6.200 Da foi típico para as duas cepas. Todavia, é perceptível que há uma maior intensidade do sinal iônico na cepa S1338 e, uma maior formação de picos de íons da faixa 2.000 a 6.000 Da (Figura 8).

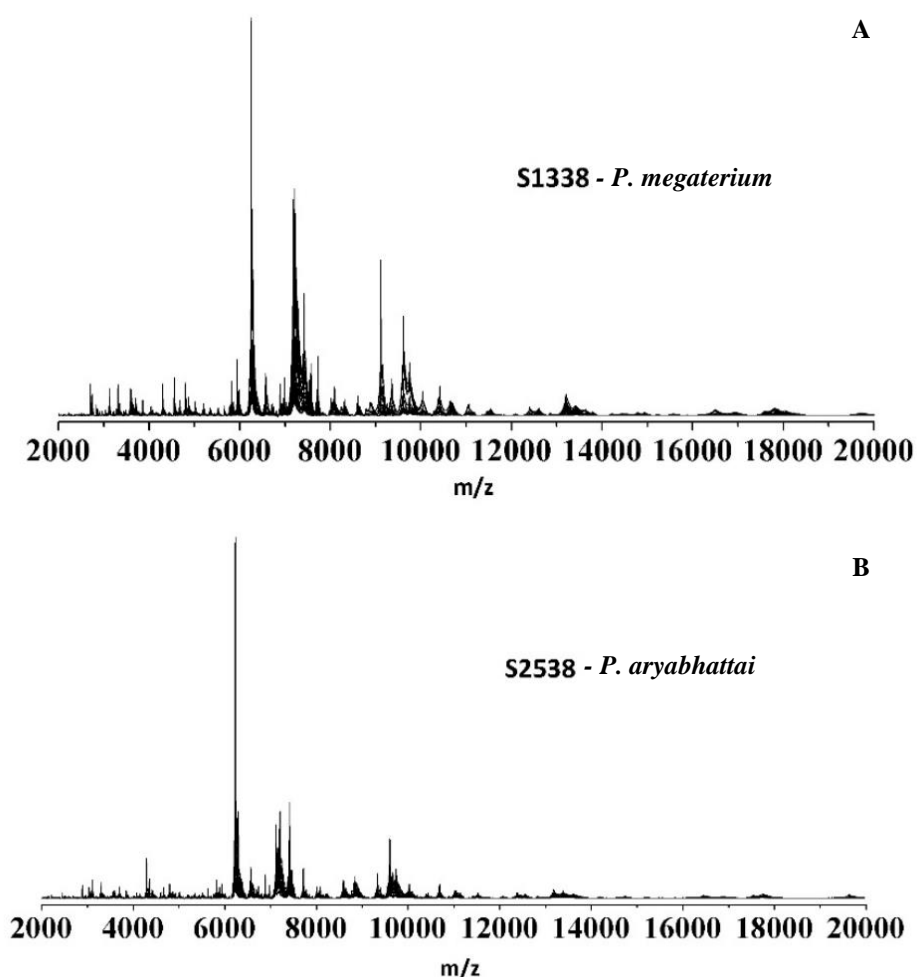


Figura 9. Perfil espectrométrico dos espectros de referência (MSP) das estirpes do gênero *Priestia* na faixa de massa de 2 kDa a 20 kDa, analisados e processados nos programas MALDI–Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics) e OriginPro 8.5. **A** – *Priestia megaterium* (S1338); **B** – *Priestia aryabhatai* (S2538).

Entende-se que o uso da técnica MALDI-TOF/MS em espécies bacterianas de cunho agrícola é escasso, o que levou a necessidade de se criar um banco de dados personalizado. A integração de espectros de referência personalizados em um sistema comercial é apenas o primeiro passo para uma plataforma verdadeiramente aberta. Wieser *et al.* (2011) afirmam que a criação de uma plataforma de código aberto passível de alteração e edição poderia ampliar a capacidade das ferramentas de identificação por meio dessa abordagem, uma vez que os usuários podem trocar espectros de isolados e, conseqüentemente, aumentar suas bases de dados de referência. Contudo, esses mesmos autores ressaltam que a qualidade de entrada desses dados deve ser controlada e precisa, para garantir que nenhum dado seja distribuído de forma errada.

No mais, um repositório público abrangente de espectros de referência MALDI – TOF/MS facilitaria muito a troca de espectros de referência e informações importantes sobre espécies microbiológicas entre os grupos de pesquisa (DRISSNER; FREIMOSER, 2017). E um banco de dados mais complexo, com a inserção de um maior número de espectros de mesma espécie microbiana pode aumentar a probabilidade de uma identificação segura em mais de 90%, bem como permitiria uma maior confiabilidade na identificação realizada (LASCH *et al.*, 2015). Sendo assim faz-se necessário aumentar o número amostral de espécies registradas, uma vez que permitiria uma amplitude maior de identificação.

5.6. CONCLUSÕES

A identificação das estirpes por espectrometria de massa MALDI-TOF mostrou-se restrita, devido a limitação da base de dados do MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics) quanto ao número e diversidade de registros de espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*. No confronto com o banco de dados da plataforma comercial MALDI-Biotyper® apenas uma cepa foi identificada 100% a nível de gênero e espécie, *B. mycooides* (S2786).

Outro passo limitante da identificação é a capacidade dos mecanismos do software de reconhecer os íons do espectro (elementos de distinção) que seriam relevantes na diferenciação dessas estirpes, ou seja, a capacidade do software de aproveitar ao máximo a informação ali dispostas, visto que apenas 9 estirpes foram identificadas corretamente com a MSP de origem (espectro do isolado inserido no banco de dados suplementar).

Ademais, a composição real dos extratos proteicos dos cultivos estabelece o limite superior da capacidade discriminatória da abordagem de identificação. É assim que qualquer fator que influa no padrão de expressão proteica dos cultivos pode comprometer a identificação de um determinado isolado, identificação que se fundamenta na repetitividade dos elementos de identidade nos registros usados para se proceder à identificação.

5.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTINI, B. C.; SILVA, L. P.; BLOCH, C.; BONFIM, T.; DA SILVA, G. A. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5645-5654, 2014.

BEZERRA, F.P.C.A. **Biblioteca de perfis moleculares de Bactérias aeróbias formadoras de endósporos obtidos por espectrometria de massa MALDI-TOF, com sistema de Qualidade**. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana – Universidade de Brasília (UnB), 2015.

BRANQUINHO, R.; SOUSA, C.; LOPES, J.; PINTADO, M. E.; PEIXE, L. V.; OSÓRIO, H. Differentiation of *Bacillus pumilus* and *Bacillus safensis* using MALDI-TOF-MS. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110127, 2014.

CELANDRONI, F.; VECCHIONE, A.; CARA, A.; MAZZANTINI, D., LUPETTI, A.; GHELARDI, E. Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217021, 2019.

CLARK, A. E.; KALETA, E. J.; ARORA, A.; WOLK, D. M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

DE VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; WHITMAN, W.B. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 3: **The Firmicutes**. Springer Science, Business Media, 2009.

DRISSNER, D.; FREIMOSER, F. M. MALDI-TOF mass spectroscopy of yeasts and filamentous fungi for research and diagnostics in the agricultural value chain. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2017.

EMONET, S.; SHAH, H. N.; CHERKAOUI, A.; SCHRENZEL, J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 11, p. 1604-1613, 2010.

FAN, B.; BLOM, J.; KLENK, H. P.; BORRISS, R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 22, 2017.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 4, n. 5, p. 732-742, 2009.

FRITZE, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1245-1248, 2004.

GALPERIN, M. Y. Genome diversity of spore-forming *Firmicutes*. **Microbiology Spectrum**, v. 1, n. 2, p. TBS-0015-2012, 2013.

GOI, S. R.; SOUZA, F. A. de. Diversidade de microrganismos do solo. **Floresta e Ambiente**, v. 13, n. 2, p. 46-65, 2012.

GORDON, R. E.; HAYNES, W. C.; PANG, C. H. N. **The genus *Bacillus***. Agricultural research service, US Department of Agriculture, 1973. 157 p.

KEYS, C. J.; DARE, D. J.; SUTTON, H.; WELLS, G.; LUNT, M.; MCKENNA, T.; SHAH, H. N. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterization of bacteria implicated in human infectious diseases. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 221-242, 2004.

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

LASCH, P.; WAHAB, T.; WEIL, S.; PÁLYI, B.; TOMASO, H.; ZANGE, S.; JACOB, D. Identification of highly pathogenic microorganisms by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: results of an interlaboratory ring trial. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 8, p. 2632-2640, 2015.

LASCH, P.; BEYER, W.; NATTERMANN, H.; STÄMMLER, M.; SIEGBRECHT, E.; GRUNOW, R.; NAUMANN, D. Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 22, p. 7229-7242, 2009.

LOGAN, N. A.; BERGE, O.; BISHOP, A. H.; BUSSE, H.-J.; DE VOS, P.; FRITZE, D.; HEYNDRIKX, M.; KA'MPFER, P.; RABINOVITCH, L.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; SELDIN, L.; VENTOSA, A. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2114-2121, 2009.

LOGAN, N. A.; HALKET, G. Developments in the Taxonomy of Aerobic, Endospore-forming Bacteria. In: LOGAN, N. A.; DE VOS, PAUL. **Endospore-forming Soil Bacteria**. Soil Biology, Springer, Berlin, Heidelberg, vol. 27, p. 1-29, 2011.

MANZULLI, V.; RONDINONE, V.; BUCHICCHIO, A.; SERRECCHIA, L.; CIPOLLETTA, D.; FASANELLA, A.; GALANTE, D. Discrimination of *Bacillus cereus* group members by MALDI-TOF mass spectrometry. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1202, 2021.

MELLMANN, A.; BIMET, F.; BIZET, C.; BOROVSKAYA, A. D.; DRAKE, R. R.; EIGNER, U.; HARMSSEN, D. High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted laser desorption

ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3732-3734, 2009.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatalis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

PAVLOVIC, M.; MEWES, A.; MAGGIPINTO, M.; SCHMIDT, W.; MESSELHÄÜBER, U.; BALSILIEMKE, J.; HUBER, I. MALDI-TOF MS based identification of food-borne yeast isolates. **Journal of microbiological methods**, v. 106, p. 123-128, 2014.

RAHI, P.; PRAKASH, O.; SHOUCHE, Y. S. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1359, 2016.

RAMÍREZ, L. C.; SÁNCHEZ, L. C.; ARÉVALO, Z. Y.; BURBANO, V. E. *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. **Nova**, v. 12, n. 22, p. 165-178, 2014

RAO, M. P. N.; DONG, Z. Y., LIU, G. H.; LI, L.; XIAO, M.; LI, W. J. Reclassification of *Bacillus aryabhatai* Shivaji *et al.* 2009 as a later heterotypic synonym of *Bacillus megaterium* de Bary 1884 (Approved Lists 1980). **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 22, p. fnz258, 2019.

SHU, L.J.; YANG, Y. L. *Bacillus* classification based on matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry—effects of culture conditions. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

STAROSTIN, K. V.; DEMIDOV, E. A.; BRYANSKAYA, A. V.; EFIMOV, V. M.; ROZANOV, A. S.; PELTEK, S. E. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2015.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 965-974, 2012.

ZHAO, X.; KUIPERS, O. P. Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2016

CAPÍTULO 6. PROSPECÇÃO DE CEPAS DE *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* COM POTENCIAL ENTOMICIDA, FUNGICIDA E SOLUBILIZADORAS DE FÓSFORO

RESUMO

A aplicação de microrganismos como agentes de biocontrole e biofertilizantes tem sido recomendada e reconhecida como uma alternativa ecologicamente correta para manter a produtividade e segurança das culturas agrícolas. O objetivo desse estudo foi realizar a prospecção de cepas de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* solubilizadoras de fósforo e com ação patogênica a pragas e fitopatógenos de importância agrícola e vetores de doenças. Foram selecionadas 37 cepas pertencentes a Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e avaliadas quanto a sua toxicidade a insetos das ordens Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis includens*), Coleoptera (*Anthonomus grandis*), Diptera (*Aedes aegypti*) e Hemiptera (*Euschistus heros*), além do nematoide *Caenorhabditis elegans*. Também foi avaliado a ação antagonista dessas espécies bacterianas contra os fitopatógenos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Além disso, foram realizados ensaios *in vitro*, a fim de detectar estirpes potencialmente solubilizadoras de fósforo. Os resultados indicaram que houve uma diversidade de espécies patogênicas aos insetos da ordem Lepidoptera, incluindo *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens*, com taxa de mortalidade $\geq 80\%$. A espécie de *B. atropheus* foi patogênica ao nematoide *C. elegans* (85%). Uma estirpe de *B. subtilis* (S2790) ocasionou 100% da mortalidade de *A. grandis*. A estirpe S2538, *P. aryabhatai* ocasionou 77% da mortalidade de *E. hero* (Hemiptera). As espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato* foram consideradas excelentes agentes para exploração de biofertilizantes, bioinseticidas e fungicidas, uma vez que algumas espécies desse grupo, como *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2785, S2791, S2787), *B. subtilis* (S2776, S2790, S2794), *B. pumilus* (S2795) e *B. licheniformis* (S2777) foram patogênicas a insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera, antagonistas contra os fungos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum* e solubilizadoras de fósforo *in vitro*. Conclui-se que os resultados desse estudo prospectam um total de 34 cepas, com potencial entomicida, fungicida e/ou solubilizadora de fósforo, aos quais podem se tornar agentes de biocontrole e biofertilizantes para uma agricultura ecologicamente correta, econômica e sustentável.

Palavras-chaves: Bioensaios Seletivos; Insetos; Fungos; Controle Biológico.

ABSTRACT

The application of microorganisms as biocontrol agents and biofertilizers has been recommended and recognized as an ecologically correct alternative to maintain the productivity and safety of agricultural crops. The objective of this study was to carry out the prospection of strains of *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* and *Brevibacillus spp.* Phosphorus solubilizers and pathogenic to pests and phytopathogens of agricultural importance and disease vectors. Thirty-seven strains belonging to the Invertebrate Bacteria Collection of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology were selected and evaluated for their toxicity to insects of the orders Lepidoptera (*Spodoptera frugiperda*, *Helicoverpa armigera*, *Chrysodeixis includens*), Coleoptera (*Anthonomus grandis*), Diptera (*Aedes aegypti*) and Hemiptera (*Euschistus heros*), in addition to the nematode *Caenorhabditis elegans*. The antagonistic action of these bacterial species against the phytopathogens *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Sclerotinia sclerotiorum*. In addition, in vitro assays were performed in order to detect potentially phosphorus-solubilizing strains. The results indicated that there was a diversity of pathogenic species to insects of the order Lepidoptera, including *B. thuringiensis* and *B. amyloliquefaciens*, with a mortality rate $\geq 80\%$. The species of *B. atrophaeus* was pathogenic to the nematode *C. elegans* (85%). A strain of *B. subtilis* (S2790) caused 100% of the mortality of *A. grandis*. The strain S2538, *P. aryabhatai* caused 77% of the mortality of *E. hero* (Hemiptera). *B. subtilis sensu lato* were considered excellent agents for the exploitation of biofertilizers, bioinsecticides and fungicides, since some species of this group, such as *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2785, S2791, S2787), *B. subtilis* (S2776, S2790, S2794), *B. pumilus* (S2795) and *B. licheniformis* (S2777) were pathogenic to insects of the order Lepidoptera and Coleoptera, antagonists against the fungi *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Sclerotinia sclerotiorum* and in vitro phosphorus solubilizers. It is concluded that the results of this study prospect a total of 34 strains, with entomocidal, fungicidal and/or phosphorus solubilizing potential, which can become biocontrol agents and biofertilizers for an ecologically correct, economic and sustainable agriculture.

Keywords: Selective Bioassays; Insects; fungi; Biological control.

6.1. INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola é constantemente ameaçada por inúmeros fatores bióticos e abióticos, dentre os quais estão as perdas substanciais na produção alimentar, ocasionadas por insetos, fitopatógenos, plantas daninhas, desnutrição vegetal e fatores climáticos (ÂNGELO *et al.*, 2010). Aproximadamente, 20 a 30% dessas perdas na produção de alimentos são ocasionadas por pragas e doenças (PÉREZ-GARCIA *et al.*, 2011), e pela falta de nutrientes minerais nos solos agrícolas, que limitam o crescimento e o rendimento das plantas (LUO *et al.*, 2022).

Assim, o uso de insumos químicos tornou-se a medida protetiva mais utilizada no sistema convencional agrícola, para reduzir as perdas econômicas causadas por esses dois fatores. No entanto, apesar do sucesso na aplicação desses compostos sintéticos no aumento da produtividade agrícola, as aplicações indiscriminadas e excessivas de inseticidas e fertilizantes, tem impactado negativamente os solos, a água, o ar, a saúde humana e a biodiversidade vegetal e microbiana dos ecossistemas (VALICENTE, 2008; CAMPANINI *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2019).

Com isso, a aplicação de microrganismos como agentes de biocontrole e biofertilizantes tem sido reconhecida e recomendada como sendo uma estratégia alternativa para manter a produtividade agrícola segura e sustentável, reduzindo assim a aplicação excessiva de fertilizantes e inseticidas químicos no meio ambiente (SHARMA *et al.*, 2020, PIRTTILÄ *et al.*, 2021).

Devido à alta diversidade ecológica, fenotípica e genotípica, as bactérias formadoras de esporos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* veem sendo amplamente exploradas como agentes de biocontrole e biofertilizantes na agricultura. Essas bactérias possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de metabólitos secundários, substâncias antagônicas estruturalmente diferentes e corpos de inclusões proteicas com atividade entomocida contra pragas e doenças (FIRA *et al.*, 2018).

A produção de cristais parasporais como atividade entomopatogênica por algumas espécies desses gêneros está associada a toxemia letal em larvas de diferentes ordens de insetos e em espécies de nematoides. As toxinas proteicas mais conhecidas associadas aos esporos são as toxinas Cry e Cyt, produzidas principalmente por cepas de *Bacillus thuringiensis* durante a esporulação (ABREO *et al.*, 2018). No entanto, outras espécies são conhecidas por produzirem cristais parasporais ativos contra insetos, como *Lysinibacillus sphaericus* (JONES *et al.*, 2007),

Paenibacillus popilliae (ZHANG *et al.*, 1997), *Brevibacillus laterosporus* (SMIRNOVA *et al.*, 1996), *Paenibacillus lentimorbus* (YOKOYAMA *et al.*, 2004) e uma cepa de *Bacillus pumilus* (GARCIA-RAMON *et al.*, 2016).

Embora a toxemia por si só possa ser letal para insetos e nematoides, entende-se que a virulência de uma cepa entomopatogênica é um mecanismo complexo, não impulsionado por um único fator de virulência, mas por vários que atuam sequencialmente ou sinergicamente (GARCIA-RAMON *et al.*, 2016). A título de exemplo, a toxicidade das espécies pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, como as espécies de *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* são causados por um complexo de compostos lipopeptídicos e antimicrobianos, como bacilomicina, surfactinas, iturinas, fengicina e sideróforos e compostos voláteis (SHODA, 2000; BORRIS, 2011).

Apesar da qualidade entomopatogênica dessas espécies serem o principal alvo de uso na agricultura, essas bactérias também possuem alto potencial biotecnológico por promoverem o crescimento vegetal (CHERIF-SILINI *et al.*, 2016; ORTIZ *et al.*, 2015), por sintetizar nanopartículas metálicas (NAJITHA-BANU *et al.*, 2015) e por degradar pesticidas químicos persistentes (FERREIRA *et al.*, 2016; SAMANTA *et al.*, 2020). Além disso, essas bactérias possuem a capacidade de produzir fitohormônios, solubilizar e mineralizar o fósforo e outros nutrientes, fixar nitrogênio, produzir compostos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas, proporcionar resistência sistêmica induzida e auxiliar a tolerância a estresses abióticos em plantas (GOSWAMI *et al.*, 2016).

Como exemplo, as espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Priestia* são consideradas bactérias solubilizadora de fosfato que aumentam a fertilidade do solo, devido à suas capacidades de converter P insolúvel em P solúvel através da liberação de ácidos orgânicos, quelação e troca iônica (SAEID *et al.*, 2018). Além disso, *P. aryabhatai* foi considerada uma espécie dotada de potencial para sintetizar atributos reguladores do crescimento, devido a tolerar inúmeros fatores de estresse abiótico, como a salinidade (SHAID *et al.*, 2022).

Desse modo, a bioprospecção desses microrganismos é uma estratégia adequada para determinar o potencial agrobiotecnológico, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que a diversidade bacteriana está positivamente correlacionada com a fertilidade do solo e com o controle de pragas.

6.2. OBJETIVO GERAL

Prospecção de cepas de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* solubilizadoras de fósforo e com ação patogênica a pragas e fitopatógenos de importância agrícola e vetores de doenças.

6.3. OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

- Determinar quais estirpes são patogênicas a insetos da ordem Lepidoptera, Coleoptera, Diptera e Hemiptera;
- Determinar quais estirpes são patogênicas a espécie de nematoide *C. elegans*;
- Determinar a atividade antagônica das estirpes contra os fitopatógenos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Detectar quais estirpes são potenciais solubilizadoras de fosfato.

6.4. MATERIAL E METODOS

6.4.1. Seleção de Estirpes

Foram selecionadas 37 estirpes, pertencentes à Coleção de Bactérias de Invertebrados da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – CENARGEN, ao qual foram identificadas previamente por sequenciamento genético e qPCR, conforme descrito nos Capítulos 1 e 2, originando em 14 estirpes pertencem ao grupo *Bacillus cereus sensu lato*, sendo seis isolados de *B. thuringiensis* (S1450, S1576, S2782, S0615, S2566 e S1989), três de *B. cereus sensu stricto* (S0953, S0663, S0167), um *B. mycoides* (S2786), um *B. tropicus* (S0043), *B. luti* (S1624), *B. toyonensis* (S1647), *B. paranthracis* (S2781) e 16 estirpes pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, sendo cinco *B. subtilis sensu stricto* (S2794, S2796, S2896, S2790, S2776), seis *B. amyloliquefaciens* (S2785, S2784, S2787, S2788, S2791, S2536), dois *B. pumilus* (S2783 e S2795), um *B. atrophaeus* (S2792) e um *B. spizizenii* (S2893). As outras estirpes foram definidas como sendo *Priestia megaterium* (*B. megaterium*) (S1338), *Priestia*

aryabhatai (*B. aryabhatai*) (S2538), *Lysinibacillus capsici* (S2894), *Lysinibacillus sphaericus* (S0002 e S0127), *Brevibacillus laterosporus* (S1431 e S1438).

6.4.2. Triagem de genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* por qPCR

Para as cepas identificadas por sequenciamento e qPCR como *Bacillus thuringiensis*, foi realizada uma análise de detecção gênica para avaliar quais genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* estão presentes nessas cepas. Assim, os ensaios foram realizados por PCR em tempo real e os genes selecionados foram *cry1*, *cry2*, *cry4*, *cry6*, *cry9*, *cry10*, *cry11a*, *cry11b*, *vip1*, *vip2*, *vip3*, *cyt1*, *cyt 2* e general *sip*. As sequências dos *primers* e suas respectivas características e genes alvo foram obtidos de acordo com Berçot (2020) ([HTTP://repositorio.unb.br/handle/10482/41399](http://repositorio.unb.br/handle/10482/41399)).

As estirpes selecionadas foram cultivadas em meio EMBRAPA-ágar por 16 h a 30 °C (MONNERAT *et al.*, 2007). Posteriormente, as colônias bacterianas foram coletadas, com auxílio de alça bacteriológica descartável estéril de 10 µL, e transferidas para um tubo de polipropileno, onde a biomassa bacteriana foi ressuspensa em uma solução contendo 200 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA•Na₂) e 4 µL de lisozima (25 mg/ml). Em seguida, as amostras foram inoculadas em agitador orbital por 3 horas, em temperatura ambiente.

Para a extração de DNA adotou-se o seguinte protocolo: após a incubação das amostras, adicionou-se 20 µL de proteinase K (20 mg/ml) e 300 µL de tampão de lise, sendo composto por 20 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 8; 4 mL de EDTA 0,5 M pH 8; 38 mL de NaCl 5 M; 500 µL de Triton X-100 e 2 mL de SDS 10%. Posteriormente, as amostras foram novamente incubadas, porém em banho-maria a 60 °C, por 10 minutos. Após o resfriamento das soluções bacterianas, realizou-se o processo de precipitação do DNA, em que consistiu na adição de 500 µL álcool etílico 100% gelado. O DNA extraído foi centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm, e posteriormente purificado por duas lavagens com 500 µL de álcool etílico 70%, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. O DNA foi diluído com TE 0,1X (1 mM Tris-HCl e 0,1 mM EDTA•Na₂).

O DNA obtido foi quantificado pelo aparelho Quantus™ Fluorometer, usando o kit QuantiFluor® ONE dsDNA System (PROMEGA CORPORATION, 2015), de acordo com o manual do fabricante. Somente foram aceitos DNAs com valor acima de 10 ng/µL. Depois de quantificado, foi verificado o grau de pureza de cada DNA com o fluorômetro Picodrop, por meio das análises das razões A260/280 e A260/230. A primeira é uma avaliação primária de pureza, onde o intervalo desejado para as amostras de DNA está entre 1,8-2,0, com razões

menores que 1,7, indicando contaminação de proteínas e/ou fenol; a segunda é uma avaliação secundária de pureza, com intervalo desejado entre 1,8-2,2, com razões menores que 1,7, indicando contaminação com sal e/ou anéis de guanidina (BUSTIN, *et al.*, 2009).

Foi utilizado o equipamento Step OnePlus™ System da Applied Biosystems (PLUS; MANUAL, 2006), programado para o modo fast de acordo com o manual do kit GoTaq qPCR Master Mix para todos os ensaios de detecção de genes. O volume final de cada sistema de reação foi de 20 µL, distribuídos nos seguintes volumes e reagentes: dH₂O 8,2 µL; *Primer* (F) – 0,3 µL; *Primer* (R)– 0,3 µL; Mix qPCR – 10 µL, CXR- 0,2 µL, DNA – 1 µL. O sistema de ciclagem foi definido em 1 ciclo inicial a 95°C por 20 segundos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e, 61 °C por 30 segundos. Posteriormente, foi programado uma rampa de temperatura, em modo *step and hold*, de 61 °C a 95 °C por 15 segundos. Ao final, para a construção do gradiente de temperatura ou curva de *melting*, uma faixa de temperatura foi programada para 60 °C por 1 minuto, e posteriormente 95 °C por 15 segundos. As amplificações foram realizadas em triplicata. Para os controles negativos, foi utilizado o volume da reação de PCR, sem a presença de DNA bacteriano. Foram considerados como resultados negativos, a ausência da curva de amplificação, não equiparação com as cepas controles, ou amplificações, cujos valores de limiar de ciclo (Ct) eram maiores que 25.

6.4.3. Cultivo e preparo das estirpes para os bioensaios seletivos

As cepas selecionadas para os ensaios de patogenicidade foram provenientes de material armazenado em papel filtro e/ou liofilizado. Assim, esses materiais, devidamente impregnados com esporos/cristal foram inoculados em meio de cultura Embrapa-líquido a 30 °C por 72 h sob agitação contínua a 200 rpm (MONNERAT *et al.*, 2007). Após esse período, foi realizado a microscopia óptica com contraste de fases das culturas, com aumento de 1000 x, a fim de verificar a pureza das amostras, bem como a presença de esporos e cristais no meio. Atendidos esses critérios, as amostras foram destinadas aos bioensaios seletivos.

6.4.4. Procedência dos insetos e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Todos os insetos utilizados nos ensaios foram provenientes da Plataforma de Criação de Plantas e Insetos (PCPI) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em todos os casos, os indivíduos foram criados à base dieta artificial e sob condições controladas de temperatura,

e fotoperíodo, seguindo as metodologias descritas por Monnerat *et al.* (2001), Schmidt *et al.* (2001), Silva *et al.* (2008).

A manutenção da colônia de *C. elegans* foi realizada de acordo com o protocolo de Stiernagle (2006), com modificações. A alimentação dos nematoides foi realizada por meio da bactéria *E. coli*, cepa OP50, multiplicada em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) sob agitador rotativo de 150 rpm a 36 °C por 12h. A cada dois dias foi oferecida aos nematoides 1 mL da suspensão bacteriana, sendo as colônias de *C. elegans* mantidas em incubadora (Marconi, mod. MA 403) na ausência de luz e a 21 °C.

6.4.5. Bioensaios Seletivos

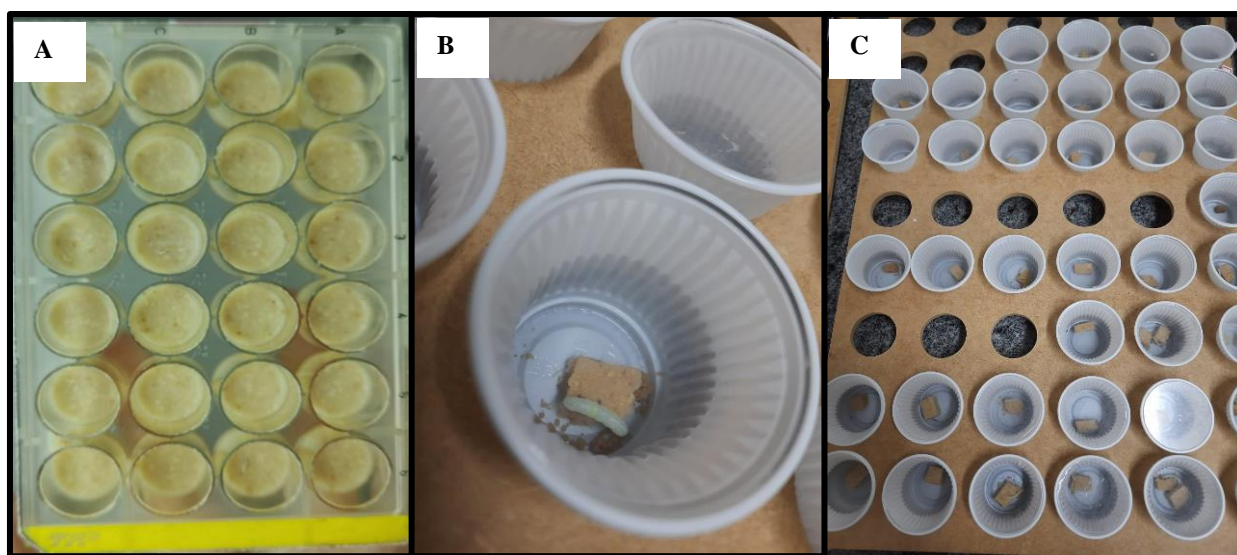
Os bioensaios seletivos consistiram em determinar quais estirpes possuíram potencial para o controle de 100% dos insetos e nematoide.

6.4.5.1. *Spodoptera frugiperda* JE Smith, 1797, *Helicoverpa armigera* Hübner, 1809, *Chrysodeixis includens* Walker, 1858 (Lepidoptera: Noctuidae)

Para os ensaios com *S. frugiperda*, utilizou-se dieta a base de feijão cru triturado (140,4 g); levedo de cerveja (42,9 g); gérmen de trigo (67,4 g); ágar (17,0 g); água destilada (1.000 mL) e ácido ascórbico (4,3 g). Para *H. armigera* e *C. includens* a dieta foi a base de feijão cru triturado (37,5 g); gérmen de trigo (30 g); farelo de soja (15,0 g); leite integral em pó (15,0 g); levedo de cerveja (18,75 g); ágar (15,0g); água destilada (750 mL); ácido ascórbico (1,8 g) e solução vitamínica (4,5 mL). Com exceção do ácido ascórbico e da solução vitamínica, todos os ingredientes de cada uma das dietas foram colocados em um béquer, homogeneizados com auxílio de uma espátula, fechados com papel alumínio e autoclavados por 20 min a 120 °C. Após este processo, a dieta foi levada para câmara de fluxo laminar e distribuída em placas de cultivo de células de 24 poços. As placas contendo a dieta foram esterilizadas por 20 min em luz UV (Figura 1).

Em seguida, foram distribuídas em cada poço 35 µL da cultura bacteriana. Após a absorção da solução bacteriana pela dieta, colocou-se uma lagarta de 2º instar de *S. frugiperda*, *H. armigera* ou *C. includens* em cada poço. As placas foram fechadas com tampas de acrílico, presas com ligas elásticas e posteriormente acondicionadas na sala de bioensaios sob condições controladas de temperatura (25±3 °C) e fotoperíodo (12h fotofase).

A primeira avaliação foi realizada após 48h, em que foram feitas as contagens dos indivíduos sobreviventes. A mortalidade das lagartas foi verificada pela ausência de locomoção após um leve toque com pincel e pela coloração escurecida do tegumento dos insetos, um sintoma clássico de bacteriose. Na primeira avaliação, os indivíduos vivos foram transferidos para copos de 50 mL contendo dieta livre de bactéria e ao 7º dia do ensaio, foi realizada uma nova e última avaliação, sendo contado novamente as larvas sobreviventes. O percentual de mortalidade foi calculado sobre cada tratamento. Para o controle de qualidade, os ensaios que apresentaram testemunha com mortalidade superior a 15 %, eram descartados e as amostras submetidas a novos testes (MONNERAT *et al.*, 2007).

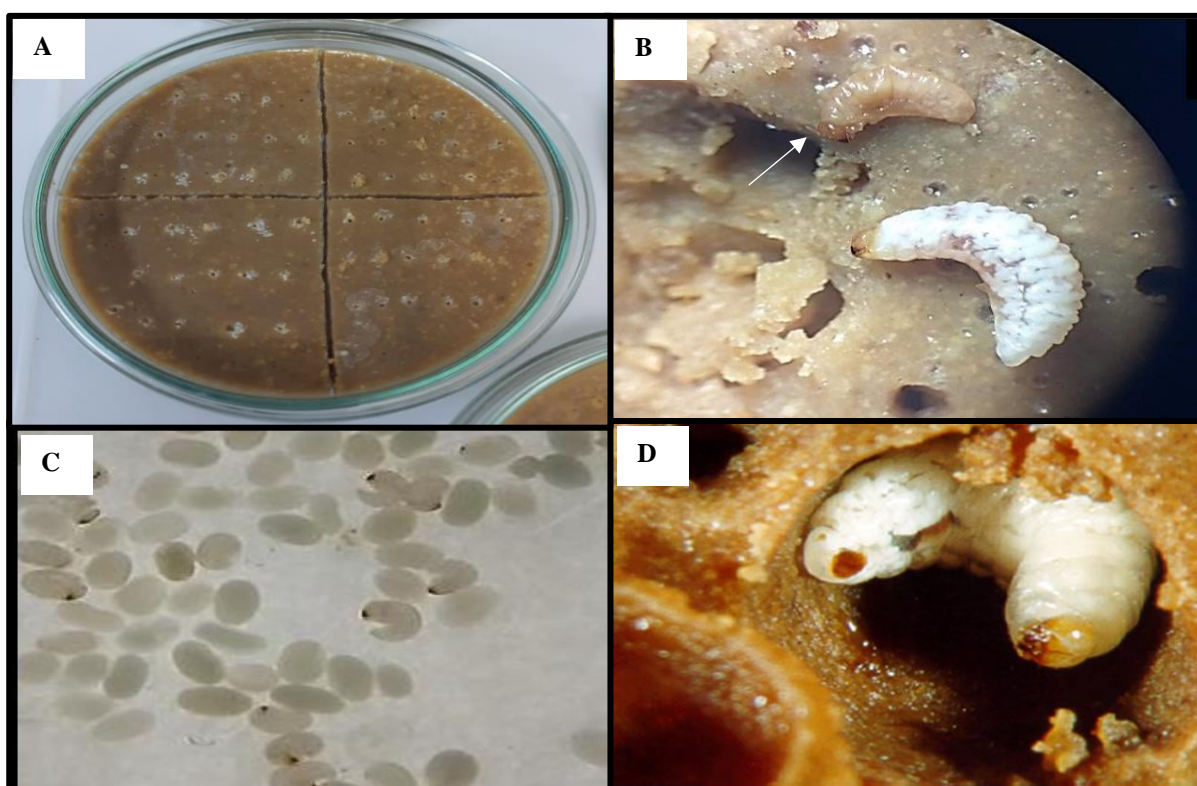


Figuras 1. Montagem do bioensaios para insetos da ordem Lepidoptera. **A** - Placa de cultivo de células de 24 poços utilizada para bioensaios de *S. frugiperda*, *H. armigera* e *C. includens*. **B e C** - Lagarta em copos descartáveis utilizados na troca contendo dieta livre de bactérias. Fonte: Autora.

6.4.5.2. *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Coleoptera: Curculionidae)

O bioensaio seletivo com *A. grandis* foi realizado incorporando 10 mL de cultura bacteriana em 35 mL de dieta artificial autoclava, composta por: ágar (0,8 g), levedo de cerveja (1,2 g), germen de trigo (1,2 g), pharmamédia (0,8 g), proteína de soja (2,0 g) e sacarose (1,2 g) e materiais não autoclavados como: sais minerais (0,2 g); ácido ascórbico (0,4 g); ácido sórbico (0,05 g); nipagin (0,04 g) e solução vitamínica (200 µL), e vertidos em placas de Petri estéreis (90 x 15 mm). Após a solidificação da dieta, dividiu-se a placa em 4 quadrantes, e em

cada um desses quadrantes foram feitos 15 furos de aproximadamente 2 mm de diâmetro, com auxílio de uma haste de cobre previamente esterilizada. Uma placa sem a solução bacteriana, mas com água destilada foi deixada como testemunha (PRAÇA *et al.*, 2004). Em cada um dos furos, foi colocado uma larva recém-nascida (neonata) com auxílio de lupa e pincel de cerdas macias. A primeira e única avaliação foi realizada no sétimo dia, em que foram contados os números de larvas vivas e mortas, e por fim calculado a porcentagem de mortalidade. Como controle de qualidade, se o controle tivesse uma taxa de mortalidade superior a 20%, o bioensaio seria repetido. O experimento foi quadruplicado. (MONNERAT *et al.* 2001) (Figura 2).

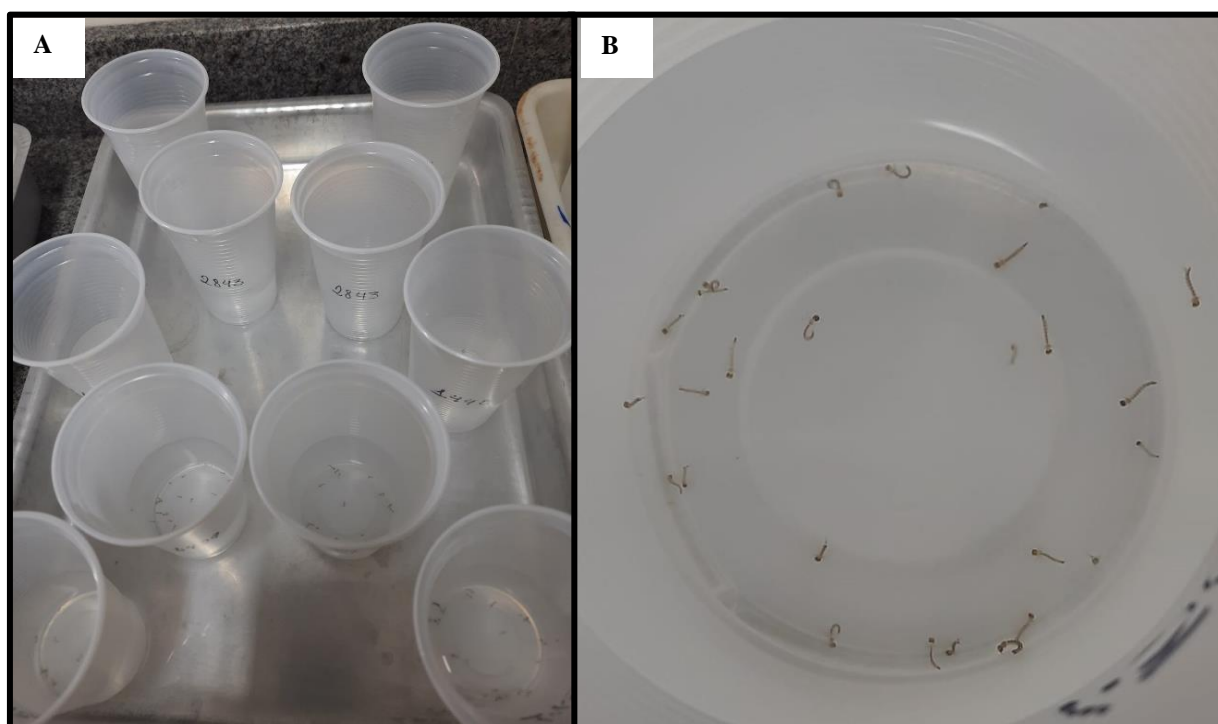


Figuras 2. Bioensaio com *Anthonomus grandis*. **A** - Placa de bioensaio contendo dieta com a mistura esporo cristal subdividida em quatro quadrantes; **B** - Larva morta com sintomas de bacteriose e larvas vivas. A seta indica uma larva morta.; **C** -Ovos e larvas neonatas de *A. grandis* utilizadas no bioensaios; **D** – Larvas neonatas de *A. grandis*.

6.4.5.3. *Aedes aegypti* Linnaeus, 1772 (Diptera: Culicidae)

Os bioensaios foram realizados com larvas de 2º ínstar de *Ae. aegypti*. O procedimento foi realizado em duplicata, em que foi adicionado 1 mL da cultura bacteriana, crescida por 72 h, em cada um dos copos descartáveis de 200 mL, contendo 100 mL de água filtrada e

desclorificada com 25 larvas. As avaliações foram realizadas após 24 h e somente no caso de *L. sphaericus*, com 48 h. Nesta ocasião, foi adicionado uma “pitada” de levedo de cerveja para garantir que a falta de alimento não estivesse relacionada a mortalidade das larvas. Durante a avaliação foi observada a motilidade larval, sendo os indivíduos não reativos, contabilizados como mortos. Ao final de cada ensaio foi calculado o percentual de mortalidade larval. Como testemunha, foi realizado um controle sem adição de bactéria (MONNERAT *et al.* 2001; SILVA-WERNECK; MONNERAT 2001) (Figura 3).



Figuras 3. Bioensaio de *Aedes aegypti*. **A** – Montagem do bioensaio, contendo o copo plástico descartável e as larvas de *Ae. aegypti*. **B** – Larvas de 2º ínstar de *Ae. aegypti*.

6.4.5.4. *Euschistus heros* Fabricius, 1798 (Hemiptera: Pentatomidae)

O bioensaio seletivo com percevejo *E. heros* foi realizado em placas TPP (marca), esterilizadas e revestidas por papel filtro. Em cada placa, tanto do controle quanto dos tratamentos foi adicionado um pedaço de dieta (1,0 cm x 1,5 cm x 0,5 cm), composta por amendoim moído (35 g), sacarose (5g), vagem de feijão (30 g), semente de soja (10 g), semente de girassol (10 g), gérmen de trigo (10 g), nipagin (1 g), ácido sórbico (0,4 g), conforme descrito por (HAYASHIDA *et al.*, 2018). Essa dieta foi posta sobre em um fundo de copo plástico de

50 mL, com 1 mL do cultivo bacteriano. Também foi adicionado um algodão umedecido com 3,5 mL de água destilada e autoclavada, e 1 mL do cultivo bacteriano na placa TPP. Foi adicionado dez insetos de segundo instar nas placas de TPP montadas, sendo realizado três repetições por tratamento. A cada 48 horas, os discos de algodão umedecidos foram trocados, havendo a reinoculação de 1 mL da bactéria e mais 3,5 mL de água destilada e autoclavada nos tratamentos, e somente 3,5 mL de dH₂O no controle. As placas foram armazenadas em sala apropriada, com fotoperíodo de 14/10 horas e temperatura de 28 ± 2 °C. A avaliação dos testes foi feita diariamente com a contagem do número de ninfas vivas e mortas e a última leitura e o descarte ocorreram após 7 dias do início dos ensaios (STEFANELLO, 2021) (Figura 5).

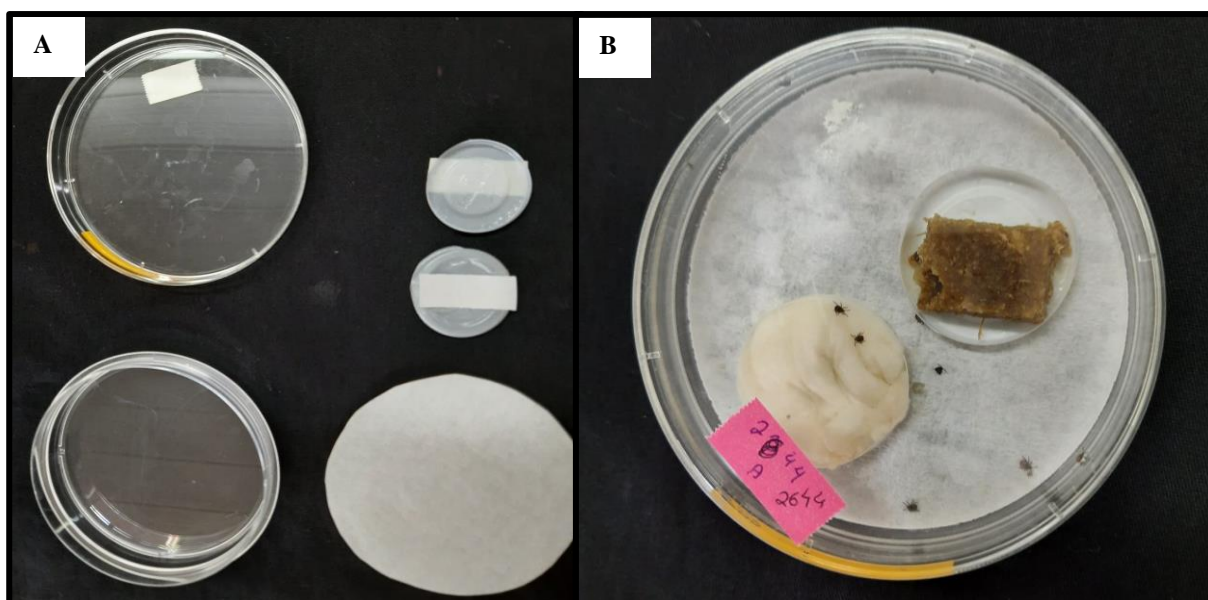


Figura 5. Bioensaio de *Euschistus heros*. **A** – Materiais usados para montagem do bioensaio, conforme descrito em metodologia. **B** – Ensaio montado, com dieta artificial e insetos de 2° instar de *E. heros*.

6.4.5.5. *Caenorhabditis elegans* Brenner, 1974 (Rhabditida: Rhabditidae)

O bioensaio foi realizado em placas de Petri, contendo 7,5 mL da suspensão de *C. elegans* e 2,5 mL da suspensão bacteriana, em triplicata. Um total de 60 nematoides, no estágio L2-L4, foram utilizados. Como controle foi utilizado meio de cultura Embrapa puro, meio Embrapa com eritromicina, Furadan e solução salina a 8,5%. O ensaio foi armazenado em incubadora, com luz apagada a 21 °C por 48 h. Após esse período, avaliou-se o número de nematoides vivos, essa avaliação foi realizada pela coleta de 2 mL do conteúdo de cada placa,

diluídos 30 vezes, e com auxílio de uma câmera Peters e microscópio óptico, foram realizadas as contagens dos indivíduos vivos na suspensão, sendo realizadas três contagens para cada placa, e posteriormente considerada a média dessas contagens (MONTALVÃO *et al.* 2018) (Figura 4).



Figura 4. Cultura de *Caenorhabditis elegans* observada em microscópio óptico sob amplificação de 4000 X.

6.4.6. Análise e interpretação dos resultados de bioensaios seletivos de mortalidade

Por ser um estudo qualitativo, em que é verificado se a bactéria mata ou não o inseto e nematoide, a correção da mortalidade observada em larvas de *S. frugiperda*, *H. armigera*, *C. includens*, *A. grandis*, *A. aegypti*, *E. heros* e na espécie de nematoide *C. elegans* por isolados de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* foi realizada através da equação abaixo proposta por Henderson-Tilton (1955):

$$\text{Corrigido\%} = \left(1 - \frac{n \text{ em Co antes do T} * n \text{ em T após do T}}{n \text{ em Co após T} * n \text{ em Co após T}} \right) * 100$$

Onde: n = população de insetos; T = tratamento, Co = controle.

6.4.7. Antagonismo de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Brevibacillus spp.* e *Priestia spp.* em *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum*

A avaliação do antagonismo das espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* a *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *S. sclerotiorum* foi realizada através do confronto direto, com a adoção do método de pareamento de culturas em placas de Petri, conforme Dennis e Webster (1971) e Montalvão *et al.* (2021), com adaptações. As culturas fúngicas foram cedidas pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Assim, os isolados de fungo foram multiplicados inicialmente em placas contendo o meio de cultura BDA, acondicionadas em câmara de crescimento (Fanen, mod. 347), à $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C e fotofase de 12 horas, durante nove para *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e três dias para *S. sclerotiorum*.

Discos de ágar (0,5 cm de diâmetro) contendo estrutura fúngica retirados da cultura pura do patógeno foram depositados na região central das placas, contendo o meio de cultura BDA + meio Embrapa, proporção 1:1 (50% de cada meio de cultura). O antagonista, ou seja, a cultura bacteriana foi aplicada em quatro pontos da placa em alíquotas de 10 μ L cada, de modo que ficassem equidistantes. Foram feitas quatro repetições para cada tratamento, incluindo a testemunha. Como controle foram preparadas placas de BDA + meio Embrapa, contendo o patógeno, sem a presença dos antagonistas (Figura 6).

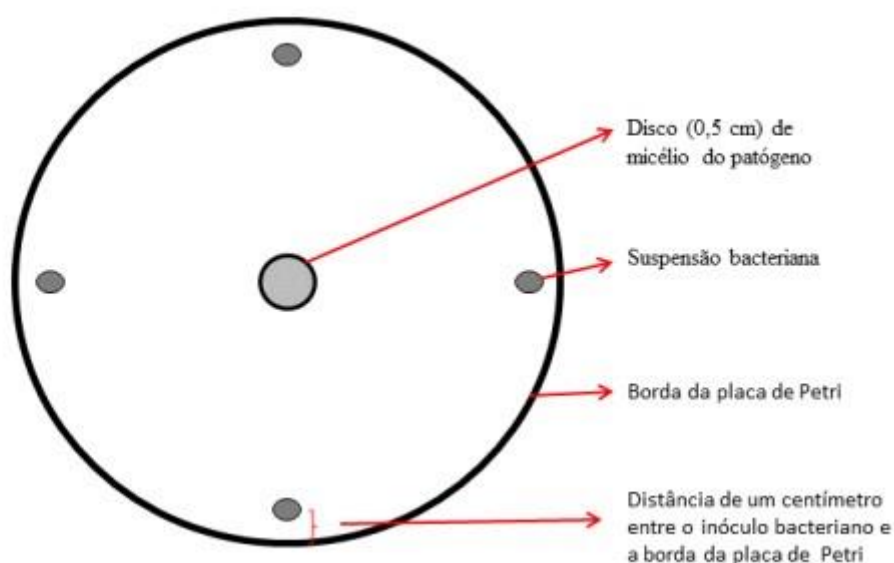


Figura 6. Teste pareado. As setas indicam a disposição de cada um dos componentes do ensaio. O disco contendo o patógeno foi depositado no centro da placa e a suspensão bacteriana em quatro pontos laterais e equidistantes. Fonte: Montalvão, 2016.

Após a montagem do ensaio, as placas foram acondicionadas em câmara de crescimento (Fanen, mod. 347), à $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$ e fotofase de 12 horas. As avaliações foram realizadas após nove dias cultivo (*Fusarium sp.*) e três dias de cultivo (*Sclerotinia sp.*) utilizando-se da escala de notas proposto por Montalvão (2016), em que a classificação foi determinada de B0 a B5 (0-100%) que demonstra o crescimento fúngico com a interferência do antagonista (Figura 7).

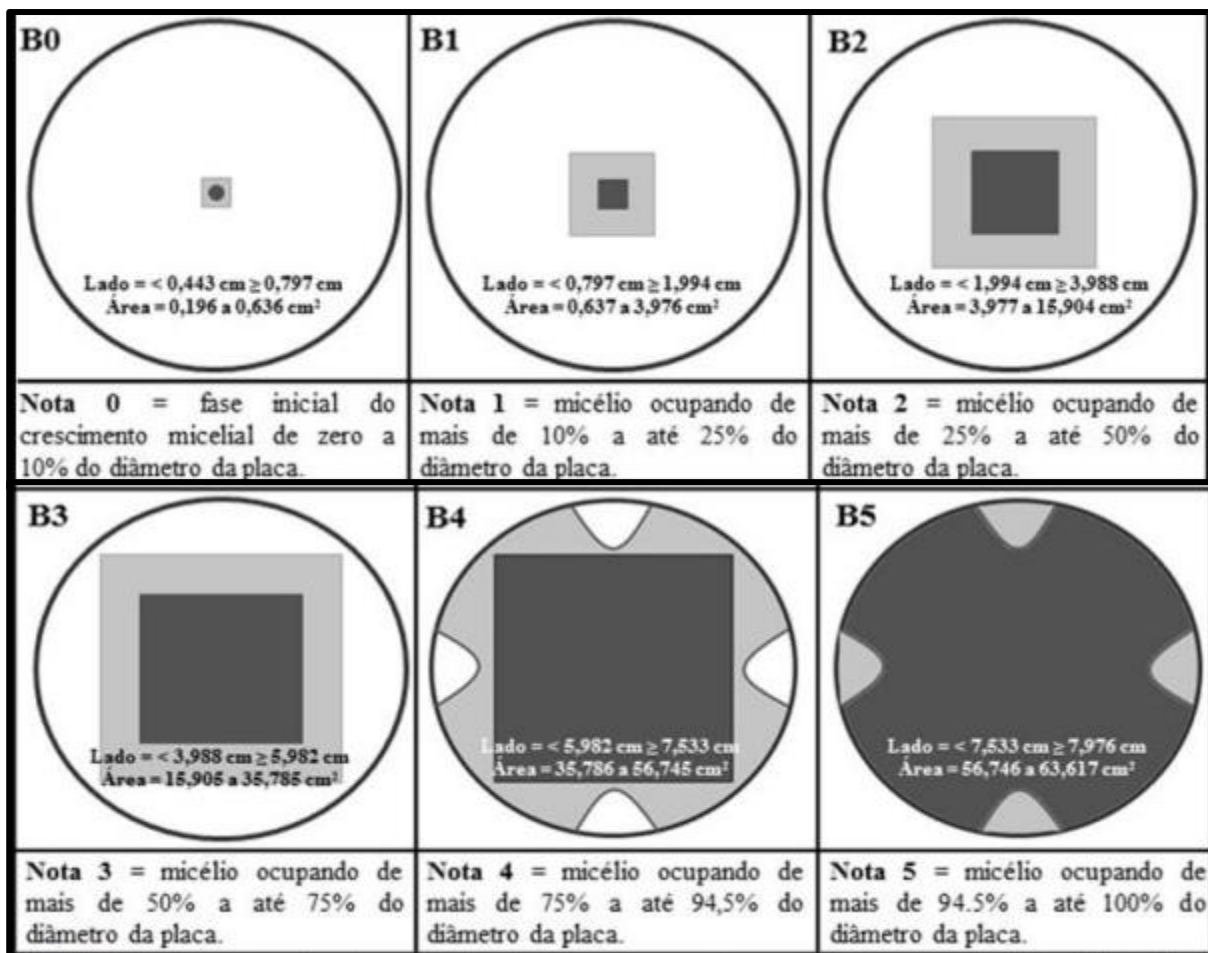


Figura 7. Crescimento das colônias fúngicas em ensaio pareado. Figuras de B0 a B5 mostram o crescimento com interferência do antagonista. Fonte: Montalvão, 2016.

6.4.8. Solubilização de fósforo

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada utilizando-se a metodologia descrita por Sylvester-Bradley *et al.* (1982). Foi utilizado o meio GY autoclavado que ao atingir uma temperatura próxima a 50°C, foi adicionado 50 mL de K₂HPO₄ (10%) e 100 mL de CaCl₂ (10%) também autoclavados para a formação de precipitado insolúvel de CaHPO₄ e em seguida o meio de cultura foi distribuído em placas de Petri. Vinte microlitros do cultivo final de cada isolado foram utilizados para a inoculação em um ponto do meio de cultura. As placas foram mantidas no escuro em estufa de crescimento por 7 dias a 30°C. A avaliação consistiu no aspecto visual, em que foi considerado estirpes solubilizadores de fosfato, aquelas que formaram um halo transparente no meio de cultura originalmente opaco. O ensaio foi realizado em triplicata.

6.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1. Bioensaios seletivos insetos e nematoide

Através dos bioensaios seletivos foi possível verificar o nível de patogenicidade das 37 estirpes em estudo sobre as espécies de insetos e nematoide. É visível que as espécies de insetos da ordem Lepidoptera foram mais suscetíveis as atividades inseticidas das estirpes bacterianas, principalmente a espécie *Helicoverpa armigera*, cuja proporção de isolados ativos e patogênicos foi de vinte e seis cepas, sendo o índice médio de mortalidade $\geq 80\%$.

Essa alta taxa de mortalidade ($\geq 80\%$) para *H. armigera* não foi somente exclusiva aos isolados de *B. thuringiensis*, cuja produção de inclusões proteicas é efetivamente tóxica a uma grande variedade de insetos da ordem Lepidoptera, mas também de isolados pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis sensu lato*, *Bacillus cereus sensu lato* e a espécie *Brevibacillus laterosporus* (Tabela 1). Entende-se que as bactérias entomopatogênicas são capazes de desenvolver uma ampla variedade de mecanismos e estratégias de toxicidade para invadir o corpo do inseto (JURAT-FUENTES; JACKSON, 2012). Entre esses mecanismos estão as toxinas inseticidas, ou proteínas cristalinas típicas de *B. thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* (RUIU, 2015), corpos parasporais, proteínas e antibióticos produzidos por *Brevibacillus laterosporus* (ZUBASHEVA *et al.*, 2010), fatores de virulência de insetos, localizados nas camadas mais externas de esporos, presentes em espécies do grupo *B. cereus s.l* (RUIU *et al.*, 2015), e propriedades antimicrobianas, por lipopeptídeos presentes em espécies do grupo *B. subtilis s.l* (LUO *et al.*, 2015).

Além disso, outros fatores também podem influenciar a atividade inseticida da cepa sobre o inseto, seja pela existência de diferentes sítios de ligação ou diferentes receptores no intestino médio do lepidóptero, no caso de isolados de *Bt*, seja pelo metabolismo bacteriano e/ou por alterações nas funções fisiológicas básicas do inseto, devido ao habitat onde se encontram, a fonte de alimento e seu estágio de desenvolvimento, que podem interferir no fortalecimento das respostas imunes na proteção contra entomopatógenos (SHAO *et al.* 2017).

Independentemente dos fatores que influenciaram a alta mortalidade de *H. armigera*, verificou-se uma ampla diversidade de espécies patogênicas a esse inseto, além do tradicional *B. thuringiensis*. Esse fato é de extrema importância, uma vez que, caso haja resistência do lepidóptero às formulações existentes, essas espécies podem se tornar novos agentes de biocontrole.

Tabela 1. Porcentagem de mortalidade nos bioensaios seletivos das cepas *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* contra *H. armigera* (*Ha*), *S. frugiperda* (*Sf*), *C. includes* (*Ci*), *A. grandis* (*Agr*), *Ae. aegypt* (*Agy*), *E. heros* (*Ehe*) e *C. elegans*.

% Mortalidade nos bioensaios seletivos								
Estirpe	Spp.	Lepidoptera			Diptera	Coleoptera	Hemiptera	Nematoda
		<i>Ci</i>	<i>Ha</i>	<i>Sf</i>	<i>Agy</i>	<i>Agr</i>	<i>Ehe</i>	<i>Ce</i>
S0002	<i>Lsp</i>	55	70	35	90	35	45	0
S0043	<i>Btrop</i>	20	95	45	2	45	30	0
S0127	<i>Lsp</i>	50	65	70	60	50	30	30
S0167	<i>Bc</i>	45	80	55	5	50	60	0
S0615	<i>Bt</i>	100	100	95	30	35	75	10
S0663	<i>Bc</i>	70	95	65	5	65	40	10
S0953	<i>Bc</i>	40	80	65	0	70	70	20
S1338	<i>Pmeg</i>	70	45	45	0	25	55	5
S1431	<i>Brlate</i>	40	70	5	0	25	30	0
S1438	<i>Brlate</i>	10	100	5	0	40	50	10
S1450	<i>Bt</i>	100	100	100	35	35	75	0
S1576	<i>Bt</i>	100	100	70	0	55	20	5
S1624	<i>Blu</i>	55	95	55	0	42	25	0
S1647	<i>Btoy</i>	55	75	65	0	50	5	0
S1989	<i>Bt</i>	60	100	60	100	55	30	0
S2536	<i>Bamy</i>	95	100	50	0	70	30	0
S2538	<i>Pary</i>	65	55	35	0	45	77	0
S2566	<i>Bt</i>	100	100	100	0	45	20	0

Continuação...

% Mortalidade nos bioensaios seletivos									
Estirpe	Spp.	Lepidoptera			Diptera	Coleoptera	Hemiptera	Nematoda	
		<i>Ci</i>	<i>Ha</i>	<i>Sf</i>	<i>Agy</i>	<i>Agr</i>	<i>Ehe</i>	<i>Ce</i>	
S2776	<i>Bs</i>	35	80	80	0	50	10	5	
S2777	<i>Bli</i>	25	100	15	0	25	35	10	
S2781	<i>Bpar</i>	40	70	25	0	25	50	30	
S2782	<i>Bt</i>	60	100	50	100	20	25	0	
S2783	<i>Bp</i>	60	80	50	5	20	30	0	
S2784	<i>Bv/Ba</i>	70	85	45	0	20	20	5	
S2785	<i>Bamy</i>	100	95	80	0	25	60	5	
S2786	<i>Bmy</i>	30	40	20	0	60	40	1	
S2787	<i>Ba</i>	100	100	55	0	60	30	5	
S2788	<i>Bamy</i>	70	90	55	66	55	57	1	
S2790	<i>Bs</i>	60	80	40	0	100	40	0	
S2791	<i>Bamy</i>	85	90	50	0	15	57	0	
S2792	<i>Bat</i>	30	95	40	0	15	25	85	
S2794	<i>Bs</i>	50	75	20	0	35	30	5	
S2795	<i>Bp</i>	75	100	65	0	35	63	0	
S2796	<i>Bs</i>	65	55	20	0	20	30	0	
S2893	<i>Bsi</i>	40	55	45	0	30	35	0	
S2894	<i>Lcap</i>	45	95	10	0	25	40	15	
S2896	<i>Bs</i>	30	85	15	0	20	55	0	

Para as outras espécies de insetos da ordem Lepidoptera observou-se que oito estirpes apresentaram mortalidade superior a 80% para *C. includens*: S2791 (85%), S2536 (95%), S0615 (100%), S1450 (100%), S1576 (100%), S2566 (100%), S2785 (100%), S2787 (100%). E cinco com mortalidade \geq 80% para *S. frugiperda*: S2776 (80%), S2785 (80%), S0615 (95%), S1450 (100%), S2566 (100%).

É visível que a maior proporção de cepas ativas as espécies de lepidópteros foram dos isolados de *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens*, cujo índice de mortalidade foi superior a 80%. Compreende-se que o potencial patogênico do *B. thuringiensis* deve-se principalmente à sua capacidade de produzir proteínas cristalinas inseticidas (Cry e Cyt) e, em certos casos devido à produção de toxinas inseticidas vegetativas (Vips) e secretadas (Sips). Diante desse contexto, realizou-se uma triagem de detecção de genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* nas cepas de *B. thuringiensis*, e constatou-se que, os genes prevalentes entre as amostras foram *cry1* e *cry2*, presentes principalmente nas estirpes S1450, S0615, S2566 e S1576. Ainda, ressalta-se que

todos os isolados que abrigaram *cry1*, também continha o gene *cry2*, sendo esses dois genes especificamente tóxicos a insetos da ordem Lepidoptera (LONE *et al.*, 2017). Também foi detectado na estirpe S1576 o gene *cry9* igualmente ativo a essa ordem de insetos (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de genes *cry*, *cyt*, *vip* e *sip* em estirpes de *Bt*.

Amplificação dos genes do tipo <i>cry</i>								
	<i>cry1</i>	<i>cry2</i>	<i>cry4</i>	<i>cry6</i>	<i>cry9</i>	<i>cry10</i>	<i>cry11a</i>	<i>cry11b</i>
Estirpes								
S1450	+	+	-	-	-	-	-	-
S1989	-	-	+	-	-	+	+	-
S1576	+	+	-	-	+	-	-	-
S0615	+	+	-	-	-	-	-	-
S2782	-		+	-	+	-	+	-
S2566	+	+	-	-	-	-	-	-
Amplificação dos genes do tipo <i>cyt</i> , <i>vip</i> e <i>sip</i>								
	<i>cyt1</i>	<i>cyt2</i>	<i>vip1a</i>	<i>vip1c</i>	<i>vip2a</i>	<i>vip2b</i>	<i>vip3ab</i>	<i>sip</i>
Estirpes								
S1450	-	-	-	-	-	-	+	-
S1989	-	-	-	-	-	-	-	-
S1576	-	-	-	-	-	-	+	-
S0615	-	-	-	-	-	-	-	-
S2782	+	+	-	-	-	-	-	-
S2566	-	-	-	+	-	-	+	-

(-) amostras que não apresentaram produto de amplificação para o gene testado; (+) amostras que apresentaram produto de amplificação para o gene testado.

Ademais, destaca-se que a forma do cristal é uma importante indicação de seu conteúdo de proteínas Cry, sendo, portanto, utilizada como indício da atividade inseticida da espécie de *Bt*, e como primeiro critério visual de classificação da espécie, em comparação as outras do mesmo grupo filogenético (LÓPEZ-MEZA; IBARRA, 1996; MAHALAKSHMI *et al.*, 2012). Assim, de acordo com Monnerat *et al.* (1999), Jain *et al.* (2017) e Nair *et al.* (2018) isolados de *Bt* com cristais do tipo bipiramidais e cuboides abrigam um complexo gênico de *cry1A*, *cry1IA*, *cry1B*, *cry1D*, *cry2*, *cry9* e *vip3A*, aos quais são efetivamente ativos contra lepidópteros. De

fato, essa correlação foi constatada nesse estudo, visto que as cepas S1450, S0615, S1576 e S2566 apresentaram cristais com esse tipo de conformação (Capítulo 3).

Também durante a triagem, verificou-se que esses mesmos isolados apresentaram amplificação compatível para o gene *vip3AB*, bem como para o gene *vip1C* na cepa S2566. As proteínas Vip são conhecidas por complementar ou sinergizar as atividades inseticidas das proteínas Cry (CHAKROUN *et al.*, 2016). Esta complementariedade e coexistência podem indicar que, os genes correspondentes tenham coevoluído em cepas que exibem especificidade de insetos semelhantes, expandindo assim seu espectro de atividade inseticida e prevenindo a evolução da resistência de insetos às proteínas Cry (ZHENG *et al.*, 2017). Além disso, as toxinas Vip3, cuja homologia de sequências não está relacionada as proteínas Cry, têm toxicidade para uma ampla variedade de insetos da ordem Lepidoptera (ESCUDERO *et al.*, 2014).

As espécies de *B. amyloliquefaciens* são amplamente utilizadas como agentes de biocontrole devido a produção de antibióticos e lipopeptídeos cíclicos surfactantes (CLP), como surfactina, iturina A, fengicina e bacilomicina D (ONGENA; JACQUES, 2008; PÉREZ-GARCIA *et al.*, 2011; CHOWDHURY *et al.*, 2015). Esses metabolitos possuem atividade antifúngicas e antibacterianas contra patógenos de plantas, mas poucos são os dados disponíveis sobre a sua atividade inseticida da espécie.

De fato, pela exploração do genoma dessas estirpes foi possível detectar genes responsáveis pela codificação de lipopeptídeos. Por exemplo, o *operon srfA* necessário para a biossíntese não ribossomal da surfactina sintase foi detectado nas estirpes de *B. amyloliquefaciens*, com identidade de sequência de DNA de 90% para os isolados. No entanto, nessas estirpes foi detectado apenas um, dos quatro genes codificadores das subunidades da surfactina sintase, *srfAC* (Capítulo 1).

A surfactina é um biossurfactante poderoso, e é possível que a suscetibilidade das larvas de lepidópteros à *B. amyloliquefaciens* esteja associada a interação dos lipopeptídeos presentes nessas espécies, com os lipídios da membrana dos insetos. Esse contato do biossurfactante com a membrana, pode ocasionar a formação de poros no intestino médio da larva, destruindo a membrana por uma interação do tipo detergente (BUTKO, 2003). Essa hipótese foi apoiada e defendida por Khedher *et al.* (2015), em que observações microscópicas mostraram mudanças significativas no intestino médio de larvas de *Tuta absoluta*, quando tratadas com o biossurfactante AG1, extraído de um isolado de *B. amyloliquefaciens*. Ainda, Yun *et al.* (2013)

também verificaram que a surfactina (lipopeptídeo) produzida por *B. amyloliquefaciens* possui propriedades inseticida contra *Myzus persicae*.

Também foi observado que as cepas S2777 e S2795, respectivamente um *B. licheniformis* e *B. pumilus* ocasionaram 100% a mortalidade de larvas de *H. armigera*. Além disso, a cepa S2783, outro *B. pumilus*, reduziu a sobrevivência do inseto em 80%. De acordo com a literatura, *B. pumilus* é uma espécie promotora de crescimento vegetal e solubilizadora de fósforo (BACH *et al.*, 2022). Mas também possui atividades antifúngicas e antibacterianas (BOTTONI; PELUSO, 2000; AUNPAD; NA-BANGCHANG, 2004). Todavia, existem estudos que comprovam a atividade inseticida de cepas de *B. pumilus* contra a lagarta-da-raiz do milho (*Diabrotica virgifera virgifera*) (DISI *et al.*, 2018), a lagarta do cartucho (*Spodoptera exigua*) (HEINS *et al.*, 1999) e a larvas de *Ceratitits capitata* (mosca-das-frutas) (MOLINA *et al.*, 2009). A atividade inseticida dessa espécie pode estar condicionada ao seu processo de esporulação, ou pela presença de cristais de oxalato descarboxilase (MOLINA *et al.*, 2009; GARCIA-RAMON *et al.*, 2017), entretanto, nas estirpes de *B. pumilus* não foram observadas formações de inclusões proteicas, e não foram detectados no genoma da cepa S2795 genes codificadores de metabólitos secundários que elucidassem os índices de mortalidade obtidos.

As atividades inseticidas das espécies de *Bacillus subtilis* (S2776, S2790, S2794, S2796 e S2896) também foram constatadas nesse estudo. Assim, os melhores índices de mortalidade foram obtidos pelas cepas S2794, S2790, S2776 e S2896, cuja letalidade à *H. armigera* foi de 75%, 80%, 80% e 85%, respectivamente. Para as outras espécies de lepidópteros essa taxa foi menor que 65%, com exceção da estirpe S2790 que reduziu a sobrevivência de *S. frugiperda* em 80%. Diferentemente das espécies de *B. amyloliquefaciens*, os isolados de *B. subtilis* (S2794, S2796 e S2896) apresentaram o *operon srfA*, e os quatro genes das subunidades da surfactina sintase, *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* e *srfAD* em seus genomas, fato esse que explicaria os percentuais de mortalidade obtidos por essas cepas, uma vez que esse *cluster* gênico é responsável por produzir e liberar compostos biosurfactantes com atividades antifúngica e antibacteriana, e possivelmente inseticida.

Além disso, a cepa S2790 ocasionou 100% da mortalidade do coleóptero *A. grandis*, sendo esse, talvez, o primeiro relato sobre a toxicidade dessa espécie ao coleóptero, uma vez que na literatura não foram encontrados relatos sobre a atividade inseticida de *B. subtilis* à *A. grandis*. Porém, existem estudos que comprovam ação entomopatogênica da espécie *B. subtilis* à insetos da ordem Lepidoptera e Diptera, como *Spodoptera littoralis* (ABD EL-SALAM *et al.*, 2011), *Drosophila melanogaster* (ASSIE *et al.*, 2002), *Spodoptera litura*

(CHANDRASEKARAN *et al.*, 2012), *Culex quinquefasciatus* (DAS; MUKHERJEE, 2006) e *Aedes aegypti* (REVATHI *et al.*, 2013). Ademais, estudos sugerem que a atividade inseticida e larvicida da espécie *B. subtilis* é proveniente da ampla gama de peptídeos bioativos, incluindo lipopeptídeos, como os compostos de iturina e surfactina, produzidos pela bactéria. Além disso, esses compostos são biosurfactantes anfifílicos ativos na membrana do inseto e antibióticos peptídicos com potente ação entomocida (CHEN *et al.*, 2008; REVATHI *et al.*, 2013).

Resultados significativos na mortalidade de *A. grandis* também foram observados em uma cepa de *B. cereus* (S0953) e em uma estirpe de *B. amyloliquefaciens* (S2536), cujas taxas de mortalidade foram de 70%. A atividade inseticida da espécie de *B. amyloliquefaciens* à coleópteros ainda é desconhecida, suponha-se apenas que a ação entomocida da espécie bacteriana possa ser semelhante a apresentada por *B. subtilis*, em que a produção de lipopeptídeos é responsável pela toxicidade ao inseto. No entanto, para *B. cereus*, de acordo com Perchat *et al.* (2005) algumas cepas da espécie mostraram ter a capacidade de produzir exotoxinas inseticidas, porém de não natureza proteica. Esses mesmos autores verificaram que quatro cepas de *B. cereus*, entre 575 cepas, produziram uma exotoxina ativa contra *A. grandis*, sem relação com β -exotoxina I, porém com taxa de mortalidade $\geq 50\%$. No entanto, a atividade inseticida dos metabólitos produzidos por *B. cereus* e seu modo de ação permanecem desconhecidos e merecem ser mais investigados.

Diferentemente das espécies de inseto da ordem Lepidoptera e Coleoptera, as larvas do díptero *Ae. aegypti* foram suscetíveis a apenas três cepas, em um índice de mortalidade $\geq 90\%$. As estirpes S1989 e S2782 caracterizadas como *B. thuringiensis* ocasionaram 100% da letalidade das larvas de *Ae. aegypti*. Nas observações microscópicas do Capítulo 3 verificou-se que essas cepas apresentaram conformação de cristais esféricos, e por qPCR constatou-se a detecção de genes do tipo *cry4*, *cry10*, *cry11a*, *cyt1* e 2, aos quais são condizentes com a subespécie ser. *israelensis* e proporcionalmente tóxicas a insetos da ordem Diptera.

O *Bti* é uma espécie amplamente utilizada mundialmente como agente de biocontrole de várias espécies de mosquitos e larvas de mosca negra. A toxicidade dessa espécie bacteriana é atribuída principalmente a diferentes modos de ação e interações sinérgicas entre suas quatro principais toxinas, *cry4Aa*, *cry4Ba*, *cry11Aa* e *cyt1Aa* (CRICKMORE *et al.*, 1995; PONCET *et al.*, 1995, WIRTH *et al.*, 2005; LOKE *et al.*, 2010; EL-KERSH *et al.*, 2016). A ingestão desses cristais por larvas de mosquito leva rapidamente à formação de poros, lise celular, septicemia, finalmente a morte da larva (GILL *et al.*, 1992; MAAGD *et al.*, 1999). Além disso, o *Bti*

também é considerado uma alternativa ambientalmente segura, devido aos seus efeitos mínimos em organismos não-alvo (BOISVERT, 2007; TETREAU *et al.* 2012).

Essas cepas de *Bti* também foram igualmente tóxicas a *H. armigera* (100%). Contudo, na literatura, poucos são os estudos referentes a suscetibilidade de *H. armigera* à *B. thuringiensis* ser. *israelensis*. Apenas as proteínas *cry1*, *cry2* e *cry9*, codificadas pelas cepas *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (*Btk*) e *B. thuringiensis* var. *aizawai* (*Bta*) são empregados no controle de lepidópteros (URIBE *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2009). No entanto, Souza *et al.* (2009) constataram que uma cepa de *Bti* exibiu mortalidade acima de 50% a *S. frugiperda* (Lepidoptera). IGNOFFO *et al.* (1981) relataram que o *Bti* foi tóxico a *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea* e *Heliothis virescens*, todos insetos da ordem Lepidoptera.

Ainda, de acordo com Pigott e Ellar (2007); Souza *et al.* (2009) os receptores de membrana da toxina, presentes no intestino médio das lagartas, podem variar entre as espécies de lepidópteros. Desse modo, uma ou mais toxinas de *B. thuringiensis* ser. *israelensis* poderiam ser específicas a algum receptor presente no intestino médio da *H. armigera*, ocasionando assim a sua morte. Além disso, outras duas hipóteses, de acordo com Barboza-Corona *et al.* (2003), poderiam estar envolvidas no processo biológico de mortalidade da *H. armigera*, por *Bti*. A primeira seria a possibilidade de haver sinergismo entre todas as toxinas dessa bactéria sobre a espécie, e a segunda seria a existência de outras moléculas, além das toxinas *cry* e *cyt*, como as quinases, que ocasionariam a letalidade do lepidóptero.

Outra cepa efetivamente tóxica a *Ae. aegypti* foi a S0002, caracterizada como *Lysinibacillus sphaericus*. Apesar de haver duas estirpes de mesma espécie, a cepa S0127, ocasionou apenas 60% da mortalidade das larvas do díptero, enquanto a S0002, ocasionou 90% da letalidade do mosquito. Esse mesmo resultado foi corroborado por Rojas-Pinzón e Dussán (2017), em que um isolado de *Ly. sphaericus* causou 90% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*. O *Lys sphaericus* é uma bactéria com atividade entomocida, atribuída principalmente a toxina binária, ou *Bin*, produzida durante os estágios finais de esporulação da espécie (BERRY, 2012). Os cristais contendo os dois polipeptídios que compõem a toxina binária são solubilizados e ativados no intestino médio da larva, onde ocorre os efeitos citopatológicos (SILVA; PEIXOTO, 2003; LEKAKARN *et al.*, 2015).

Ademais, em *Ly. sphaericus* existe outras proteínas menos tóxicas, aos quais são produzidas nas células vegetativas, mas degradadas por proteases na fase logarítmica tardia, chamadas de toxinas *Mtx 1*, *2* e *3* (THANABALU; PORTER, 1995). A proteína da camada S é

uma matriz paracristalina que cobre toda a superfície e pode estar localizada na célula vegetativa ou dentro do esporo (PEÑA *et al.*, 2006).

Resultados significativos de mortalidade também foram observados com a cepa S2788, *B. amyloliquefaciens*, ao díptero *Ae. aegypti*, cuja sobrevivência das larvas do indivíduo foi reduzida em 66%. Entende-se que a atividade larvicida dessa estirpe está associada à sua capacidade em produzir e secretar surfactina, composto biosurfactante capaz de reduzir a tensão superficial da água ou de qualquer outro líquido (GEETHA *et al.*, 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Torres *et al.* (2022), em que duas cepas de *B. amyloliquefaciens* (CBMDDrag3 e CBMDLO3) diminuíram a sobrevivência de *Musca domestica* L. em 30 e 50%. Enquanto, GEETHA *et al.* (2011) constataram que uma cepa de *B. amyloliquefaciens* apresentou um metabólito mosquitocida (biosurfactante) eficaz contra os estágios larval e pupal de *Anopheles stephensis*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*.

Para os resultados com o nematoide *C. elegans*, observou-se que a estirpe S2792, um *Bacillus atrophaeus*, mostrou forte atividade nematicida contra o nematoide, sendo a taxa de mortalidade de 85%. Entende-se que *C. elegans* é apresentado como organismo modelo, e é a partir desse nematoide que estudos maiores são gerados e aprofundados. Assim, é possível constatar com os resultados obtidos nesse estudo indicam que a espécie de *B. atrophaeus* possui uma certa patogenicidade contra nematoides, e esse fato foi confirmado e constatado por Ayaz *et al.* (2021), em que uma espécie de *B. atrophaeus* (GBSC56) foi efetivamente tóxica ao nematoide *Meloidogyne incognita* (90%), reduzindo gradualmente o movimento dos nematoides até serem mortos em 48h. Segundo os autores a cepa GBSC56 possui a capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis (COs), aos quais possuem atividade nematicida, assim esses compostos são dissulfeto de dimetila (DMDS), isovalerato de metila (MIV) e 2-undecanona (2-UD). Não se sabe ao certo se a cepa S2792 possui a capacidade de produzir esses mesmos compostos voláteis, sendo necessário ensaios de cromatografia para confirmar esse fato.

Ademais, com relação os bioensaios seletivos realizados no percevejo marrom neotropical, *E. heros*, verificou-se que não houve mortalidade acima de 80% entre as 37 estirpes bacterianas. No entanto, resultados satisfatórios de toxicidade e redução da sobrevivência do inseto foram obtidos por seis cepas, sendo S2538 – *P. aryabhatai* (77%), S0615 e S1450 – *B. thuringiensis* (75%), S0953 – *B. cereus* (70%), S2795 – *B. pumilus* (63%) e, S2785 – *B. amyloliquefaciens* (60%). O inseto parasitoide *Trissolcus basalis* (Woll.) é o agente biológico mais utilizado em programas de controle biológico de percevejos da soja (CORREIA-

FERREIRA, 1993). Poucos são os estudos que investigam a atividade entomopatogênica das espécies bacterianas no controle de *E. heros*. No entanto, o estudo desenvolvido por Schünemann *et al.* (2018), demonstraram que *E. heros* foi suscetível a seis isolados de Bt, contendo toxinas do tipo *cry1*, *cry2* e *cry9* combinadas. Esse estudo corrobora com que foi observado nesse trabalho, uma vez que foram detectados nas cepas S0615 e S1450 os genes *cry1* e *2*.

Além disso, não existem estudos que comprovam a toxicidade de *P. aryabhatai* à insetos, sendo esse o primeiro relato da efetividade de controle da espécie a *E. heros*. Existem apenas estudos que comprovam que a espécie bacteriana é excelente bioinoculante, uma vez que a bactéria pode induzir resistência de espécies vegetais à estresses abióticos, como a seca (MAY *et al.*, 2019). Ainda, *P. aryabhatai* é uma espécie industrialmente importante, pois é resistente ao arsênico e a radiação UV, o que permite que essa bactéria seja acessível a tecnologias de remediação de metal convencionais e caras (STRINGFIXER, 2021).

6.5.2. Antagonismo de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* em *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum*

Dentre as 37 estirpes avaliadas, 14 cepas inibiram o crescimento dos fitopatógenos *Fusarium sp.* e *Sclerotinia sp.* (Tabela 3) (Figura 8). No entanto, as maiores taxas de inibição foram pertencentes aos isolados da espécie *B. amyloliquefaciens*, S2536 e S2785, que inibiram 75% do crescimento de *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* e 100% de *Sclerotinia sclerotiorum*. As estirpes S2788 e S2791, *B. amyloliquefaciens*, inibiram 50% do crescimento de *Fusarium oxysporum* e 75% e 50% de *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente.

A estirpe S2787 (*B. amyloliquefaciens*) também apresentou ação antagonista contra os fitopatógenos *F. oxysporum f. sp. vasinfectum* e *S. sclerotiorum*, reduzindo seus crescimentos miceliais em 50%. Em contrapartida, o isolado S2784 (*B. amyloliquefaciens*) não apresentou um bom comportamento antagonista sobre esses dois fungos, uma vez que essa cepa impediu apenas 25% do crescimento *S. sclerotiorum*.

Muitas cepas de *B. amyloliquefaciens* têm sido utilizadas com sucesso no controle de doenças de plantas causadas por fitopatógenos foliares e de solo. Por exemplo, Yuncheng *et al.* (2014) comprovaram a eficiência antagônica de *B. amyloliquefaciens* (NJZJSB3) no controle de *Rhizoctonia solani* (74%), *F. oxysporum f. sp. cucumerinum* (70%), *F. oxysporum f. sp. niveum* (66,4%), *F. oxysporum f. sp. cubense* (63,8%) e *F. oxysporum f. sp. dioscorea* (46%).

Além disso, a aplicação de suspensões de células da cepa NJZJSB3 proporcionou 80% do controle de *S. sclerotiorum* em folhas de canola.

Tabela 3. Atividade antagônica das estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* contra os fitopatógenos de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em porcentagem de inibição de crescimento.

Estirpes	Spp.	% Inibição do crescimento do fitopatógeno	
		Fungos	
		<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
S0002	<i>Lsp</i>	0	0
S0043	<i>Btrop</i>	0	0
S0127	<i>Lsp</i>	50	25
S0167	<i>Bc</i>	0	0
S0615	<i>Bt</i>	0	0
S0663	<i>Bc</i>	0	0
S0953	<i>Bc</i>	0	25
S1338	<i>Pmeg</i>	0	0
S1431	<i>Brlate</i>	0	0
S1438	<i>Brlate</i>	0	0
S1450	<i>Bt</i>	0	0
S1576	<i>Bt</i>	0	0
S1624	<i>Blu</i>	0	25
S1647	<i>Btoy</i>	0	0
S1989	<i>Bt</i>	0	50
S2536	<i>Bamy</i>	75	100
S2538	<i>Pary</i>	0	0
S2566	<i>Bt</i>	0	0
S2776	<i>Bs</i>	0	0
S2777	<i>Bli</i>	0	25
S2781	<i>Bpar</i>	25	0
S2782	<i>Bt</i>	0	0
S2783	<i>Bp</i>	0	0
S2784	<i>Bv/Ba</i>	0	25
S2785	<i>Bamy</i>	75	100
S2786	<i>Bmy</i>	0	0
S2787	<i>Bamy</i>	50	0
S2788	<i>Bamy</i>	50	75
S2790	<i>Bs</i>	0	0

Estirpes	Spp.	Fungos	
		<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
S2791	<i>Bamy</i>	50	50
S2792	<i>Bat</i>	0	0
S2794	<i>Bs</i>	0	50
S2795	<i>Bp</i>	0	0
S2796	<i>Bs</i>	0	0
S2893	<i>Bsi</i>	50	0
S2894	<i>Lcap</i>	0	0
S2896	<i>Bs</i>	0	0

Ademais, entre os outros isolados pertencentes ao grupo *B. subtilis* s.l., apenas as cepas S2794 (*B. subtilis*) apresentou ação antagonista contra os fitopatógenos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *S. sclerotiorum*, cuja inibição do crescimento micelial *in vitro* dos fungos foi de 50%. Entretanto, em um estudo realizado por Chen *et al.* (2014) constataram que uma cepa de *B. subtilis* (EDR4) inibiu o crescimento de hifas de *S. sclerotiorum* em 72%.

A atividade antifúngica das espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis* s.l. é bastante conhecida e utilizada. Essas espécies são potenciais agentes de biocontrole de fitopatógenos de plantas, devido a secreção de metabólitos secundários, como antimicrobianos, lipopeptídeos e sideróforos. Também existem espécies que produzem compostos orgânicos voláteis (COVs) que inibem o crescimento micelial de fungos (INSAM; SEEWALD, 2010; HENRY *et al.*, 2011; CESCO *et al.*, 2012).

No genoma das estirpes S2536, S2784, S2785, S2787, S2788 e S2791 foram detectados três, dos quatro genes responsáveis pela biossíntese da bacilomicina L sintase, como *bmyD*, *bmyA* e *bmyB*. A bacilomicina é um membro da família de lipopeptídeos iturina, sintetizado por um mecanismo não ribossomal. Esse metabólito possui propriedades antifúngicas, principalmente contra fungos filamentosos (KOUMOUTSI *et al.*, 2004; CAWOY *et al.*, 2015), e alta bioatividade antimicrobiana (QIAN *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2018).

Nessas mesmas cepas também foi detectado todo o *cluster* gênico responsável pela síntese da plipastatina, *ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD* e *ppsE*. Entretanto, o gene *fenA* presente na biossíntese da fengicina sintetase foi encontrado apenas na estirpe S2896, *B. subtilis*. Sabe-se que a fengicina e plipastatina são poderosos compostos antifúngicos, uma vez que a fengicina

possui uma variedade de bioatividades, como inibição do crescimento fúngico, perturbação, curvatura e formação de micelas em membranas artificiais (VANITTANAKOM *et al.*, 1986; DELEU *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2011). A plipastatina está envolvida na inibição da fosfolipase A₂ e a formação de poros nas membranas fúngicas. Além disso, o uso desse composto é defendido como um substituto para fungicidas químicos, devido à sua biodegradabilidade e falta de toxicidade em plantas e animais (HARWOOD *et al.*, 2018).

Além disso, todo o *operon* biossintético da iturina, *ituD*, *ituA*, *ituB* e *ituC*, metabólito secundário com propriedades antifúngicas foi detectado nas estirpes de *B. amyloliquefaciens*. Ademais, todo o *operon bacABCDE* e o gene *bacG* (*ywfH*) responsável pela biossíntese e liberação da bacilisina, um composto antimicrobiano, também foi encontrado nessas mesmas espécies bacterianas. Nas espécies de *B. subtilis*, entretanto, foi detectado apenas os genes *bacD* e *bacE* da bacilisina.

A detecção desses *cluster* gênicos sugerem que as espécies de *B. amyloliquefaciens*, principalmente, possuem capacidade de produzir e liberar compostos antifúngicos e antimicrobianos poderosos, justificando assim a ação antagonista dessas espécies contra os fungos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Scherotinia sclerotiorum*.

Ademais, observou-se que uma cepa de *Lysinibacillus sphaericus*, S0127, inibiu 50% do crescimento micelial de *F. oxysporum* e 25% de *S. sclerotiorum*. E o isolado S1989, uma espécie de *B. thuringiensis* reduziu em 50% o desenvolvimento do fungo *S. sclerotiorum*. No entanto, esse comportamento antagonista não foi padrão para todas as espécies de *B. thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus*.

Na literatura, poucos são os estudos relacionados ao biocontrole de fungos por *Lysinibacillus sphaericus*, uma vez que essa espécie é amplamente utilizada para controle de insetos da ordem Diptera. Entretanto, Shabanamol *et al.* (2021) constataram que metabólitos antifúngicos putativos extraídos de uma cepa de *Lysinibacillus sphaericus* apresentaram atividade antagônica contra o patógeno *Rhizoctonia soloni*, ocorrendo 76,9% de inibição do crescimento do fungo. Essa mesma escassez de informações, sobre a ação antagonista contra fitopatógenos se aplica nas espécies de *B. thuringiensis*, porém alguns estudos descrevem que determinadas cepas de *Bt* são capazes de produzir compostos, como a bacteriocina (JEONG *et al.*, 2016), fengicina (KIM *et al.*, 2014) e compostos voláteis (ZHENG *et al.*, 2013) que antagonizam diretamente patógenos de plantas, bem como induzem a resistência do vegetal a fitopatógenos.

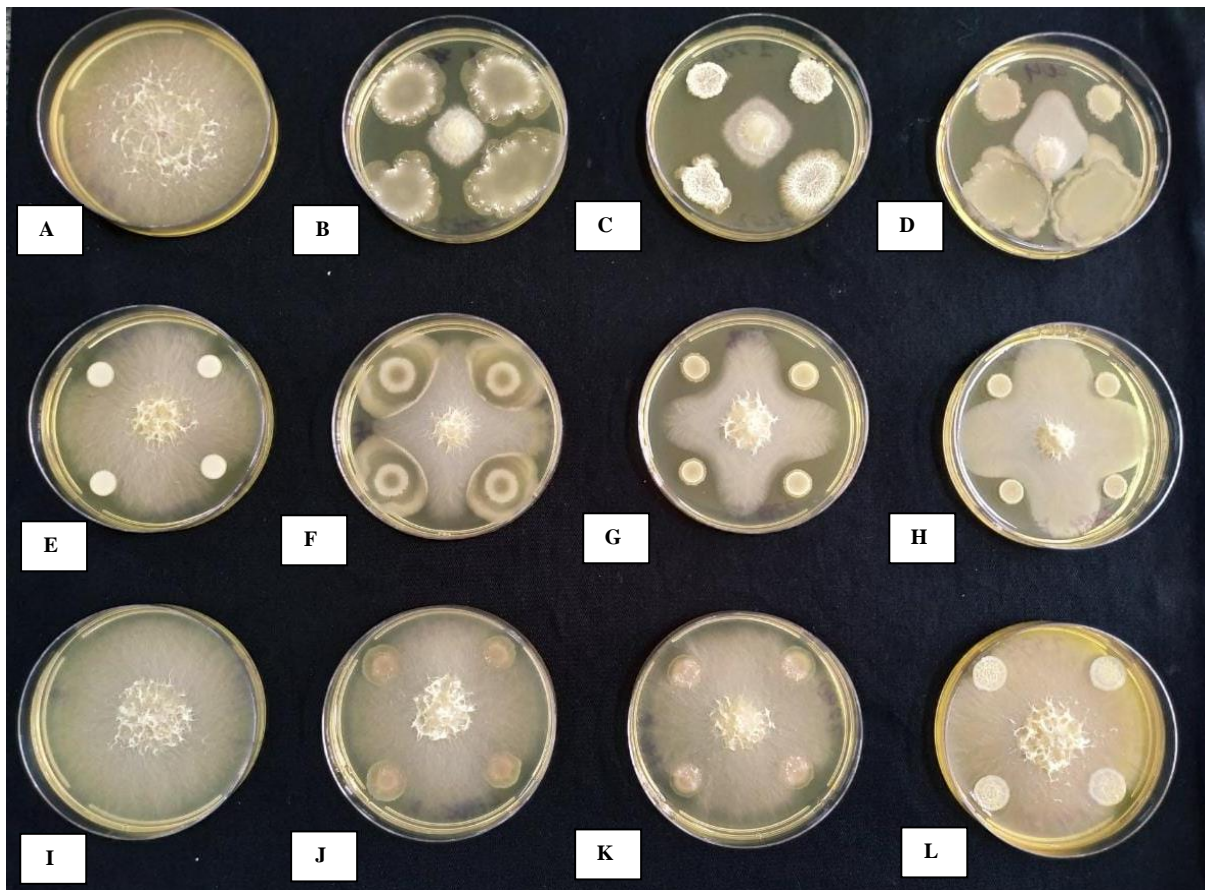


Figura 8. Atividade antagônica das estirpes de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.* contra o fitopatógeno *Scherotinia sclerotiorum*. **A** – *B. thuringiensis* (S1450); **B** – *B. amyloliquefaciens* (S2536); **C** – *B. amyloliquefaciens* (S2785); **D** – *B. amyloliquefaciens* (S2788); **E** – *B. cereus* (S0953); **F** – *B. amyloliquefaciens* (S2784); **G** – *B. subtilis* (S2794); **H** – *B. thuringiensis* (S1989); **I** – *B. pumilus* (S2795); **J** – *L. sphaericus* (S0002); **K** – *Brev. laterosporus* (S1438); **L** – *B. subtilis* (S2796).

6.5.3. Solubilização de Fósforo

Foi constatado que as estirpes capazes de solubilizar fosfato, foram em sua grande maioria, as pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato*, como *B. amyloliquefaciens* (S2536 e S2791), *B. subtilis* (S2790 e S2896), *B. atrophaeus* (S2792), *B. licheniformis* (S2777), *B. pumilus* (S2795) e *B. spizizenii* (S2893). Patil *et al.* (2014) descrevem que *B. subtilis* é um poderoso solubilizador de fosfato que tolera a salinidade do solo. Esse fato foi devidamente comprovado por Ahmad *et al.* (2018), ao qual constaram que uma cepa de *B. subtilis* (Q3) foi capaz de solubilizar de fósforo *in vitro*, e colonizar eficientemente raízes de algodão em solos salinos, permitindo que espécie vegetal nutrisse de fósforo. Além disso, Abdallah *et al.* (2018)

verificaram que a estirpe de *B. amyloliquefaciens* 32a, quando testada *in vitro*, foi capaz de produzir sideróforo, enzimas hidrolíticas, AIA e solubilizar fosfato inorgânico. E Mahdi *et al.* (2020) observaram que a cepa QA1 – *B. licheniformis* também exibiu uma alta atividade de solubilização de fosfato *in vitro*.

Assim, diversos são os relatos das espécies pertencentes ao *Bacillus subtilis* s.l. na solubilização de P, uma vez que essas bactérias são capazes de produzir uma mistura de compostos denominados ácidos orgânicos, como ácido lático, oxálico, glicólico, 2-cetogucônico, malônico e succínico (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999), que atuam na dissolução direta do material fosfático, ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato (KUCEY *et al.*, 1989, RICHARDSON, 1994).

Também foram observados resultados significativos na solubilização de fósforo em duas cepas pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Priestia*, sendo uma estirpe de *Bacillus cereus* (S0167) e outra estirpe caracterizada como *P. aryabhatai* (S2538). Maheswar e Sthiyavani (2012) descrevem que uma cepa de *B. cereus* foi capaz de solubilizar fósforo *in vitro*, contudo, essa espécie não foi tão eficiente quanto a espécie de *B. subtilis* também avaliada no mesmo estudo, quando alteradas as condições de temperatura e pH nos ensaios. Assim, raros são os estudos que abordam a efetividade dessa espécie na solubilização de fósforo, entende-se apenas, que algumas espécies de *Bacillus*, incluindo *B. cereus* são capazes de melhorar o crescimento, desenvolvimento e rendimento de plantas, devido a produção de metabólitos bioativos e nutrientes (RADHAKRISHNAN *et al.*, 2017).

Além disso, alguns estudos comprovaram a atividade solubilizadora de *P. aryabhatai* em fósforo, por exemplo, Ramesh *et al.* (2014) verificaram que dois isolados da espécie (MDSR14 e MDSR7) possuíam potencial para mobilizar P do solo e melhorar o crescimento, a produtividade e a assimilação de P nas culturas de soja e trigo. Ahmad *et al.* (2019) concluíram que *Bacillus aryabhatai* S10 foi uma espécie potencial solubilizadora de P que promoveu significativamente o crescimento e o valor nutricional de cultura de feijão-mungo e milho. Mesmo que esses resultados tenham sido obtidos em campo, os mesmos reforçam que a espécie *P. aryabhatai*, após ser avaliada em extensos ensaios de campo, pode ser uma espécie potencial para formulações de biofertilizante.

Tabela 4. Estimaco da solubilizaco de fósforo nas espécies de *Bacillus spp.*, *Lysinibacillus spp.*, *Priestia spp.* e *Brevibacillus spp.*

Estirpes	Spp.	Solubilizaco de Fsforo
S0002	<i>Lsp</i>	-
S0043	<i>Btrop</i>	-
S0127	<i>Lsp</i>	-
S0167	<i>Bc</i>	+
S0615	<i>Bt</i>	-
S0663	<i>Bc</i>	-
S0953	<i>Bc</i>	-
S1338	<i>Pmeg</i>	-
S1431	<i>Brlate</i>	-
S1438	<i>Brlate</i>	-
S1450	<i>Bt</i>	-
S1576	<i>Bt</i>	-
S1624	<i>Blu</i>	-
S1647	<i>Btoy</i>	-
S1989	<i>Bt</i>	-
S2536	<i>Bamy</i>	+
S2538	<i>Pary</i>	+
S2566	<i>Bt</i>	-
S2776	<i>Bs</i>	-
S2777	<i>Bli</i>	+
S2781	<i>Bpar</i>	-
S2782	<i>Bt</i>	-
S2783	<i>Bp</i>	-
S2784	<i>Bv/Ba</i>	-
S2785	<i>Bamy</i>	-
S2786	<i>Bmy</i>	-
S2787	<i>Bamy</i>	-
S2788	<i>Bamy</i>	-
S2790	<i>Bs</i>	+
S2791	<i>Bamy</i>	+
S2792	<i>Bat</i>	+
S2794	<i>Bs</i>	-
S2795	<i>Bp</i>	+
S2796	<i>Bs</i>	+
S2893	<i>Bsi</i>	+
S2894	<i>Lcap</i>	-
S2896	<i>Bs</i>	+

(+) = houve a solubilizaco de fsforo; (-) = no houve a solubilizaco de fósforo.

6.6. CONCLUSÕES

Foi constatado que houve uma diversidade de espécies patogênicas aos insetos da ordem Lepidoptera, incluindo *B. thuringiensis* e *B. amyloliquefaciens*.

Nesse estudo verificou-se que as estirpes S2790 (*B. subtilis*) e S2792 (*B. atrophaeus*) reduziram a sobrevivência de *A. grandis* (Coleoptera) e *C. elegans* (Nematoda) em 100% e 85% respectivamente. Esses resultados reforçam o potencial inseticida e nematicida dessas cepas.

Uma cepa de *P. aryabhatai* reduziu 77% da sobrevivência do percevejo marrom *E. heros*, indicando possivelmente que essa espécie poderia ser um potencial agente de biocontrole para *E. heros*. No entanto, maiores estudos devem ser realizados.

As espécies pertencentes ao grupo *B. subtilis sensu lato* foram consideradas excelentes agentes para exploração de biofertilizantes, bioinseticidas e fungicidas, uma vez que algumas espécies desse grupo, como *B. amyloliquefaciens* (S2536, S2785, S2791, S2787), *B. subtilis* (S2776, S2790, S2794), *B. pumilus* (S2795) e *B. licheniformis* (S2777) foram patogênicas a insetos da ordem Lepidoptera e Coleoptera, antagonistas contra os fungos *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Scherotinia sclerotiorum* e solubilizadoras de fósforo *in vitro*.

A falta de atividade inseticida e antagônica por parte de algumas cepas desse estudo, não inviabilizam o potencial das mesmas para outros fins, uma vez que essas bactérias podem apresentar atividade entomocida a outras espécies de insetos, nematoides e fitopatógenos, ou produzirem metabólitos importantes industrialmente.

Os resultados desse estudo prospectam um total de 34 cepas, com potencial entomocida, fungicida e/ou solubilizadora de fósforo, aos quais podem se tornar agentes de biocontrole e biofertilizantes para uma agricultura ecologicamente correta, econômica e sustentável.

6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, A. M. E.; NEMAT, A. M.; MAGDY, A. Potency of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Bosid.) Larvae. **Archives of phytopathology and plant protection**, v. 44, n. 3, p. 204-215, 2011.

ABDALLAH, D. B.; FRIKHA-GARGOURI, O.; TOUNSI, S. Rizhospheric competence, plant growth promotion and biocontrol efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain 32a. **Biological Control**, v. 124, p. 61-67, 2018.

ABREO, E.; VALLE, D.; MUJICA, V.; ALTIER, N. Pathogenicity and virulence factors of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Bacillus spp.* towards *Argyrotaenia sphaleropa* larvae (Lepidoptera). **Journal of Applied Entomology**, v. 142, n. 9, p. 882-892, 2018.

AHMAD, M.; ADIL, Z.; HUSSAIN, A.; MUMTAZ, M. Z.; NAFEES, M.; AHMAD, I.; JAMIL, M. Potential of phosphate solubilizing *Bacillus* strains for improving growth and nutrient uptake in mungbean and maize crops. **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, v. 56, n. 2, 2019.

AHMAD, M.; AHMAD, I.; HILGER, T. H.; NADEEM, S. M.; AKHTAR, M. F.; JAMIL, M.; ZAHIR, Z. A. Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus sp.* strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. **PeerJ**, v. 6, p. e5122, 2018.

ÂNGELO, E. A.; VILAS-BÔAS, G. T., & CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. *Bacillus thuringiensis*: características gerais e fermentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 4, p. 945-958, 2010.

ASSIE, L. K.; DELEU, M.; ARNAUD, L.; PAQUOT, M.; THONART, P.; CH, G.; HAUBRUGE, E. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). **Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)**, v. 67, n. 3, p. 647-655, 2002.

AUNPAD, R.; NA-BANGCHANG, K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. **Current microbiology**, v. 55, n. 4, p. 308-313, 2007.

AYAZ, M.; ALI, Q.; FARZAND, A.; KHAN, A. R.; LING, H.; GAO, X. Nematicidal volatiles from *Bacillus atrophaeus* GBSC56 promote growth and stimulate induced systemic resistance in tomato against *Meloidogyne incognita*. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 5049, 2021.

BACH, E.; RANGEL, C. P.; RIBEIRO, I. D. A.; PASSAGLIA, L. M. P. Pangenome analyses of *Bacillus pumilus*, *Bacillus safensis*, and *Priestia megaterium* exploring the plant-associated features of bacilli strains isolated from canola. **Molecular Genetics and Genomics**, p. 1-17, 2022.

BARBOZA-CORONA, J. E.; NIETO-MAZZOCCO, E.; VELÁZQUEZ-ROBLEDO, R.; SALCEDO-HERNANDEZ, R.; BAUTISTA, M.; JIMÉNEZ, B.; IBARRA, J. E. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene chiA74 from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1023-1029, 2003.

BERÇOT, M. R. Análise da diversidade de genes com atividade entomocida de estirpes de *Bacillus thuringiensis* por PCR em tempo real. 2021. 73 f., il. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

BERRY, C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. **Journal of invertebrate pathology**, v. 109, n. 1, p. 1-10, 2012.

BOISVERT, M. Utilization of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)-based formulations for the biological control of mosquitoes in Canada. In: **Proceedings of the 6th Pacific Rim Conference on the biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its environmental impact, Victoria, BC, Canada, 30 October-3 November, 2005**. National Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), 2007. p. 87-93.

BORRIS, R. Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture. In: **Bacteria in agrobiology: Plant growth responses**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 41-76.

BOTTONE, E. J.; R. Peluso. *Bacillus pumilus* strain. U.S. patent 6,090,613, 2000.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; WITWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
BUTKO, P. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2415-2422, 2003.

CAMPANINI, E. B.; DAVOLOS, C. C.; CUNHA, E. C. A.; LEMOS, M. V. F. Caracterização de novos isolados de *Bacillus thuringiensis* para o controle de importantes insetos-praga da agricultura. **Bragantia**, v. 71, n. 3, p. 362-369, 2012.

CAWOY, H.; DEBOIS, D.; FRANZIL, L.; DE PAUW, E.; THONART, P.; ONGENA, M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*/amyloliquefaciens. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 281-295, 2015.

CESCO, S.; MIMMO, T.; TONON, G.; TOMASI, N.; PINTON, R.; TERZANO, R.; NANNIPIERI, P. Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 2, p. 123-149, 2012.

CHAKROUN, M.; BANYULS, N.; BEL, Y.; ESCRICHE, B.; FERRÉ, J. Bacterial vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 2, p. 329-350, 2016.

CHANDRASEKARAN, R.; REVATHI, K.; NISHA, S.; KIRUBAKARAN, S. A.; SATHISH-NARAYANAN, S.; SENTHIL-NATHAN, S. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 104, n. 1, p. 65-71, 2012.

CHEN, H.; WANG, L.; SU, C. X.; GONG, G. H.; WANG, P.; YU, Z. L. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. **Letters in applied microbiology**, v. 47, n. 3, p. 180-186, 2008.

CHEN, Y.; GAO, X.; CHEN, Y.; QIN, H.; HUANG, L.; HAN, Q. Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. **Biological Control**, v. 78, p. 67-76, 2014.

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

CHERIF-SILINI, H.; SILINI, A.; YAHIAOUI, B.; OUZARI, I.; BOUDABOUS, A. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1087-1097, 2016.

CHOWDHURY, S. P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRIS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 780, 2015.

CORRÊA-FERREIRA, B. S. **Utilização do parasitóide de ovos *Trissolcus basal* (Wollaston) no controle de percevejos da soja.** Londrina, EMBRAPA-CNPSO, (EMBRAPA-CNPSO. Circular Técnica, 11), 1993. 40p.

CRICKMORE, N.; BONE, E. J.; WILLIAMS, J. A.; ELLAR, D. J. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 131, n. 3, p. 249-254, 1995.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. **Acta Tropica**, v. 97, n. 2, p. 168-173, 2006.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes. **Journal of colloid and interface science**, v. 283, n. 2, p. 358-365, 2005.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 1, p. 25-IN3, 1971.

DISI, J. O.; KLOPPER, J. W.; FADAMIRO, H. Y. Seed treatment of maize with *Bacillus pumilus* strain INR-7 affects host location and feeding by Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, p. 515-522, 2018.

EL-KERSH, T. A.; AHMED, A. M.; AL-SHEIKH, Y. A.; TRIPET, F.; IBRAHIM, M. S.; METWALLI, A. A. Isolation and characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains from Saudi Arabia with enhanced larvicidal toxicity against the mosquito vector *Anopheles gambiae* (sl). **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2016.

ESCUADERO, I. R.; BANYULS, N.; BEL, Y.; MAEZTU, M.; ESCRICHE, B.; MUÑOZ, D.; FERRÉ, J. A screening of five *Bacillus thuringiensis* Vip3A proteins for their activity against lepidopteran pests. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, p. 51-55, 2014.

FERREIRA, L.; ROSALES, E.; DANKO, A. S.; SANROMÁN, M. A.; PAZOS, M. M. *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 101, p. 19-26, 2016.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

GARCIA-RAMON, D. C.; MOLINA, C. A.; OSUNA, A.; VÍLCHEZ, S. An in-depth characterization of the entomopathogenic strain *Bacillus pumilus* 15.1 reveals that it produces inclusion bodies similar to the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 8, p. 3637-3654, 2016.

GEETHA, I.; MANONMANI, A. M.; PRABAKARAN, G. *Bacillus amyloliquefaciens*: a mosquitocidal bacterium from mangrove forests of Andaman & Nicobar islands, India. **Acta tropica**, v. 120, n. 3, p. 155-159, 2011.

GILL, S. S.; COWLES, E. A.; PIETRANTONIO, P. V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual review of entomology**, v. 37, n. 1, p. 615-634, 1992.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1127500, 2016.

GUO, Q.; LI, Y.; LOU, Y.; SHI, M.; JIANG, Y.; ZHOU, J.; LAI, H. *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 induces plant systemic resistance and improves rhizosphere microecology against tomato yellow leaf curl virus disease. **Applied Soil Ecology**, v. 137, p. 154-166, 2019.

HARWOOD, C. R.; MOUILLON, J. M.; POHL, S.; ARNAU, J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 6, p. 721-738, 2018.

HAYASHIDA, R.; BUENO, A. de F.; HERMEL, A.O.; HIRAKURI, M.H.; SILVA, F.A.C.; ROGGIA, S. *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) fitness on artificial diets: an approach to optimize mass rearing of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) for augmentative biological control. **Journal of Economic Entomology**, v.111, n 4, p. 1605-1613, 2018.

HENDERSON, C. F.; TILTON, E. W. Tests with acaricides against the brown wheat mite. **Journal of economic entomology**, v. 48, n. 2, p. 157-161, 1955.

HENRY, G.; DELEU, M.; JOURDAN, E.; THONART, P.; ONGENA, M. The bacterial lipopeptide surfactin targets the lipid fraction of the plant plasma membrane to trigger immune-related defence responses. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1824-1837, 2011.

IGNOFFO, C. M.; COUCH, T. L.; GARCIA, C.; KROHA, M. J. Relative activity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and *B. thuringiensis* var. *israelensis* against larvae of *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*, *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Heliothis virescens*. **Journal of Economic Entomology**, v. 74, n. 2, p. 218-222, 1981.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 3, p. 199-213, 2010.

JAIN, D.; SUNDA, S. D.; SANADHYA, S.; NATH, D. J.; KHANDELWAL, S. K. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

JEONG, H.; JO, S. H.; HONG, C. E.; PARK, J. M. Genome sequence of the endophytic bacterium *Bacillus thuringiensis* strain KB1, a potential biocontrol agent against phytopathogens. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00279-16, 2016.

JURAT-FUENTES, J. L.; JACKSON, T. A. Bacterial entomopathogens. **Insect pathology**, v. 2, p. 265-349, 2012.

KHEDHER, S. B.; BOUKEDI, H.; KILANI-FEKI, O.; CHAIB, I.; LAARIF, A.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S. *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 42-47, 2015.

KIM, P. I.; BAI, H.; BAI, D.; CHAE, H.; CHUNG, S.; KIM, Y.; CHI, Y. T. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 5, p. 942-949, 2004.

KOUMOUTSI, A.; CHEN, X. H.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; HITZEROTH, G.; FRANKE, P.; BORRISS, R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 4, p. 1084-1096, 2004.

LEKAKARN, H.; PROMDONKOY, B.; BOONSERM, P. Interaction of *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin with mosquito larval gut cells: Binding and internalization. **Journal of invertebrate pathology**, v. 132, p. 125-131, 2015.

LOKE, S. R.; ANDY-TAN, W. A.; BENJAMIN, S.; LEE, H. L.; SOFIAN-AZIRUN, M. SUSCEPTIBILITY of field-collected *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis israelensis* and temephos. **Tropical Biomedicine**, v. 27, n. 3, p. 493-503, 2010.

LONE, S. A.; MALIK, A.; PADARIA, J. C. Characterization of lepidopteran-specific *cry1* and *cry2* gene harbouring native *Bacillus thuringiensis* isolates toxic against *Helicoverpa armigera*. **Biotechnology reports**, v. 15, p. 27-32, 2017.

LÓPEZ-MEZA, J. E.; IBARRA, J. E. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1306-1310, 1996.

LUO, C.; ZHOU, H.; ZOU, J.; WANG, X.; ZHANG, R.; XIANG, Y.; CHEN, Z. Bacillomycin L and surfactin contribute synergistically to the phenotypic features of *Bacillus subtilis* 916 and the biocontrol of rice sheath blight induced by *Rhizoctonia solani*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 4, p. 1897-1910, 2015.

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

MAAGD, R. A.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in plant science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, 1999.

MAHALAKSHMI, A.; SUJATHA, K.; KANI, P.; SHENBAGARATHAI, R. Distribution of cry and cyt genes among indigenous *Bacillus thuringiensis* isolates with mosquitocidal activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 03, p. 216, 2012.

MAHDI, I.; FAHSI, N.; HAFIDI, M.; ALLAOUI, A.; BISKRI, L. Plant growth enhancement using rhizospheric halotolerant phosphate solubilizing bacterium *Bacillus licheniformis* QA1 and *Enterobacter asburiae* QF11 isolated from *Chenopodium quinoa* willd. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 948, 2020.

MAHESWAR, N. U.; SATHIYAVANI, G. Solubilization of phosphate by *Bacillus spp.*, from groundnut rhizosphere (*Arachis hypogaea* L). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 8, p. 4007-4011, 2012.

MAY, A.; MOREIRA, B. R. A.; MASCARIN, G. M.; VIANA, R. S.; SANTOS, M. S.; SILVA, E. H. F. M.; DE MELO, I. S. Induction of drought tolerance by inoculation of *Bacillus aryabhatai* on sugarcane seedlings. **Científica**, v. 47, n. 4, p. 400-410, 2019.

MOLINA, C. A.; CAÑA-ROCA, J. F.; OSUNA, A.; VILCHEZ, S. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1320-1327, 2010.

MONNERAT, R. G.; BATISTA, A. C.; MEDEIROS, P. T.; MARTINS, E.; MELATTI, V.; PRAÇA, L.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. **Biological Control**, v. 41, n. 3, p. 291-295, 2007.

MONNERAT, R. G.; SILVA, S. F.; SILVA-WERNECK, J. O. Catálogo do banco de germoplasma de bactérias do gênero *Bacillus*. Documentos 60, Brasília: Embrapa-Cenargen, 2001. 65p. <https://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00050530.pdf>.

MONNERAT, R.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R.; PUSZTAI-CAREY, M.; BORDAT, D.; FRUTOS, R. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins in diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Current Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 159-162, 1999.

MONTALVÃO, S. C. L. Uso de *Bacillus spp.* para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *Meloidogyne incognita* no algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). 2016. xv, 170 f., il. Tese (Doutorado em Fitopatologia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MONTALVÃO, S. C. L.; CASTRO, M. T. D.; SOARES, C. M. S.; BLUM, L. E. B.; MONNERAT, R. G. *Caenorhabditis elegans* as an indicator of toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains to *Meloidogyne incognita* race 3. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

MONTALVÃO, S. C.; DE CASTRO, M. T.; BLUM, L. E.; MONNERAT, R. G. Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* With *Bacillus spp.* Strains. **Journal of Agricultural Science**, v. 13, n. 9, 2021.

NAIR, K.; AL-THANI, R.; AL-THANI, D.; AL-YAFEI, F.; AHMED, T.; JAOUA, S. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Qatar as shown by crystal morphology, δ -endotoxins and cry gene content. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 708, 2018.

NAJITHA-BANU, A.; BALASUBRAMANIAN, C.; MOORTHY, P. V. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus thuringiensis* against dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Parasitology research**, v. 113, n. 1, p. 311-316, 2014.

ONES, G. W.; NIELSEN-LEROUX, C.; YANG, Y.; YUAN, Z.; FIUZA DUMAS, V.; MONNERAT, R. G.; BERRY, C. A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 14, p. 4112-4120, 2007.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115-125, 2008.

ORTIZ, N.; ARMADA, E.; DUQUE, E.; ROLDÁN, A.; AZCÓN, R. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. **Journal of plant physiology**, v. 174, p. 87-96, 2015.

PATEL, H.; TSCHEKA, C.; EDWARDS, K.; KARLSSON, G.; HEERKLOTZ, H. All-or-none membrane permeabilization by fengycin-type lipopeptides from *Bacillus subtilis* QST713. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1808, n. 8, p. 2000-2008, 2011.

PATIL, V. S. *Bacillus subtilis*: A potential salt tolerant phosphate solubilizing bacterial agent. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 3, n. 2, p. 141, 2014.

PEÑA, G.; MIRANDA-RIOS, J.; DE LA RIVA, G.; PARDO-LÓPEZ, L.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. A. *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 1, p. 353-360, 2006.

PERCHAT, S.; BUISSON, C.; CHAUFaux, J.; SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; GOHAR, M. *Bacillus cereus* produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. **Journal of invertebrate pathology**, v. 90, n. 2, p. 131-133, 2005.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 71, n. 2, p. 255-281, 2007.

PIRTTILÄ, A. M.; MOHAMMAD PARAST TABAS, H.; BARUAH, N.; KOSKIMÄKI, J. J. Biofertilizers and biocontrol agents for agriculture: How to identify and develop new potent microbial strains and traits. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 817, 2021.

PONCET, S.; DELÉCLUSE, A.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Evaluation of synergistic interactions among the *CryIVA*, *CryIVB*, and *CryIVD* toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 66, n. 2, p. 131-135, 1995.

PRAÇA, L. B.; BATISTA, A. C.; MARTINS, E. S.; SIQUEIRA, C. B.; DIAS, D. G. DE S.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. G. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas contra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 11-16. 2004

PROMEGA CORPORATION. QuantiFluor R dsDNA System QuantiFluor R dsDNA System. **Technical Manual**, 2015.

QIAN, S.; LU, H.; SUN, J.; ZHANG, C.; ZHAO, H.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Antifungal activity mode of *Aspergillus ochraceus* by bacillomycin D and its inhibition of ochratoxin A (OTA) production in food samples. **Food Control**, v. 60, p. 281-288, 2016.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 667, 2017.

RAMESH, A.; SHARMA, S. K.; YADAV, N.; JOSHI, O. P. Phosphorus mobilization from native soil P-pool upon inoculation with phytate-mineralizing and phosphate-solubilizing *Bacillus aryabhatai* isolates for improved P-acquisition and growth of soybean and wheat crops in microcosm conditions. **Agricultural Research**, v. 3, n. 2, p. 118-127, 2014.

REVATHI, K.; CHANDRASEKARAN, R.; THANIGAIVEL, A.; KIRUBAKARAN, S. A.; SATHISH-NARAYANAN, S.; SENTHIL-NATHAN, S. Effects of *Bacillus subtilis* metabolites on larval *Aedes aegypti* L. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 107, n. 3, p. 369-376, 2013.

RICHARDSON, A. E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PANKHOURST, C. E.; DOUBE, B. M.; GUPTA, V. V. S. R.; GRACE, P.R. (Ed.). Soil biota management in sustainable farming systems. Melbourne: CSIRO, 1994. p. 50-62.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

ROJAS-PINZÓN, P. A.; DUSSÁN, J. Contribution of *Lysinibacillus sphaericus* hemolysin and chitin-binding protein in entomopathogenic activity against insecticide resistant *Aedes aegypti*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 1-9, 2017.

RUCEY, R. M. N.; JANZEN, H.H.; LEGGET, M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agronomy*, New York, v. 42, p. 199-228, 1989.

RUIU, L. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. *Insects*, v. 6, p. 352–367, 2015.

RUIU, L.; FALCHI, G.; FLORIS, I.; MARCHE, M. G.; MURA, M. E.; SATTA, A. Pathogenicity and characterization of a novel *Bacillus cereus sensu lato* isolate toxic to the

Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* Wied. **Journal of invertebrate pathology**, v. 126, p. 71-77, 2015.

SAEID, A.; PROCHOWNIK, E.; DOBROWOLSKA-IWANIEK, J. Phosphorus solubilization by *Bacillus* species. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2897, 2018.

SHAHID, M.; ZEYAD, M. T.; SYED, A.; SINGH, U. B.; MOHAMED, A.; BAHKALI, A. H.; PICHTEL, J. STRESS-Tolerant Endophytic Isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Enhanced Salt Tolerance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 17, p. 10883, 2022.

SAMANTA, S.; DATTA, D.; HALDER, G. Biodegradation efficacy of soil inherent novel sp. *Bacillus tropicus* (MK318648) onto low density polyethylene matrix. **Journal of Polymer Research**, v. 27, n. 10, p. 1-16, 2020.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

SCHÜNEMANN, R.; ROGGIA, S.; MURARO, D. S.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Insecticidal potential of *B. acillus thuringiensis* for the biological control of neotropical brown stink bug. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 2, p. 131-138, 2018.

SELVAKUMAR, G.; MOHAN, M.; SUSHIL, S. N.; KUNDU, S.; BHATT, J. C.; GUPTA, H. S. Characterization and phylogenetic analysis of an entomopathogenic *Bacillus cereus* strain WGSPB-2 (MTCC 7182) isolated from white grub, *Anomala dimidiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 5, p. 525-534, 2007.

SHABANAMOL, S.; THAMPI, M.; SAJANA, P.; VARGHESE, S.; KARTHIKA, S.; GEORGE, T. K.; JISHA, M. S. Characterization of the major antifungal extrolite from rice endophyte *Lysinibacillus sphaericus* against *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 2605-2613, 2021.

SHAO, Y.; CHEN, B.; SUN, C.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C.; BOLAND, W. Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. **Cell Chemical Biology**. v. 24, n. 1, p. 66-75, 2017.

SHARMA, V.; KAUR, J.; SHARMA, S. Plant growth promoting rhizobacteria: potential for sustainable agriculture. **Biotechnología Vegetal**, v. 20, n. 3, p. 157-166, 2020.

SHMIDT, F. G. V., MONNERAT, R. G., BORGES, M., & CARVALHO, R. D. S. Metodologia de criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos. Circular Técnica 11, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001, 20 p. Disponível em: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=208922>.

SHODA, M. Bacterial control of plant diseases. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 515-521, 2000.

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

SILVA-FILHA, M. H. N. L.; PEIXOTO, C. A. Immunocytochemical localization of the *Bacillus sphaericus* binary toxin components in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae midgut. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 3, p. 138-146, 2003.

SILVA-WERNECK, J. O.; MONNERAT, R. Metodologias para caracterização de isolados de *Bacillus thuringiensis*. Circular Técnica 10, 5p. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia., 2002. 5p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/23206/1/cot070.pdf>.

SMIRNOVA, T. A.; MINENKOVA, I. B.; ORLOVA, M. V.; LECADET, M. M.; AZIZBEKYAN, R. R. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. **Research in microbiology**, v. 147, n. 5, p. 343-350, 1996.

SOUZA, J. D. A.; JAIN, S.; DE OLIVEIRA, C. M. F.; AYRES, C. F.; LUCENA, W. A. Toxicity of a *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperda*. **BioControl**, v. 54, n. 3, p. 467-473, 2009.

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

STIERNAGLE, T. 2006. Maintenance of *C. elegans*. WormBook. ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 11 p. Disponível em: http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.pdf

SUN, J.; QIAN, S.; LU, J.; LIU, Y.; LU, F.; BIE, X.; LU, Z. Knockout of rapC improves the bacillomycin D yield based on de novo genome sequencing of *Bacillus amyloliquefaciens* fmbJ. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 17, p. 4422-4430, 2018.

STRINGERFIXER. *Priestia*. Disponível em: <https://stringfixer.com/pt/Priestia>. Acesso em 30/07/2022

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; TORRACA, S. L.; MAGALHÃES, F. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

TETREAU, G.; STALINSKI, R.; KERSUSAN, D.; VEYRENC, S.; DAVID, J. P.; REYNAUD, S.; DESPRÉS, L. Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5189-5195, 2012.

THANABALU, T.; PORTER, A. G. Efficient expression of a 100-kilodalton mosquitocidal toxin in protease-deficient recombinant *Bacillus sphaericus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4031-4036, 1995.

TORRES, M. J.; ROCHA, V. F.; PETROSELLI, G.; VILLENA, R. R.; AUDISIO, M. C. Entomopathogenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* strains against *Musca domestica* under controlled conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 170, n. 7, p. 584-592, 2022.

URIBE, D.; MARTINEZ, W.; CERON, J. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n. 2, p. 119-127, 2003.

VALICENTE, F. H.; MOURÃO, A. H. C. Use of by-products rich in carbon and nitrogen as a nutrient source to produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner) -based biopesticide. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 702-708, 2008.

VANITTANAKOM, N.; LOEFFLER, W.; KOCH, U.; JUNG, G. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. **The Journal of antibiotics**, v. 39, n. 7, p. 888-901, 1986.

WIRTH, M. C.; PARK, H. W.; WALTON, W. E.; FEDERICI, B. A. *CytIA* of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to *CryIIA* in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 185-189, 2005.

YUN, D. C.; YANG, S. Y.; KIM, Y. C.; KIM, I. S.; KIM, Y. H. Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 751-753, 2013.

YUNCHENG, W.; JUN, Y.; WASEEM, R.; QIRONG, S.; QIWEI, H. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1327-1336, 2014.

ZHANG, J.; HODGMAN, T. C.; KRIEGER, L.; SCHNETTER, W.; SCHAIRER, H. U. Cloning and analysis of the first *cry* gene from *Bacillus popilliae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 13, p. 4336-4341, 1997.

ZHENG, J.; GAO, Q.; LIU, L.; LIU, H.; WANG, Y.; PENG, D.; SUN, M. Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* reveals a path to specialized exploitation of multiple invertebrate hosts. **MBio**, v. 8, n. 4, p. e00822-17, 2017.

ZHENG, M.; SHI, J.; SHI, J.; WANG, Q.; LI, Y. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, v. 65, n. 2, p. 200-206, 2013.

ZUBASHEVA, M. V.; GANUSHKINA, L. A.; SMIRNOVA, T. A.; AZIZBEKYAN, R. R. Larvicidal activity of crystal-forming strains of *Brevibacillus laterosporus*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 755-762, 2010.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

Os resultados produzidos por esse estudo comprovaram que:

1. A identificação e caracterização de espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus* só é completamente satisfatória e precisa quando utilizado dois ou mais métodos de identificação, principalmente métodos fenotípicos clássicos e métodos moleculares;
2. A caracterização morfológica e citomorfológica garante uma descrição primária e visual das espécies. Esse método pode ser usado como parâmetro inicial de seleção, no entanto, o mesmo possui baixa confiabilidade, uma vez que diversas cepas apresentaram padrões morfológico bastante similares entre si, principalmente dentre as espécies pertencentes aos grupos *B. cereus s.l* e *B. subtilis s.l*.
3. O mesmo pode ser observado com a caracterização bioquímica por resistência a antimicrobianos, pois foram constatadas a resistência de diferentes espécies a um mesmo antibiótico ou a resistência de um grupo filogenético inteiro a um mesmo antibiótico, com por exemplo as espécies do grupo *B. cereus s.l* aos antibióticos β -lactâmicos. Entretanto, esse método de identificação garante uma maior praticidade de execução e interpretação dos resultados, além de proporcionar uma compreensão do perfil de resistência e suscetibilidade das estirpes bacterianas.
4. A identificação bacteriana por espectrometria de massa – MALDI TOF MS é limitada, uma vez que o banco de dados da plataforma comercial MALDI-Biotyper® possui um número restrito de espécies da classe *Bacilli* registradas. Desse modo, a construção de um banco de dados suplementar e/ou uma base de dados pública são necessárias. Todavia, o software MALDI-Biotyper® também apresentou falhas no processo de identificação, quando utilizado o banco de dados suplementar. Ademais, por ser uma técnica extremamente sensível a variações externas, quaisquer tipos de fatores, internos ou externos, podem influenciar a identificação correta das espécies bacterianas, sendo necessário uma padronização extremamente rigorosa e precisa.

5. A identificação bacteriana por métodos moleculares, como sequenciamento genético e qPCR garantiram os melhores resultados nesse estudo, uma vez que os mesmos foram capazes de identificar as espécies de forma concisa, sem apresentar muitas falhas ou erros. Apesar de serem métodos relativamente mais caros e que necessitam de um tempo maior para sua execução, a identificação por métodos moleculares garante uma maior confiabilidade nos resultados. Além disso, após estabelecidos todos os parâmetros para sua execução, esses métodos se tornam práticos, ágeis e com custo reduzido.
6. O método de identificação por qPCR, após estabelecidos todos os parâmetros de uso e validação dos *primers* torna-se uma técnica prática, confiável, de rápida execução, de fácil interpretação, e com baixo custo de execução quando comparados ao sequenciamento genético.
7. Existe uma diversidade de espécies patogênicas à insetos, nematoides e fungos de interesse agrícola, além do tradicional *B. thuringiensis*, que poderão ser excelentes agentes biológicos de biocontrole, principalmente em casos que há a resistência dos insetos às formulações existentes.
8. O grupo *B. subtilis s.l* possui um complexo gênico extremamente importante e atuante no controle de pragas e doenças de interesse agrícola, bem como na solubilização de fósforo. Sendo assim, é recomendado o uso dessas espécies na agricultura, uma vez que as mesmas são excelentes agentes de biocontrole e biofertilização.

APÊNDICE I – CAPÍTULO 2

Gráfico de amplificação, curva de *melting* e curva padrão de acordo com os ensaios realizados para *primers* destinados a identificação de espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Brevibacillus*.

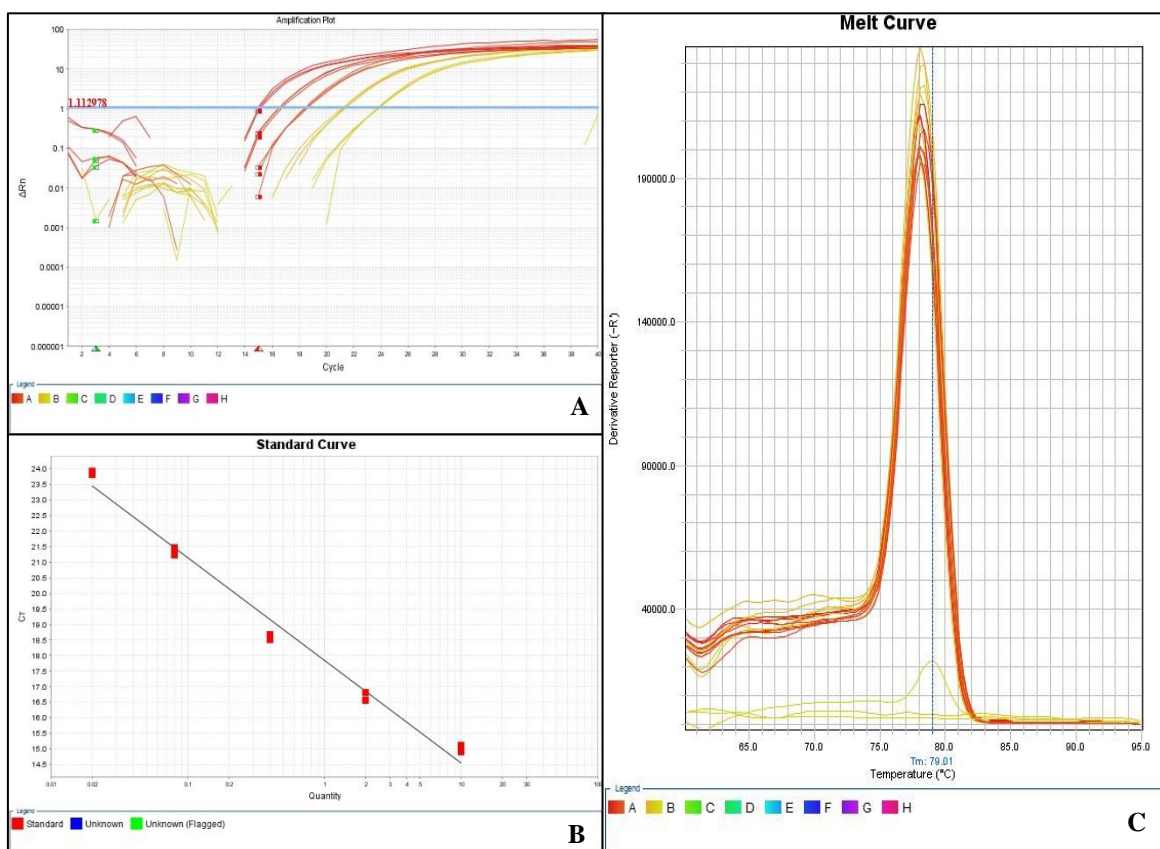


Figura 1. *Primer Bacillus atrophaeus*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

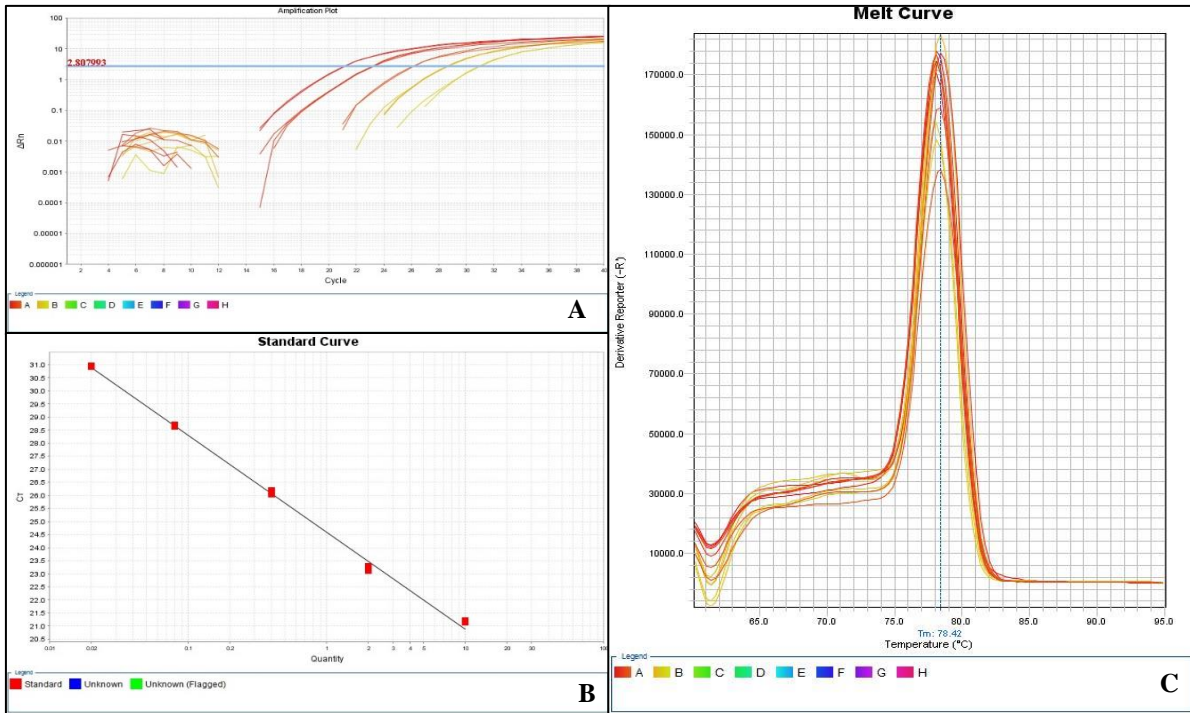


Figura 2. *Primer Bacillus cereus*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de Melting.

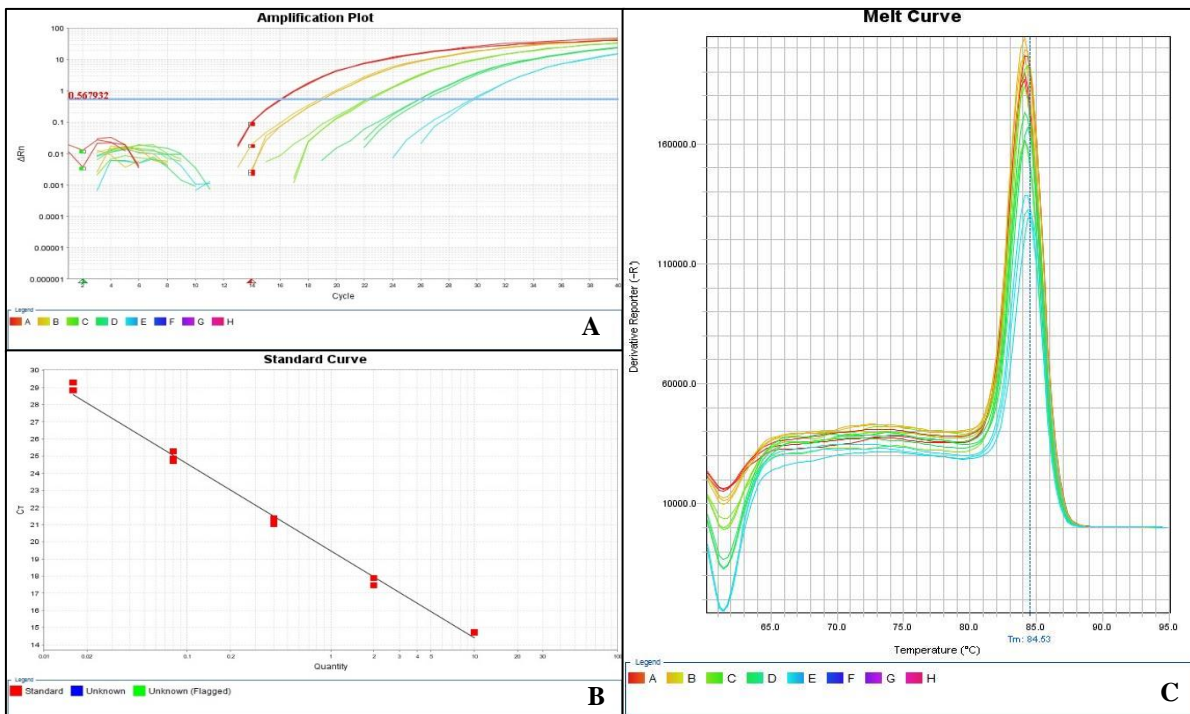


Figura 3. *Primer Bacillus licheniformis*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de Melting.

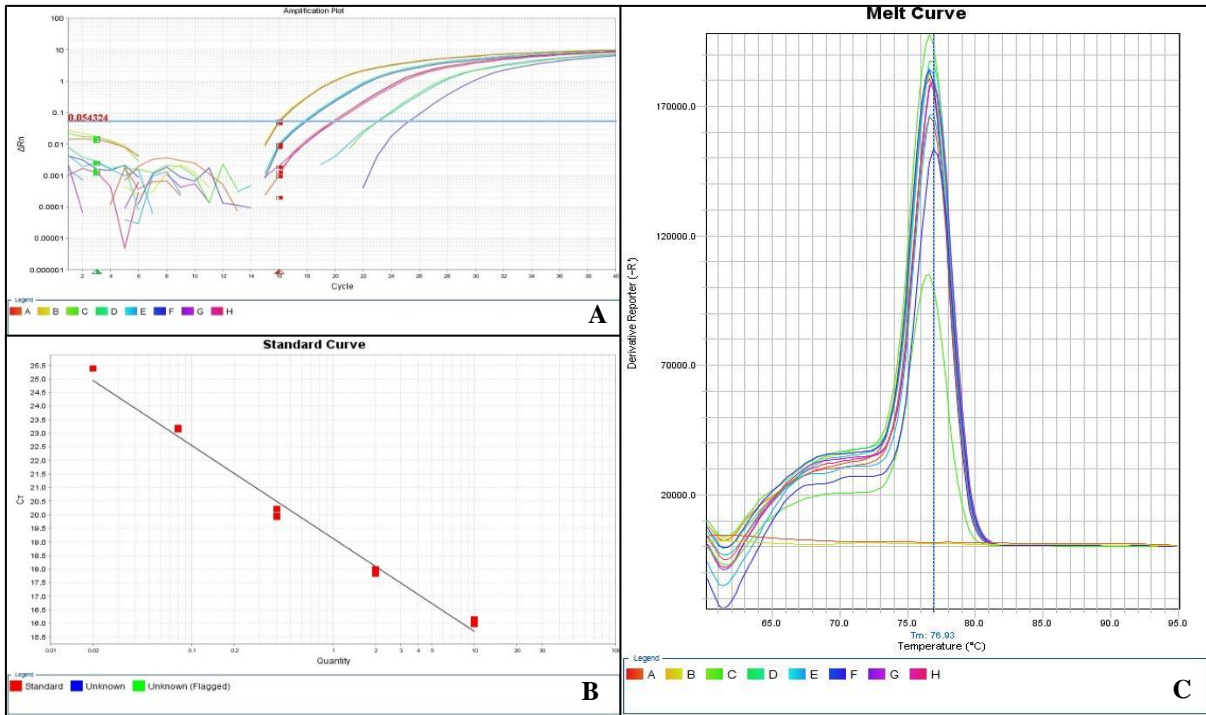


Figura 4. *Primer Bacillus luti*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

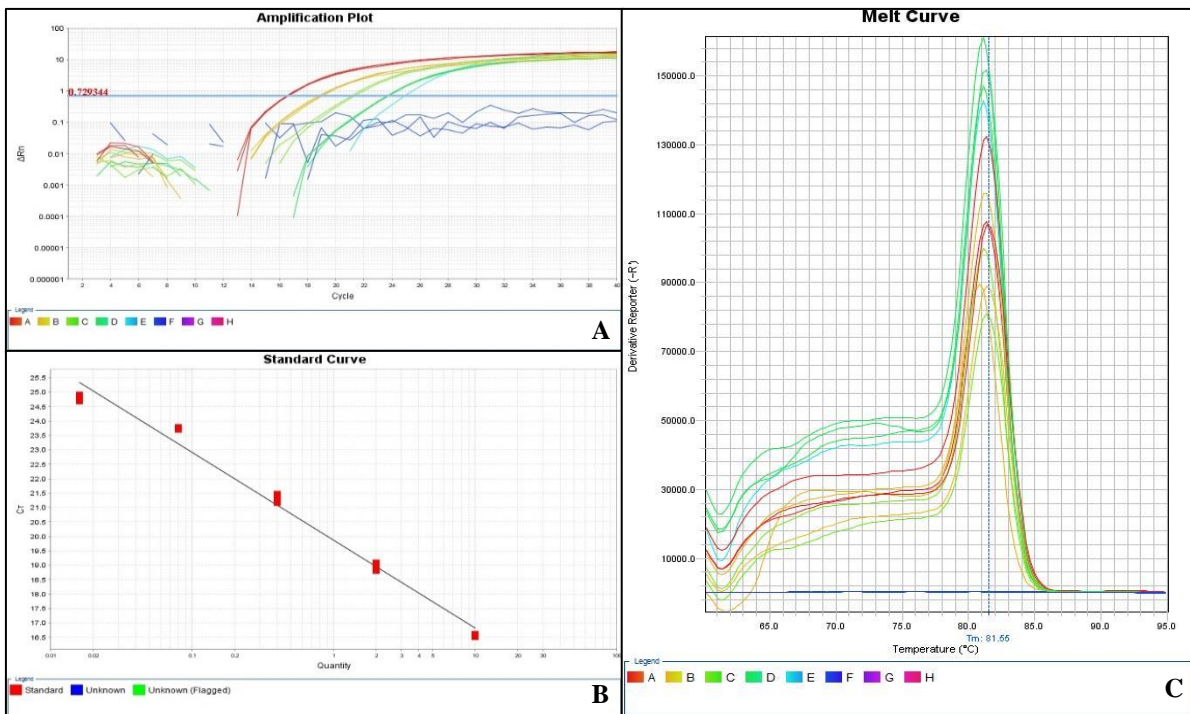


Figura 5. *Primer Priestia megaterium (B. megaterium)*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

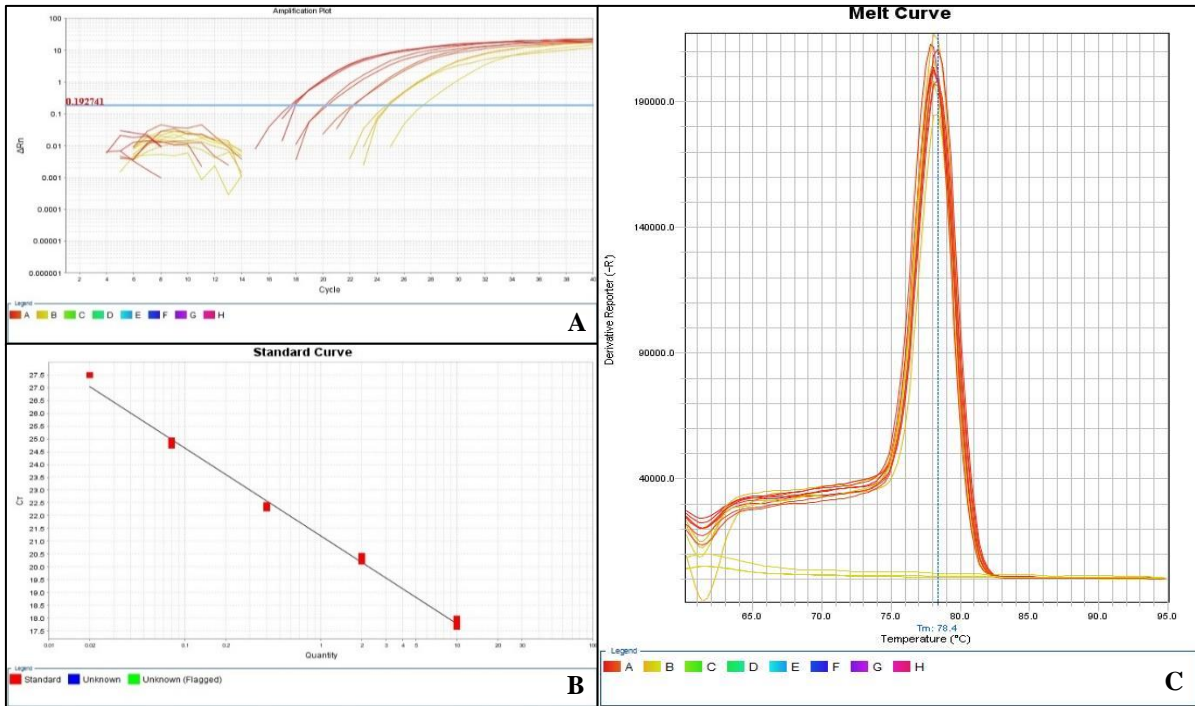


Figura 6. *Primer Bacillus methylotrophicus.* **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

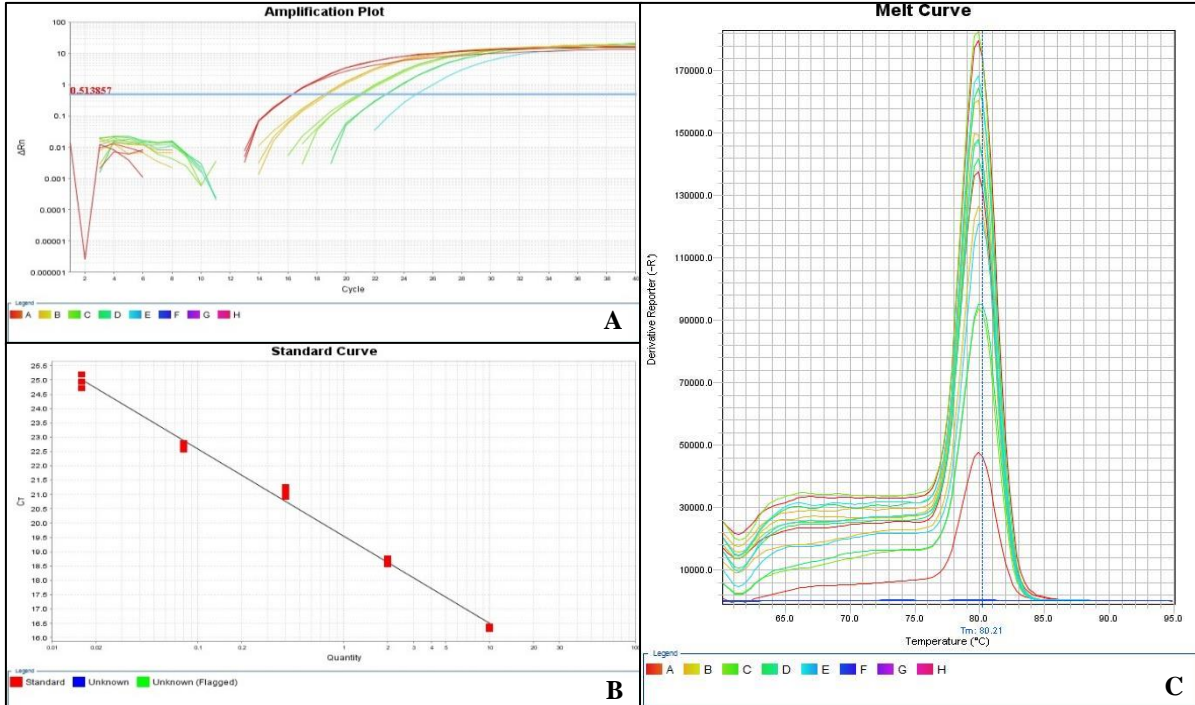


Figura 7. *Primer Bacillus mycoides.* **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

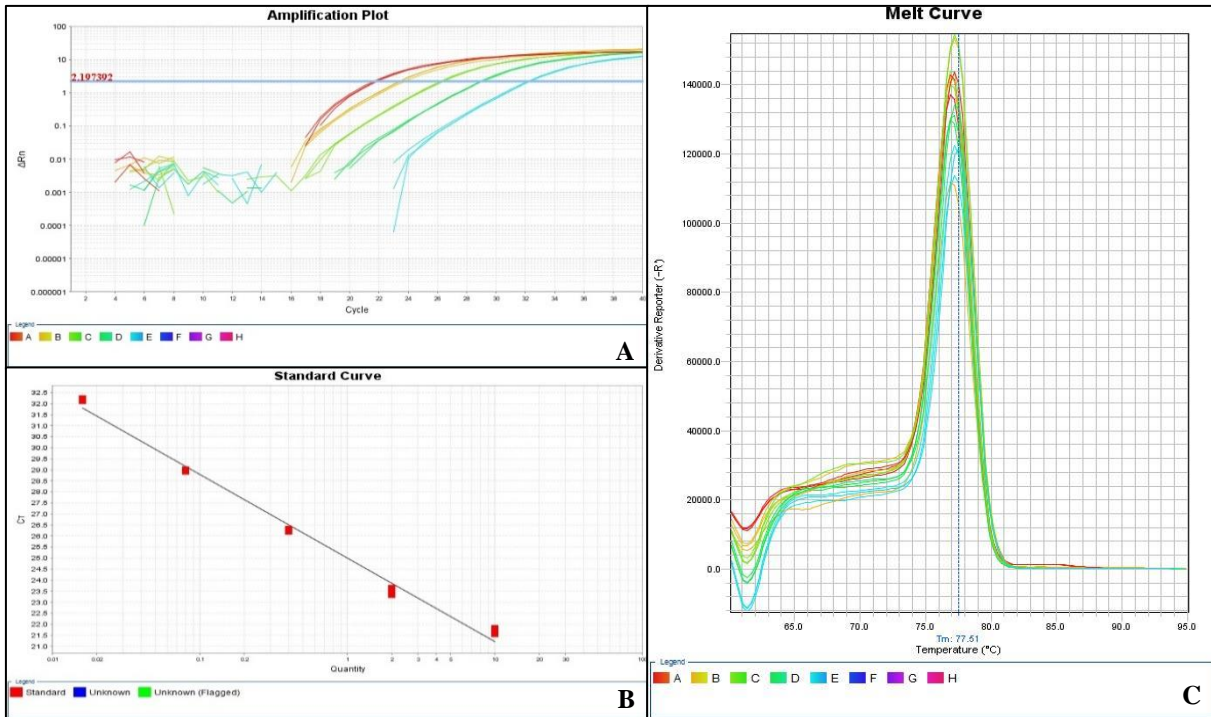


Figura 8. *Primer Bacillus pumilus*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

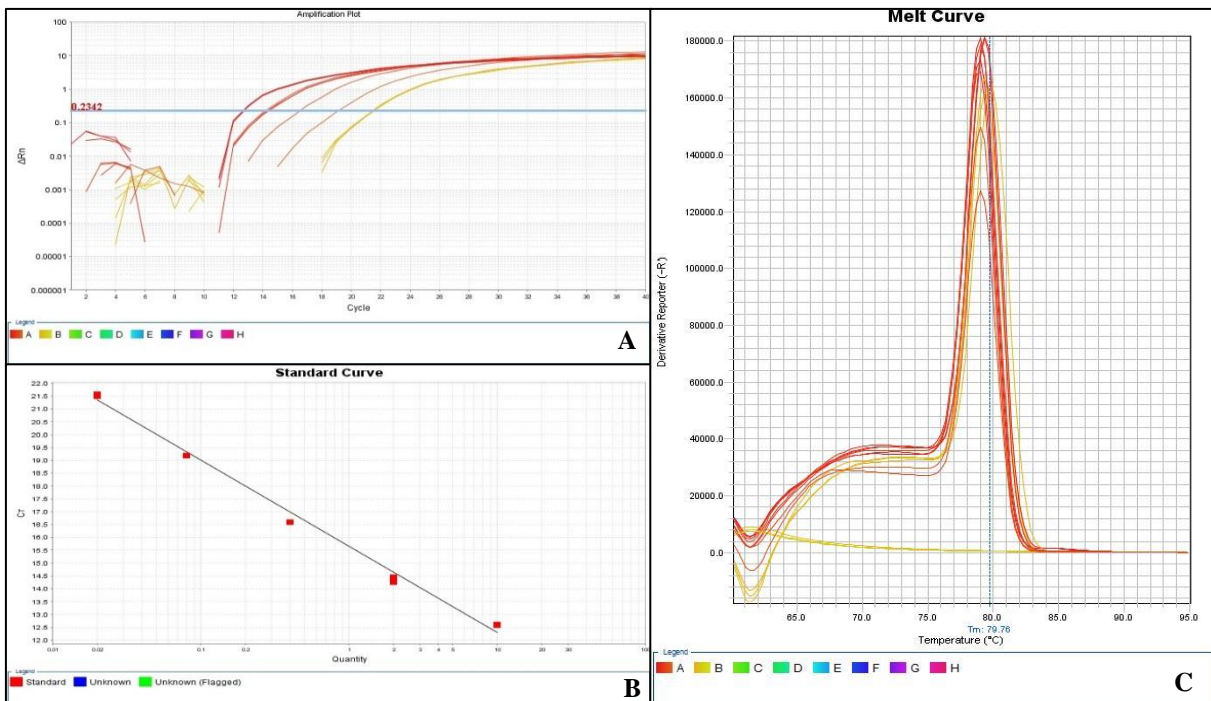


Figura 9. *Primer Bacillus safensis*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

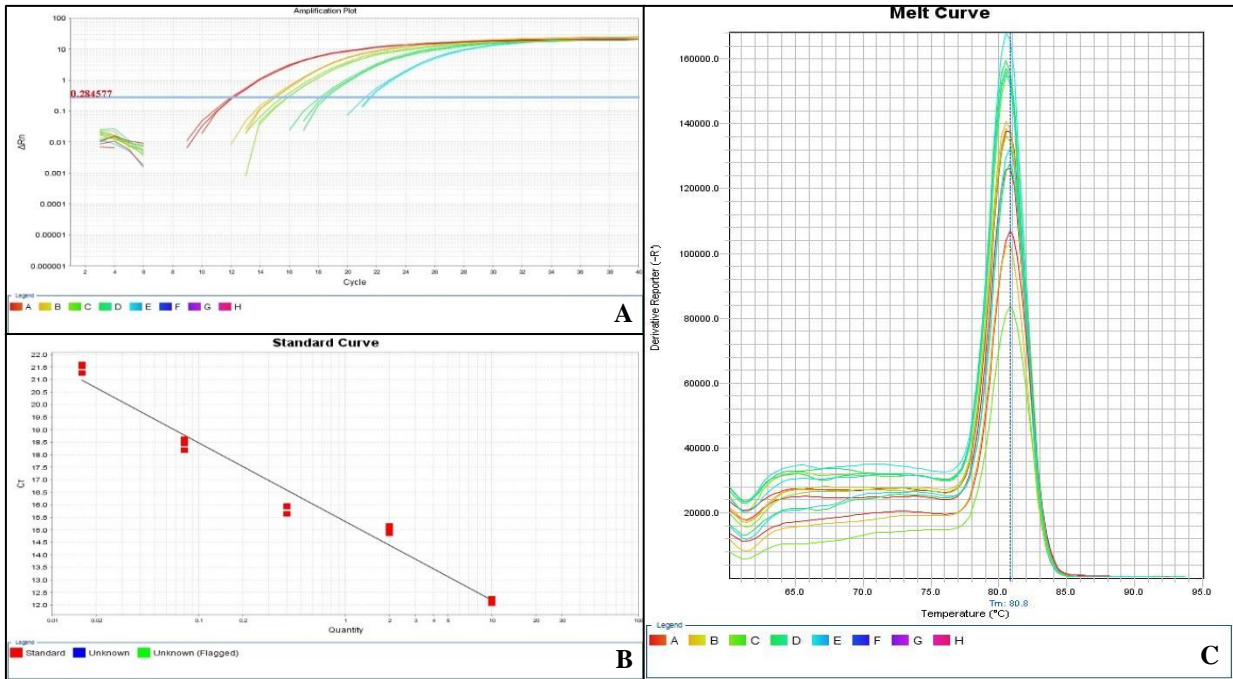


Figura 10. *Primer Bacillus spizizenii*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C** – Curva de Melting.

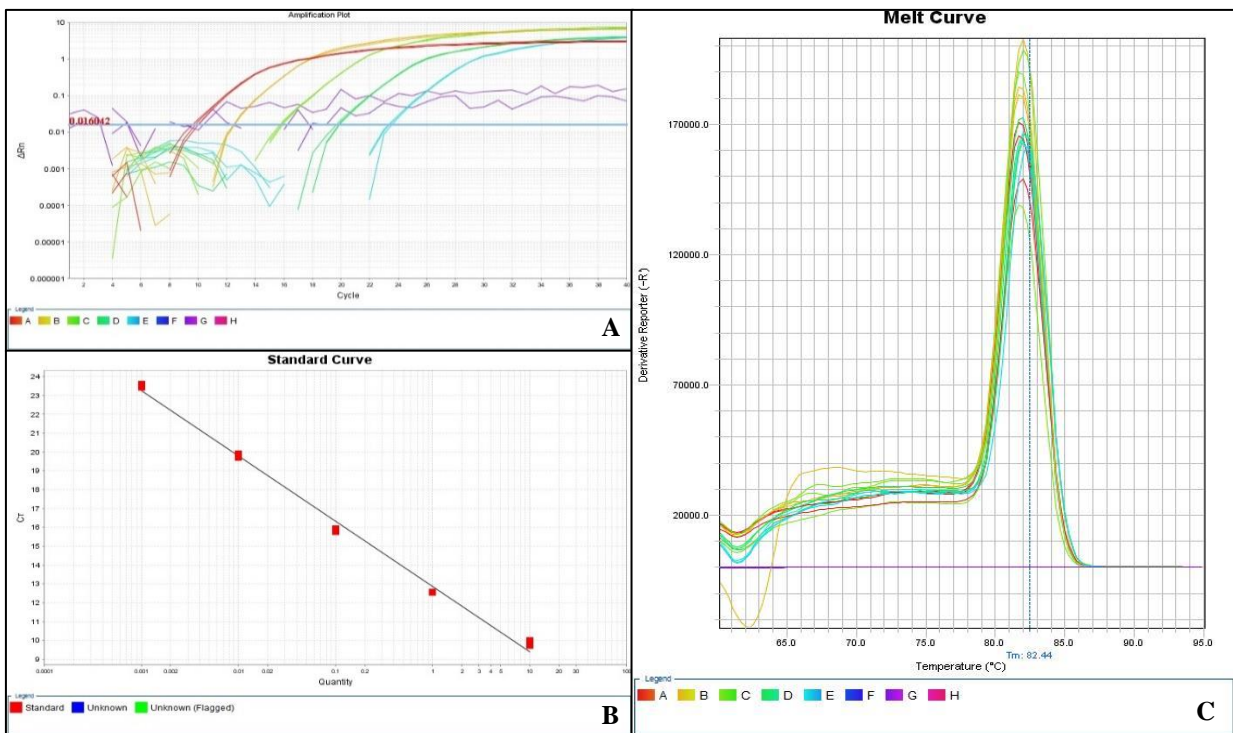


Figura 11. *Primer Bacillus subtilis*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C** – Curva de Melting.

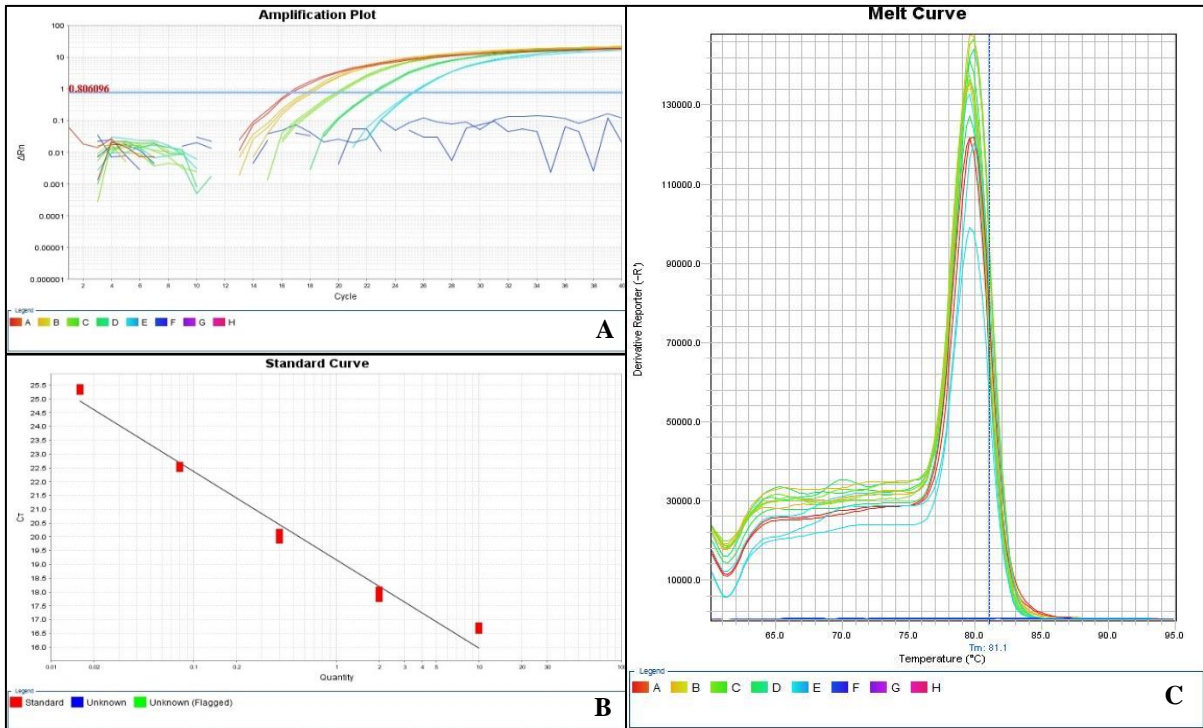


Figura 12. *Primer Bacillus tropicus 3.* **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C** – Curva de *Melting*.

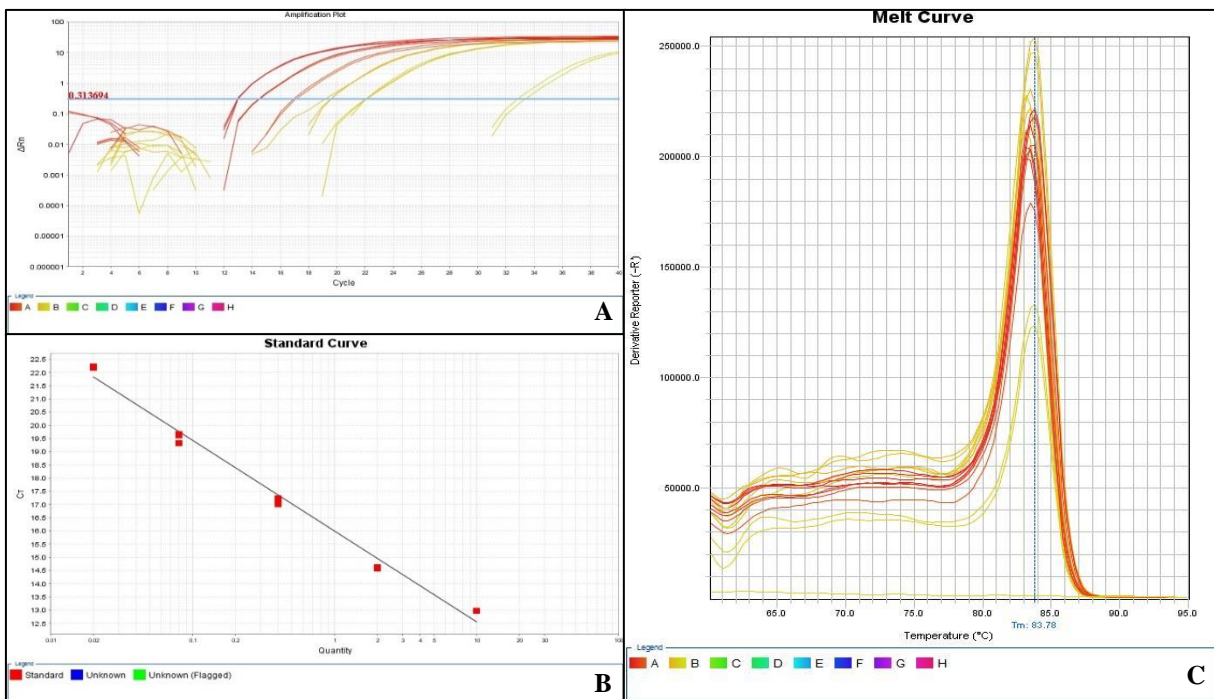


Figura 13. *Primer Brevibacillus laterosporus.* **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C** – Curva de *Melting*.

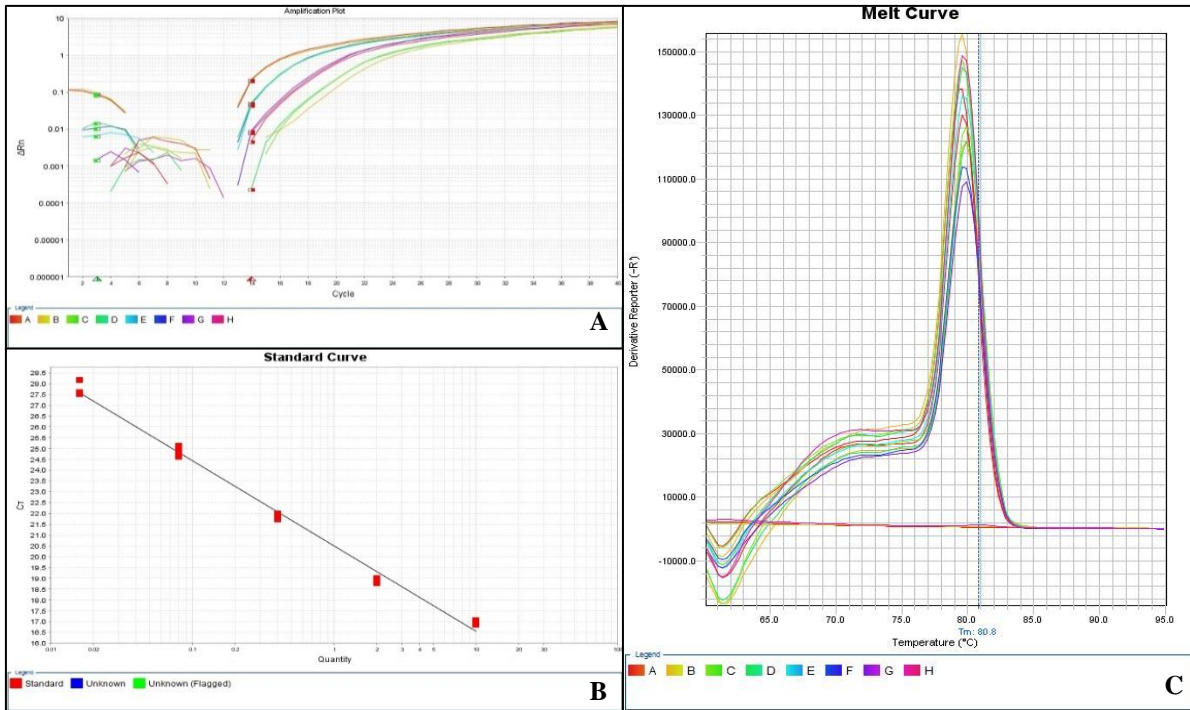


Figura 14. Primer *Bacillus thuringiensis* 1. A – Gráfico de Amplificação; B – Curva Padrão; C- Curva de Melting.

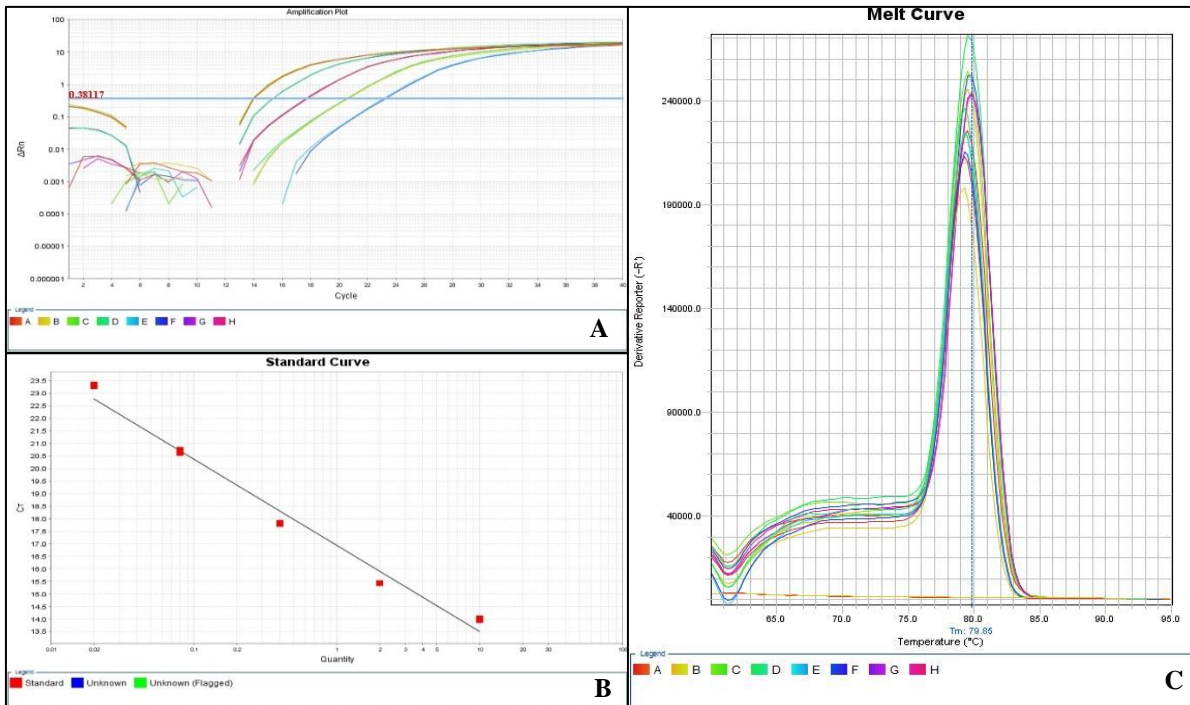


Figura 15. Primer *Bacillus thuringiensis* 2. A – Gráfico de Amplificação; B – Curva Padrão; C- Curva de Melting.

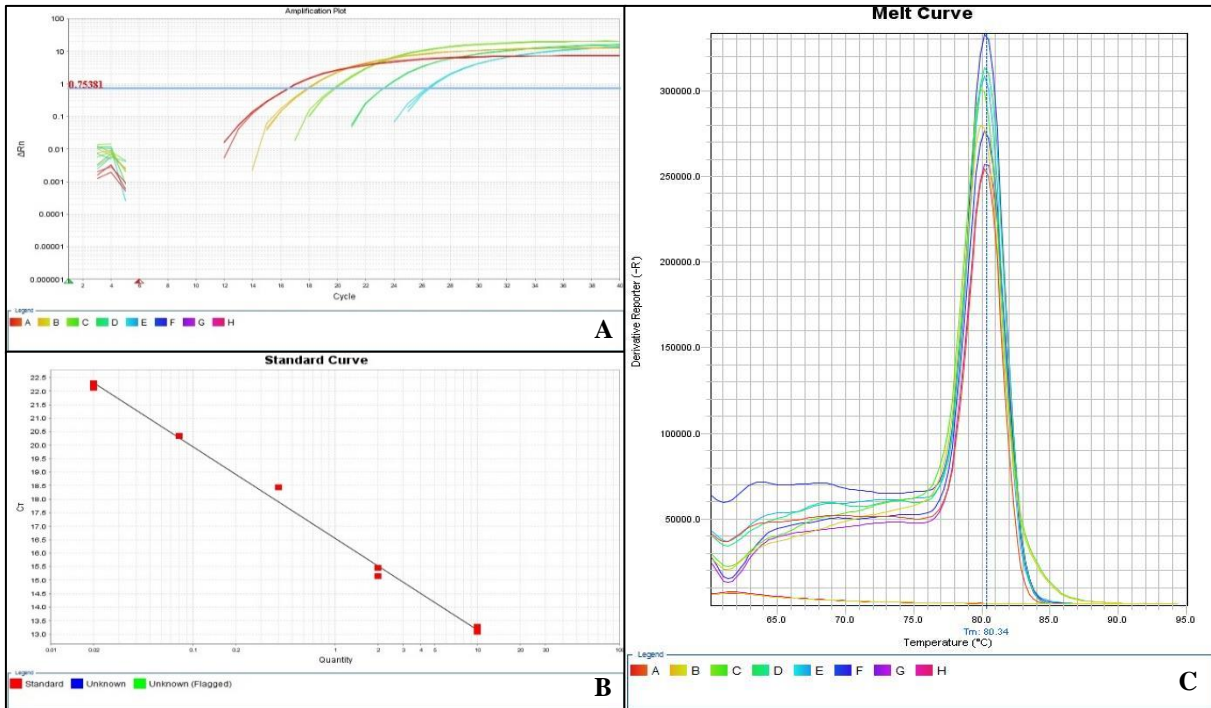


Figura 16. Primer *Bacillus thuringiensis* 3. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

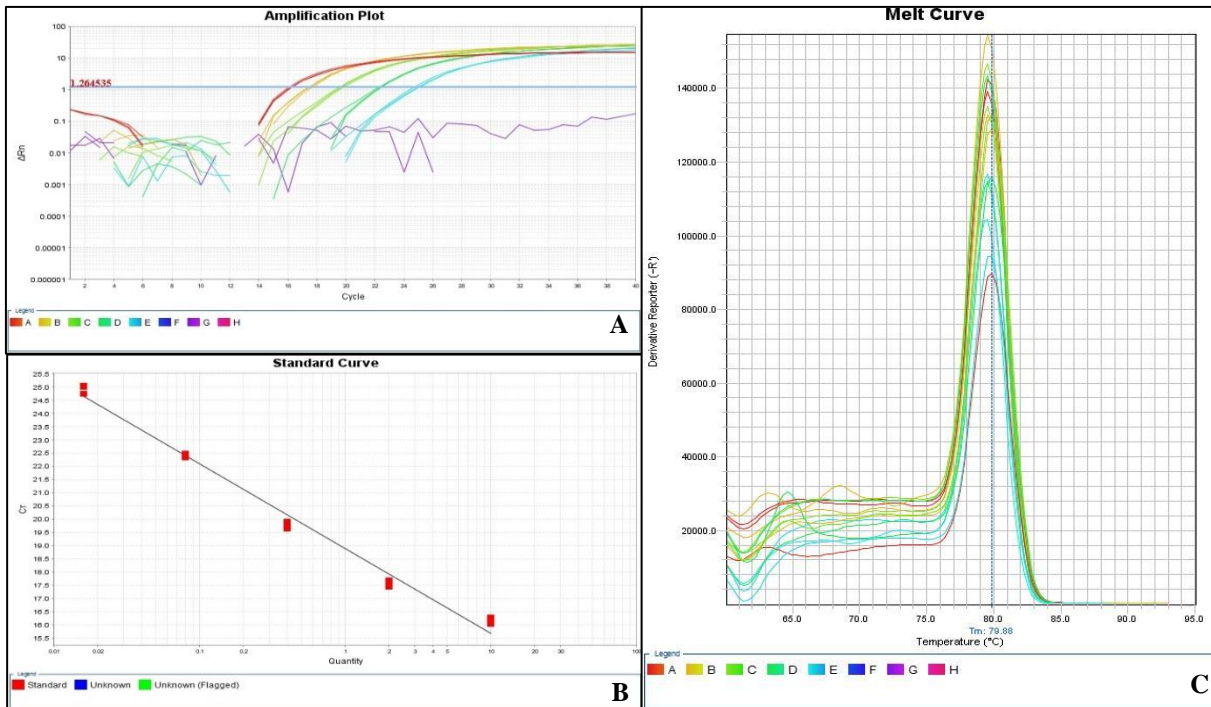


Figura 17. Primer *Priestia aryabhatai* (*B. aryabhatai*). **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

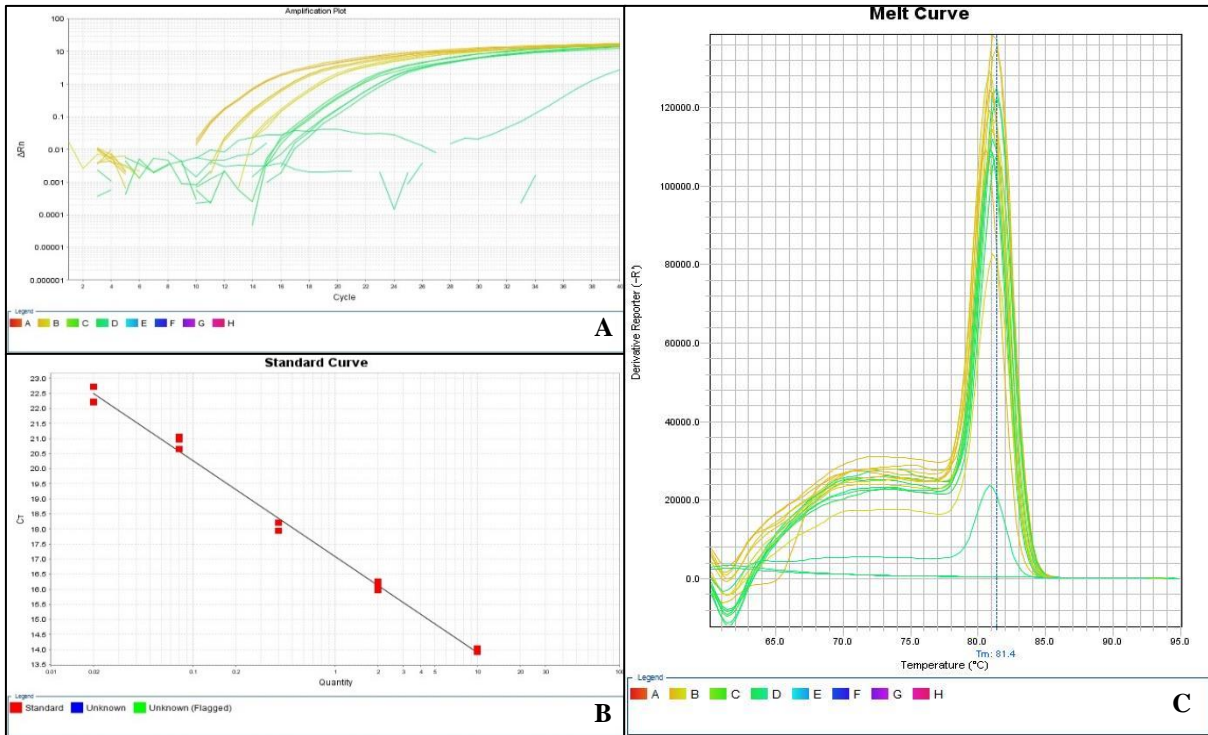


Figura 18. *Primer Lysinibacillus sphaericus*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de Melting.

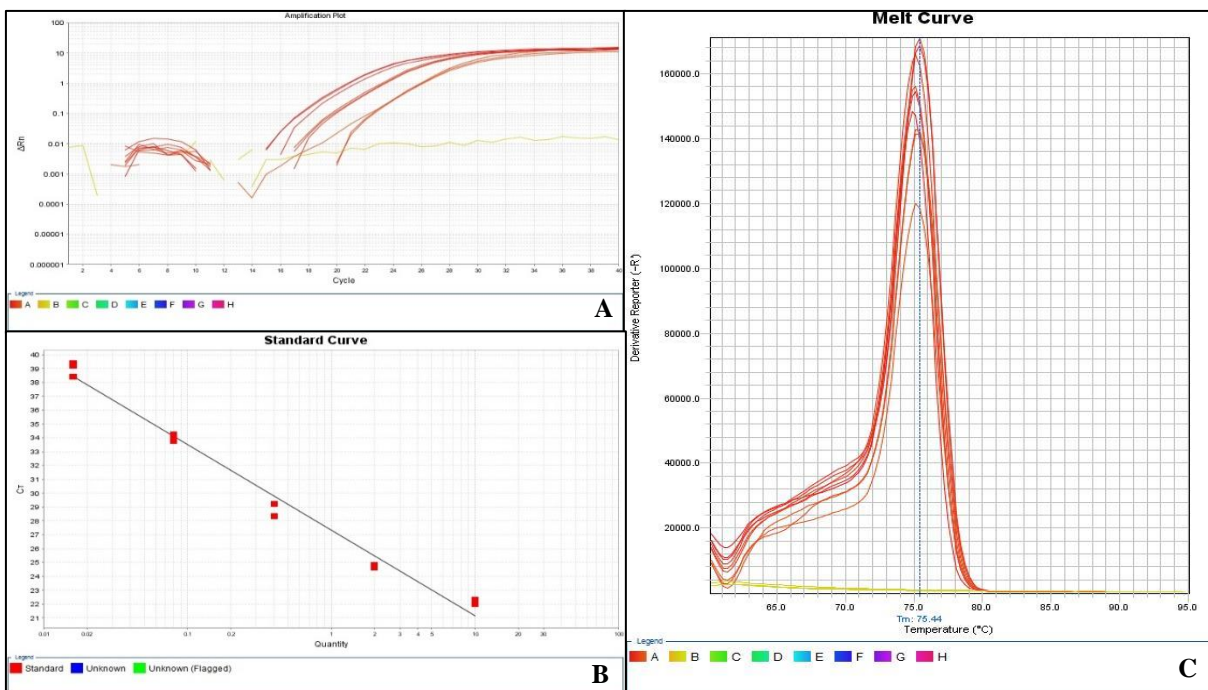


Figura 19. *Primer Bacillus toyonensis*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de Melting.

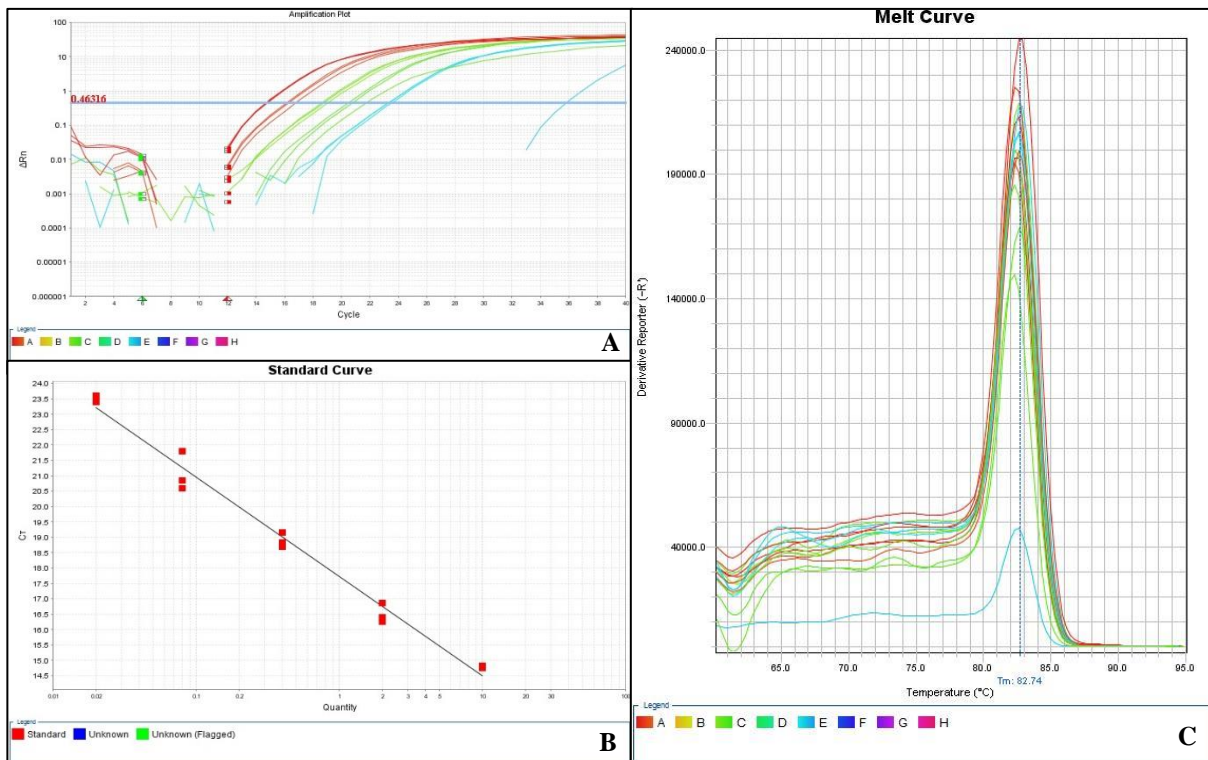
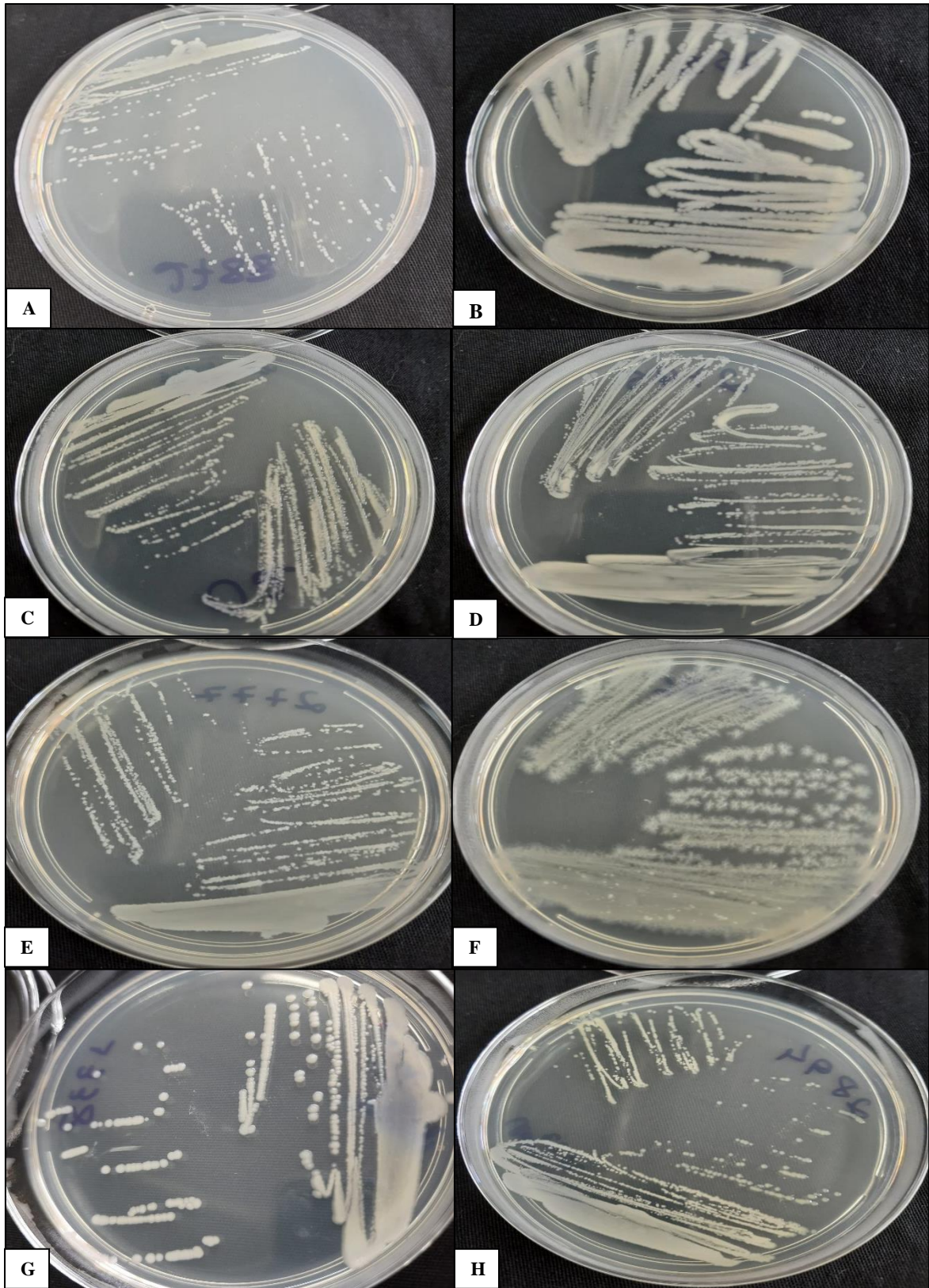
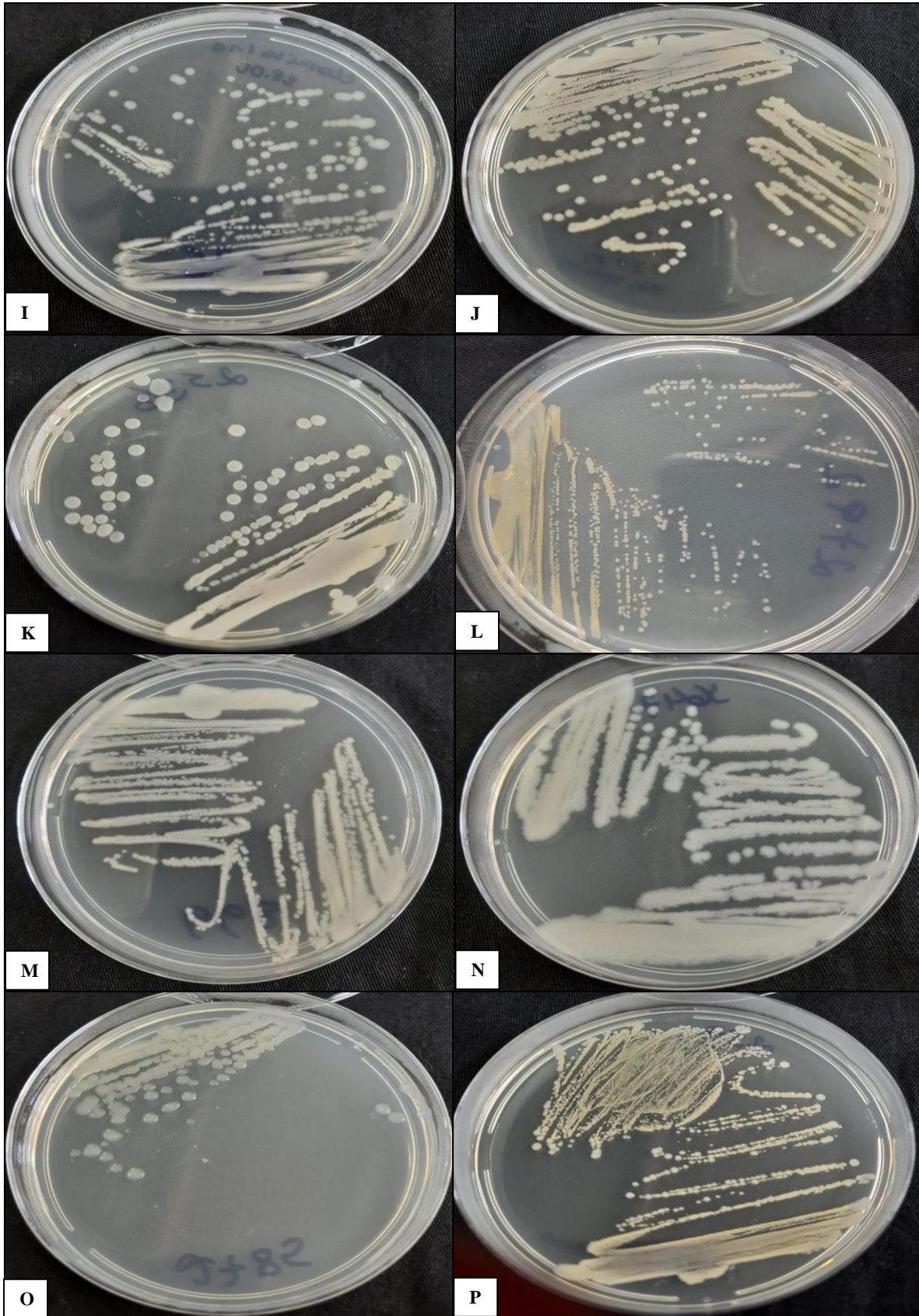


Figura 20. *Primer Bacillus amyloliquefaciens*. **A** – Gráfico de Amplificação; **B** – Curva Padrão; **C**- Curva de *Melting*.

APÊNDICE II – CAPÍTULO 3





Figuras 1. Morfologia das colônias das estirpes pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Priestia* em meio de cultura Embrapa-ágar incubadas a 30 °C por 48 h. A –

B. amyloliquefaciens (S2788); **B** - *B. cereus* (S0953); **C** - *Lysinibacillus sphaericus* (S0002);
D - *B. pumilus* (S2795); **E** - *B. licheniformis* (S2777); **F** - *B. mycoides* (S2786); **G** - *Priestia
megaterium* (S1338); **H** - *Ly. capsici* (S2894); **I** - *B. subtilis* (S2896); **J** - *B. tropicus* (S0043);
K - *B. amyloliquefaciens* (S2536); **L** - *B. atrophaeus* (S2792); **M** - *B. cereus* (S0663); **N** -
B. toyonensis (S1647); **O** - *B. amyloliquefaciens* (S2785); **P** - *P. aryabhatai* (S2538).

APÊNDICE III – CAPÍTULO 4

Tabela 1. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0002 – *Lysinibacillus sphaericus*.

Agentes antimicrobianos	Cepa S0002	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	-	+
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	300 µg/mL	-
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 2. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0127 - *Lysinibacillus sphaericus*.

Agentes antimicrobianos	Cepa S0127	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	-	+
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	300 µg/mL	-
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 3. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2894 - *Lysinibacillus capsici*.

Agentes antimicrobianos	Cepa S2894	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	-	+
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 4. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0167 – *Bacillus cereus*

Agentes antimicrobianos	Cepa S0167	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	150 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 5. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0663 – *Bacillus cereus*.

Agentes antimicrobianos	Cepa S0663	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	250 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	110 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	30 µg/mL	-
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	70 µg/mL	-
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 6. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0953 – *Bacillus cereus*.

Agentes antimicrobianos	Cepa S0953	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 7. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0615 – *Bacillus thuringiensis* sotto

Agentes antimicrobianos	Cepa S0615	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	150 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	150 µg/mL	-
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 8. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1450 – *Bacillus thuringiensis kurstaki*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1450	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	30 µg/mL	-
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	70 µg/mL	-
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 9. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1576 – *Bacillus thuringiensis azawai*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1576	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	70 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 10. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1989 – *Bacillus thuringiensis israelensis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1989	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	70 µg/mL	-
Cefazolina	70 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 11. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2782 – *Bacillus thuringiensis israelensis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2782	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	150 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	150 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 12. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2566 – *Bacillus thuringiensis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2566	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	200 µg/mL	-
Cefazolina	70 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	300 µg/mL	-
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	70 µg/mL	-
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	70 µg/mL	-
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 13. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S0043 – *Bacillus tropicus*

Agentes antimicrobianos	Cepa S0043	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	150 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	110 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 14. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1624 – *Bacillus luti*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1624	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	70 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	30 µg/mL	-
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 15. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1647 – *Bacillus toyonensis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1647	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	300 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	30 µg/mL	-
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	110 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 16. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2781 – *Bacillus paranthracis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2781	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	110 µg/mL	-
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	150 µg/mL	-
Polimixina B	300 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 17. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2786 – *Bacillus mycoides*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2786	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	30 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	30 µg/mL	-
Cloxacilina Monohidratada	300 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 18. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2536 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2536	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	150 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	30 µg/mL	-
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	30 µg/mL	-
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	30 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 19. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2784 –*Bacillus amyloliquefaciens*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2784	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	30 µg/mL	-
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 20. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2785 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2785	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	30 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	30 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 21. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2788 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2788	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 22. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2791 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2791	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	30 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	70 µg/mL	-
Oxacilina	-	+
Penicilina	30 µg/mL	-
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 23. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2776 – *Bacillus subtilis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2776	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	110 µg/mL	-
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	70 µg/mL	-
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 24. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2790 – *Bacillus subtilis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2790	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	30 µg/mL	-
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	30 µg/mL	-
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	30 µg/mL	-
Oxacilina	-	+
Penicilina	30 µg/mL	-
Polimixina B	-	+
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	-	+
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 25. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2794 – *Bacillus subtilis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2794	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	30 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	70 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 26. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2896 – *Bacillus subtilis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2896	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	30 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	30 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	70 µg/mL	-
Penicilina	110 µg/mL	-
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	30 µg/mL	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 27. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2796 – *Bacillus subtilis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2796	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	30 µg/mL	-
Penicilina	110 µg/mL	-
Polimixina B	-	+
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	-	+
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 28. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2777 – *Bacillus licheniformis*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2777	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	30 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	70 µg/mL	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	30 µg/mL	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	300 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 29. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2783 – *Bacillus pumilus*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2783	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	70 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	110 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	110 µg/mL	-
Penicilina	110 µg/mL	-
Polimixina B	-	+
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	30 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 30. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2795 – *Bacillus pumilus*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2795	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	30 µg/mL	-
Oxacilina	-	+
Penicilina	-	+
Polimixina B	30 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	150 µg/mL	-
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 31. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2787 –*B. amyloliquefaciens*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2787	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	110 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	30 µg/mL	-
Oxacilina	-	+
Penicilina	200 µg/mL	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 32. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2893 – *Bacillus spizizenii*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2893	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	30 µg/mL	-
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	70 µg/mL	-
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	200 µg/mL	-
Cloxacilina Monohidratada	150 µg/mL	-
Eritromicina	30 µg/mL	-
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	70 µg/mL	-
Oxacilina	300 µg/mL	-
Penicilina	250 µg/mL	-
Polimixina B	-	+
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	-	+
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	150 µg/mL	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 33. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S2538 – *Priestia aryabhatai*

Agentes antimicrobianos	Cepa S2538	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	30 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	70 µg/mL	-
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	70 µg/mL	-
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	-	+
Penicilina	30 µg/mL	-
Polimixina B	-	+
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 34. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1338 – *Priestia megaterium*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1338	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	70 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	70 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	30 µg/mL	-
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	70 µg/mL	-
Oxacilina	110 µg/mL	-
Penicilina	-	+
Polimixina B	-	+
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	30 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 35. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1431 – *Brevibacillus laterosporus*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1431	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	30 µg/mL	-
Azitromicina	-	+
Cefazolina	110 µg/mL	-
Ceftriaxona	30 µg/mL	-
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	30 µg/mL	-
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	110 µg/mL	-
Eritromicina	-	+
Canamicina	150 µg/mL 48h	+
Levofloxacino	-	-
Lincomicina	-	-
Oxacilina	200 µg/mL	-
Penicilina	110 µg/mL	-
Polimixina B	200 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	70 µg/mL	-
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 36. Perfil de resistência antimicrobiana da cepa S1438 – *Brevibacillus laterosporus*

Agentes antimicrobianos	Cepa S1438	
	Resistente	Suscetível
Amicacina	-	+
Ampicilina	-	+
Azitromicina	-	+
Cefazolina	-	+
Ceftriaxona	-	+
Cloranfenicol	-	+
Clortetraciclina	-	+
Claritromicina	-	+
Clindamicina	-	+
Cotrimoxazol	-	+
Cloxacilina Monohidratada	-	+
Eritromicina	-	+
Canamicina	-	+
Levofloxacino	-	+
Lincomicina	-	+
Oxacilina	30 µg/mL	+
Penicilina	-	-
Polimixina B	110 µg/mL	-
Rifampicina	-	+
Estreptomicina	-	+
Sulfametoxazol	-	+
Tetraciclina	-	+
Vancomicina	-	+

+ = positivo; - = negativo

APÊNDICE IV – CAPÍTULO 5
LAUDOS DE IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS POR MALDI-BIOTYPER

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S0167 – *Bacillus cereus*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim qPCR

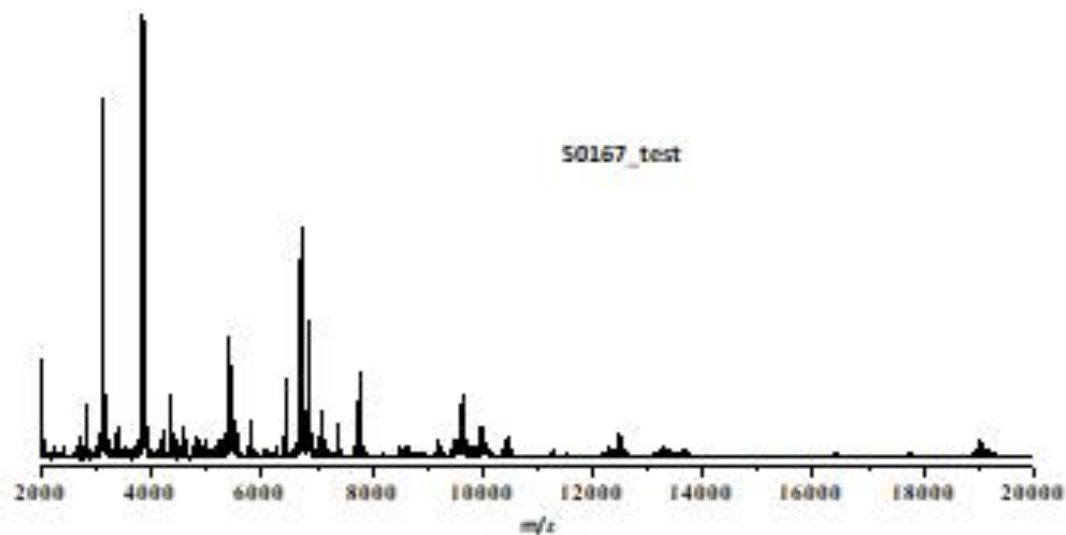


Figura 2 Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Código do isolado_ S0167			Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S0167_cultivo 1			S0167_cultivo 2			S0167_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,38 •	1	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,18 •	1	S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,18 •
	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,32 •		S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	1,92 •		S0167 – <i>B. cereus</i>	2,14 •
	S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	2,09 •		--	--		S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	2,08 •
	S1450 – <i>B. thuringiensis</i>	1,85 •		S0043 – <i>B. tropicus</i>	1,72 •		S2566 – <i>B. thuringiensis</i>	1,77 •
2	S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,31 •	2	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,17 •	2	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,28 •
	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,28 •		S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	2,07 •		S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,22 •
	S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	2,06 •		S0043 – <i>B. tropicus</i>	1,79 •		S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	2,06 •
	S1450 – <i>B. thuringiensis</i>	2,01 •		S1576 – <i>B. thuringiensis</i>	1,73 •		S1450 – <i>B. thuringiensis</i>	2,01 •
3	S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,40 •	3	S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,56 •	3	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,17 •
	S0167 – <i>B. cereus</i>	2,31 •		S0167 – <i>B. cereus</i>	2,07 •		S0043 – <i>B. tropicus</i>	2,12 •
	S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	2,14 •		S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	1,79 •		S1450 – <i>B. thuringiensis</i>	2,01 •
	S1450 – <i>B. thuringiensis</i>	2,04 •		S1450 – <i>B. thuringiensis</i>	1,72 •		S1989 – <i>B. thuringiensis</i>	1,98 •
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Parcialmente Identificado			Nível de identificação: Gênero – Grupo Filogenético			Identificação_ <i>Bacillus cereus sensu lato</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S0002 – *Lysinibacillus sphaericus*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim qPCR

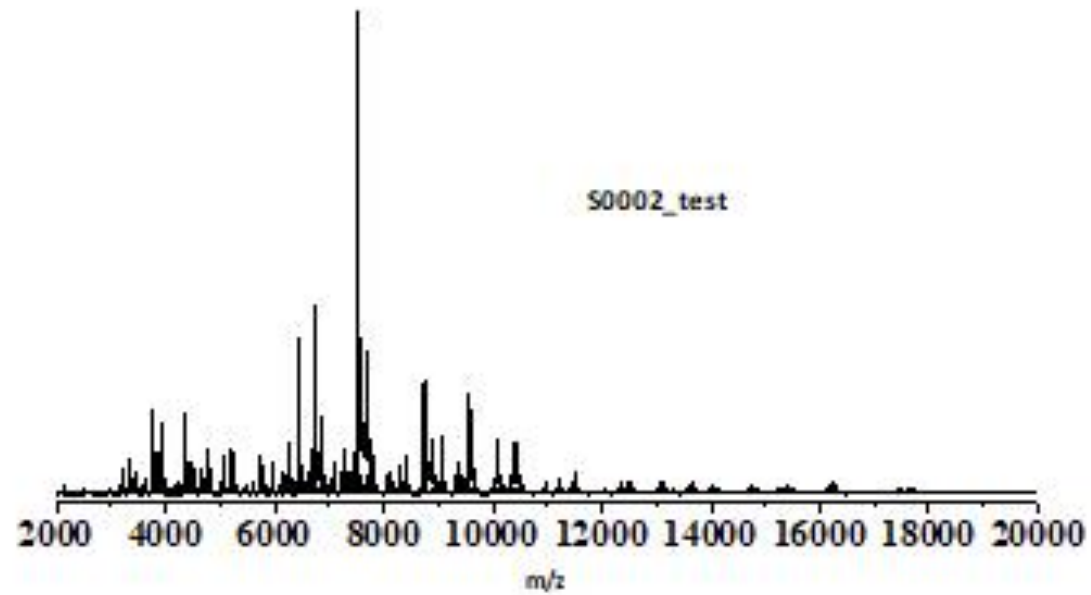


Figura 2. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Código do isolado_ S0002			Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S0002_cultivo 1			S0002_cultivo 2			S0002_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,60 •	1	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,38 •	1	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,43 •
	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,20 •		--	--		--	
	--	--		--	--		<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	1,81 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,49 •	2	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,60 •	2	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,37 •
	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,48 •		--	--		--	
	--	--		--	--		<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,00 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,63 •	3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,48 •	3	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,32 •
	--	--		--	--		<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,28 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Lysinibacillus sphaericus</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S0127 – *Lysinibacillus sphaericus*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim qPCR

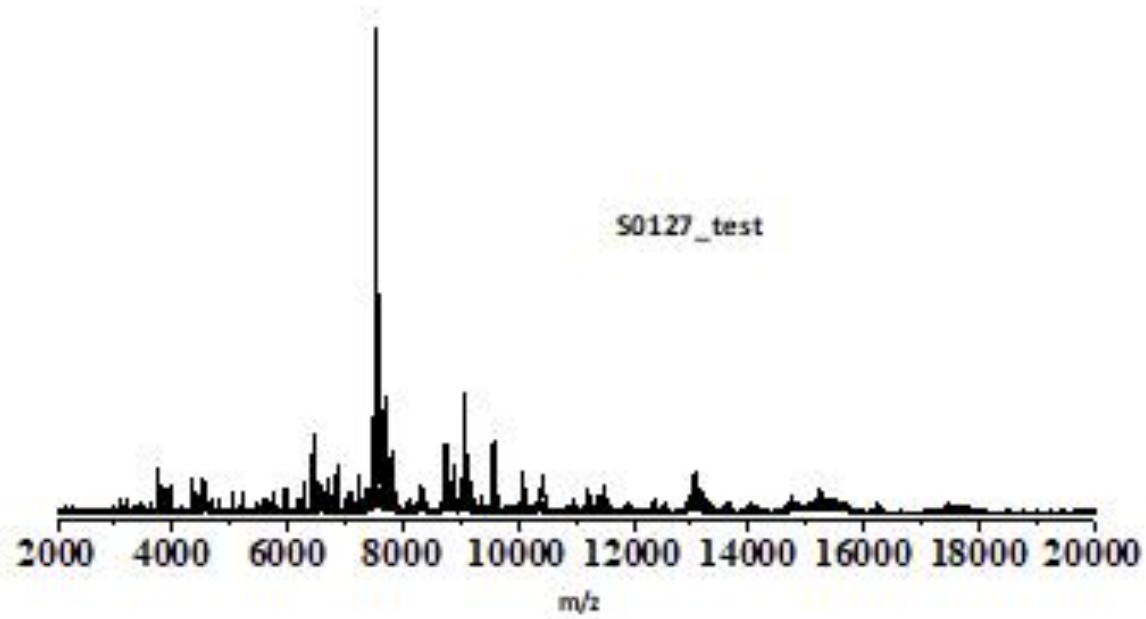


Figura 3. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Código do isolado_ S0002			Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S0127_cultivo 1			S0127_cultivo 2			S0127_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,58 •	1	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,38 •	1	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,14 •
	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,47 •		<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	1,90 •		<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,00 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,46 •	2	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,56 •	2	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	1,93 •
	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,34 •		<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,48 •		<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	1,77 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,52 •	3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,60 •	3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	1,98 •
	<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	2,42 •		--	--		<i>S0127 – Ly. sphaericus</i>	1,77 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: _ Espécie			Identificação: _ <i>Lysinibacillus sphaericus</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1338 – *Priestia megaterium*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim qPCR

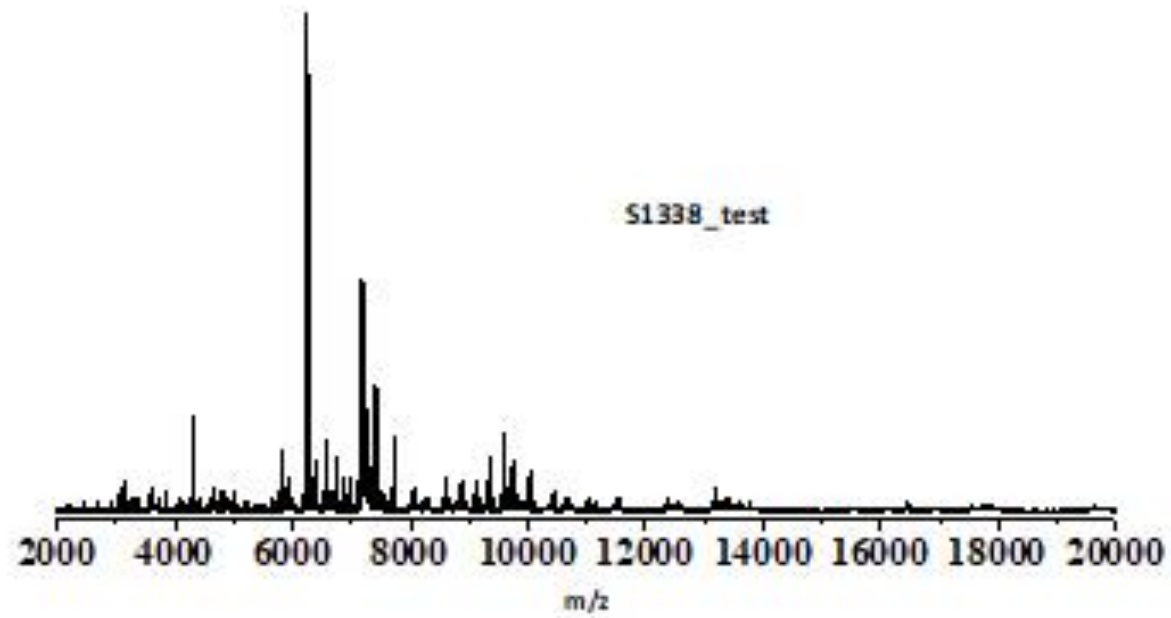


Figura 4. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Código do isolado_ S1338			Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S1338_cultivo 1			S1338_cultivo 2			S1338_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,59 •	1	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,38 •	1	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,64 •
	<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	2,12 •		<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	1,71 •		<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	1,99 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,65 •	2	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,19 •	2	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,46 •
	<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	2,18 •		<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	1,54 •		<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	1,79 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,65 •	3	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,69 •	3	<i>S1338 – P. megaterium</i>	2,61 •
	<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	2,03 •		<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	2,01 •		<i>S2538 – P. aryabhatai</i>	2,07 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação:_ Espécie			Identificação: <i>Priestia megaterium</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1431 – *Brevibacillus laterosporus*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim qPCR

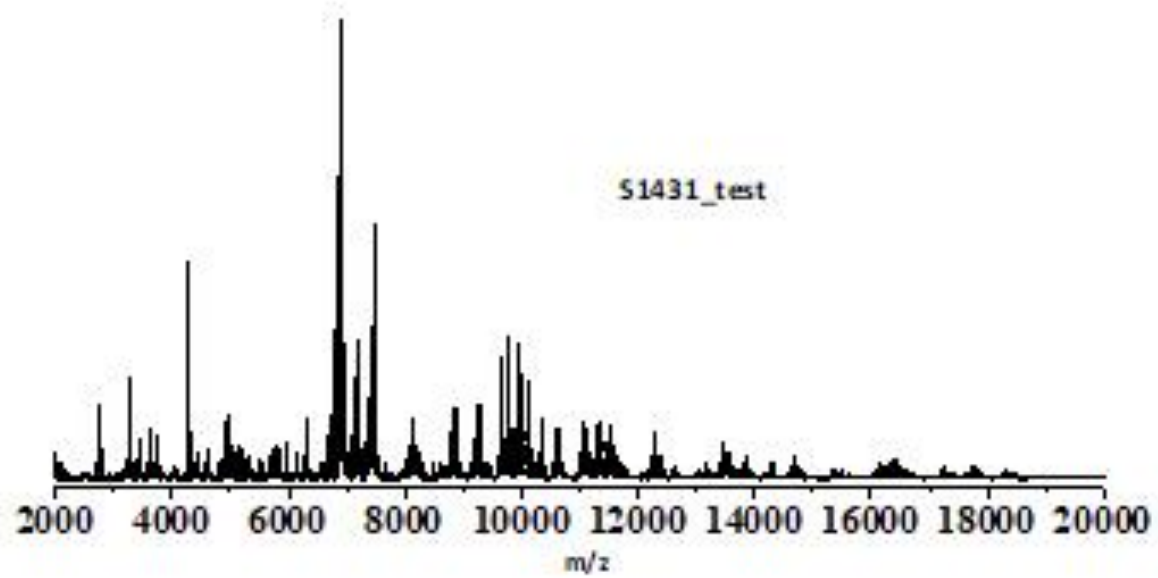


Figura 5. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Código do isolado_ S1431			Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S1431_cultivo 1			S1431_cultivo 2			S1431_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,58 •	1	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,99 •	1	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,74 •
	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,18 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,81 •	2	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,94 •	2	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,86 •
	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,15 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	2,14 •	3	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	2,24 •	3	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,90 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Parcialmente Identificado			Nível de identificação: Gênero			Identificação: <i>Brevibacillus sp.</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1438 – *Brevibacillus laterosporus*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim

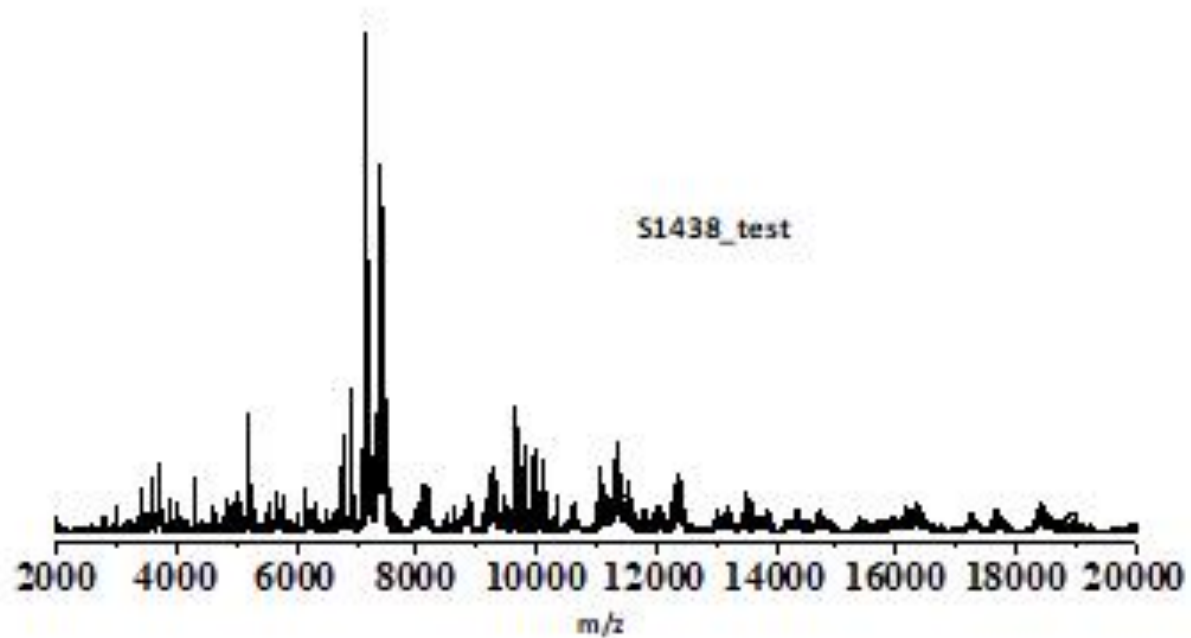


Figura 6. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper									
Código do isolado_ S1438			Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S1438_cultivo 1			S1438_cultivo 2			S1438_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,28 •	1	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,48 •	1	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,09 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,36 •	2	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,49 •	2	--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	<i>S1431 – Brev. laterosporus</i>	1,44 •	3	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,35 •	3	--	--	
	<i>S1438 – Brev. laterosporus</i>	1,17 •		--	--		--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper									
Estado da identificação do isolado: Não Identificado			Nível de identificação: --			Identificação: --			

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1450 – *Bacillus thuringiensis kurstaki*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim qPCR

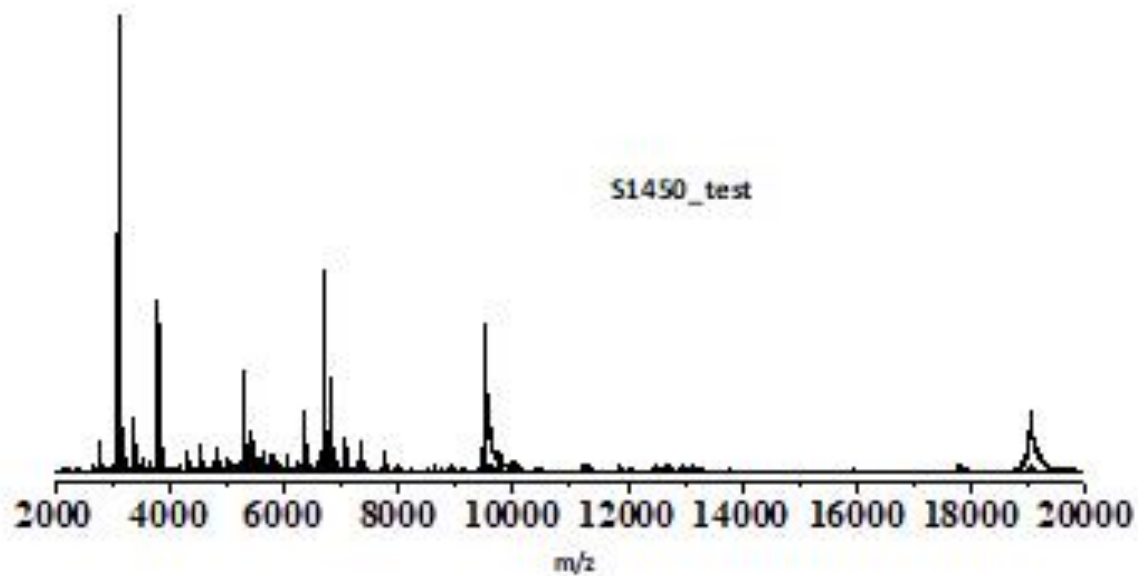


Figura 7. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Código do isolado_ S1450		Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S1450_cultivo 1			S1450_cultivo 2			S1450_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,59 •	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,40 •	1	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,04 •
	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,43 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,04 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,00 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,36 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,01 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,00 •
	--	--		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,99 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,99 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,22 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,21 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,91 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,07 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,07 •
	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	1,66 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,74 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,99 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,00 •	3	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,49 •	3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,99 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,90 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,12 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,75 •
	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	1,71 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,09 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>B. thuringiensis</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1576 – *Bacillus thuringiensis azawai*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim qPCR

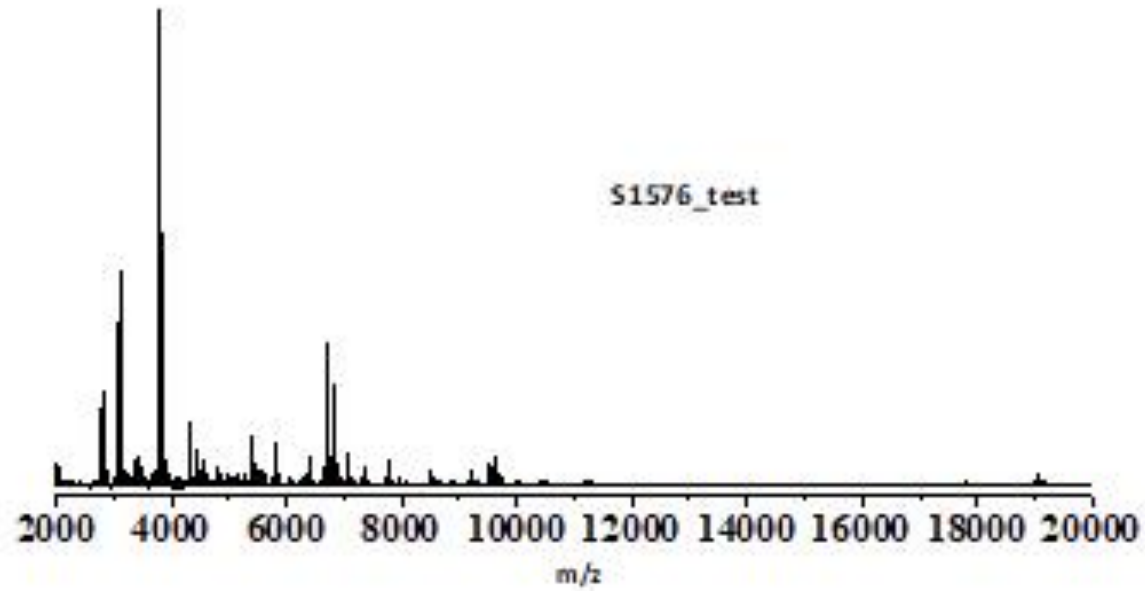


Figura 8. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado_ S1576		Método de processamento dos espectros_ Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S1576_cultivo 1			S1576_cultivo 2			S1576_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,07 •	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,09 •	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,96 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,99 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,93 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,82 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,95 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,93 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,80 •
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,49 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,04 •	2	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,90 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,06 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,85 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,89 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,99 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,85 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,81 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,97 •		--	--		--	--
3	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,11 •	3	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,50 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,89 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,00 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,17 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,81 •
	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,96 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,07 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,80 •
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Gênero – Grupo Filogenético		Identificação: <i>Bacillus cereus sensu lato</i>			

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1624 – *Bacillus luti*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

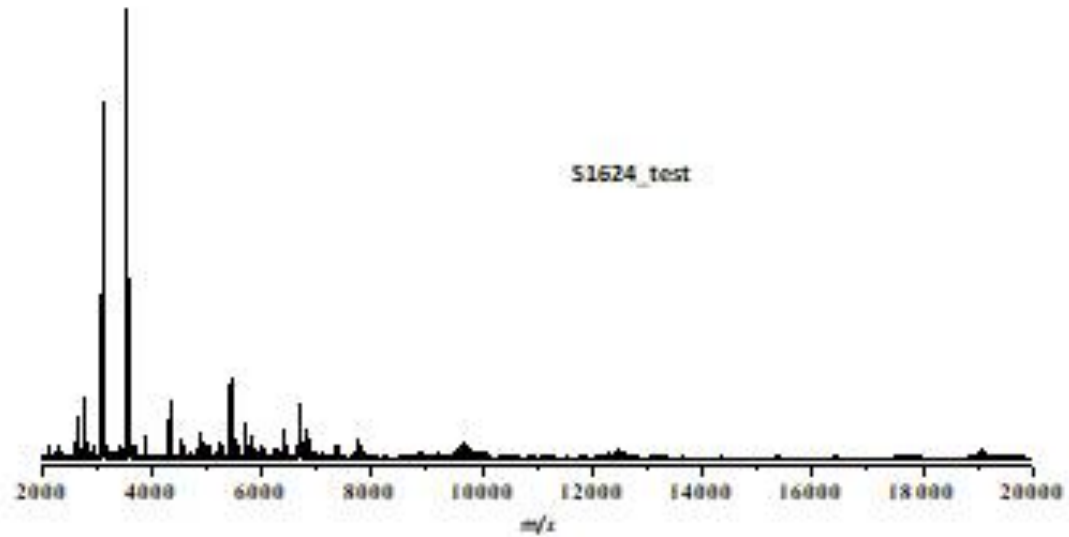


Figura 9. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S1624		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S1624_cultivo 1			S1624_cultivo 2			S1624_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,75 •	1	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,84 •	1	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,71 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,75 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,75 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,66 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,72 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,68 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,66 •
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,84 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,63 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,74 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,74 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,62 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,72 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,71 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,58 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,58 •
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,84 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,79 •	3	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,82 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,75 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,67 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,80 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,68 •		--	--		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,62 •
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Gênero			Identificação: <i>Bacillus sp.</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1647 – *Bacillus toyonensis*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

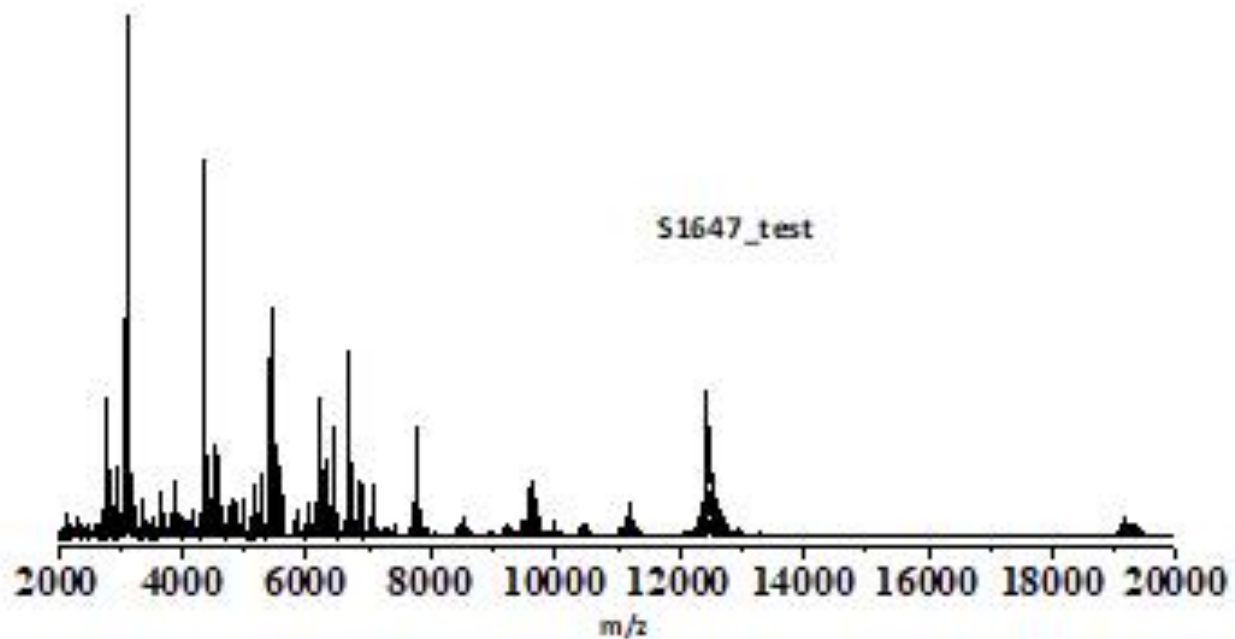


Figura 30. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S1647	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S1647_cultivo 1			S1647_cultivo 2			S1647_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,91 •	1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,72 •	1	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,98 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,69 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,66 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,84 •
	--	--		<i>S0663 – B. cereus</i>	1,63 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,58 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,82 •	2	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,96 •	2	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,99 •
	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,75 •		<i>S0663 – B. cereus</i>	1,93 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,81 •
	--	--		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,81 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,65 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,83 •	3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,78 •	3	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,98 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,70 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,53 •		<i>S2781 – B. paratraxis</i>	1,72 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,52 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Gênero	Identificação: <i>Bacillus sp.</i>
---	---------------------------------------	---

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S1989 – *Bacillus thuringiensis israelensis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

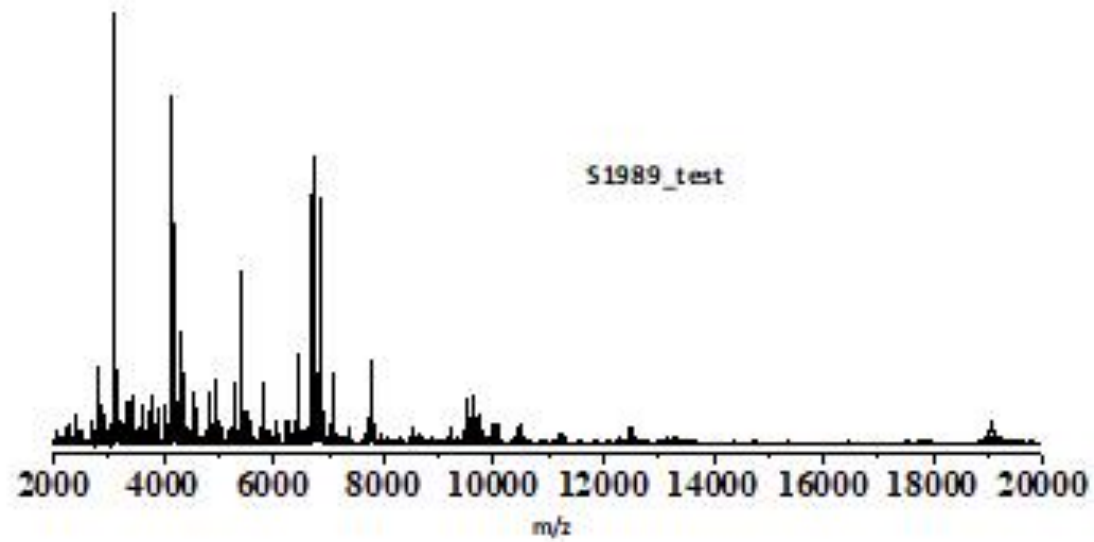


Figura 41. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S1989		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S1989_cultivo 1			S1989_cultivo 2			S1989_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,40 •	1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,27 •	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,13 •
	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,07 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,07 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,02 •
	<i>S0663 – B. cereus</i>	1,82 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,99 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,96 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,59 •	2	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,13 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,07 •
	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,25 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,11 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,06 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,05 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,95 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,02 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,52 •	3	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,18 •	3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,17 •
	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,23 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,17 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,10 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,93 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,12 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,07 •
	--	--		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,10 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,00 •
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus thuringiensis</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2536 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

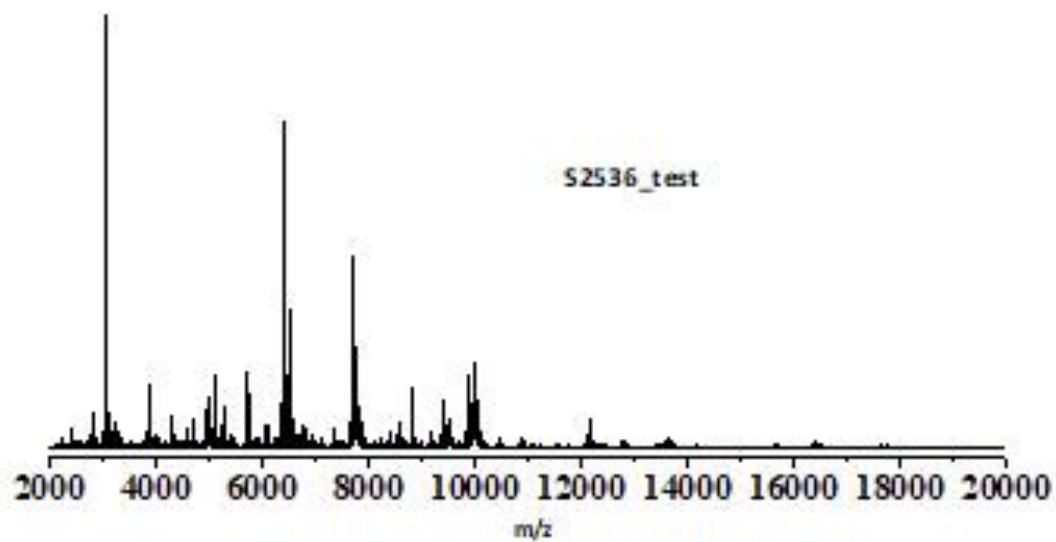


Figura 52. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2536	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2536_cultivo 1			S2536_cultivo 2			S2536_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,96 •	1	S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,99 •	1	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,11 •
	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,83 •		S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,78 •		S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,99 •
	S2536 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,54 •		S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,77 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,91 •	2	S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •	2	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,09 •
	S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,69 •		--	--		S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,04 •
	S2536 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,57 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,81 •	3	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,93 •	3	S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,03 •
	S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,77 •		S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,88 •		--	--
	S2536 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,75 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Gênero – Grupo Filogenético	Identificação: <i>Bacillus subtilis sensu lato</i>
---	--	---

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2538 – *Priestia aryabhatai*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

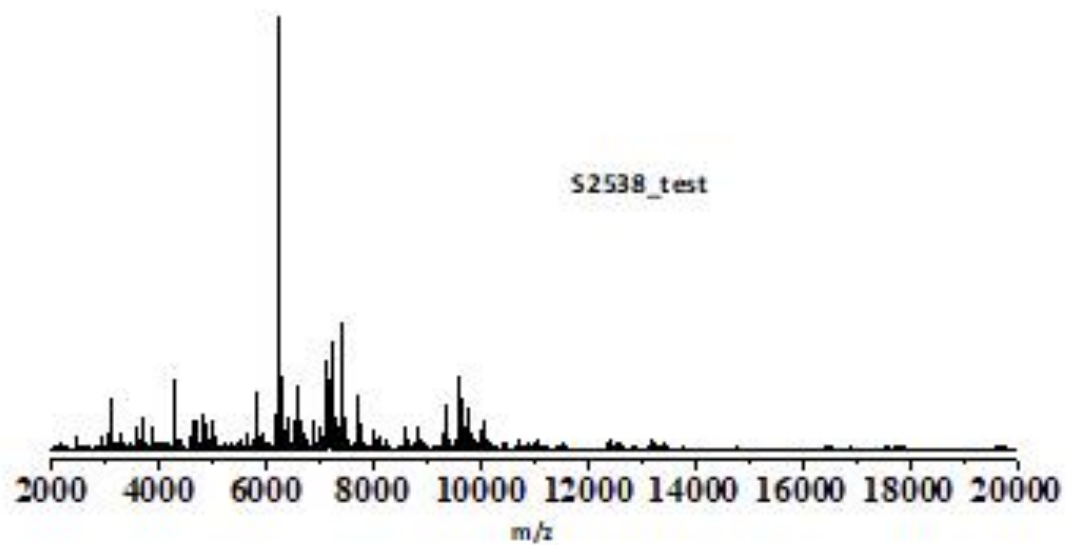


Figura 63. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2538		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S2538_cultivo 1			S2538_cultivo 2			S2538_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	2,21 •	1	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,29 •	1	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,29 •
	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,16 •		<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	1,75 •		<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	1,85 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	2,28 •	2	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,28 •	2	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,28 •
	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,26 •		<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	1,67 •		<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	1,70 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,34 •	3	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,28 •	3	<i>S1338 – B. megaterium</i>	2,21 •
	<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	2,28 •		<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	2,18 •		<i>S2538 – B. aryabhatai</i>	2,02 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>P. megaterium/P. aryabhatai</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2566 – *Bacillus thuringiensis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

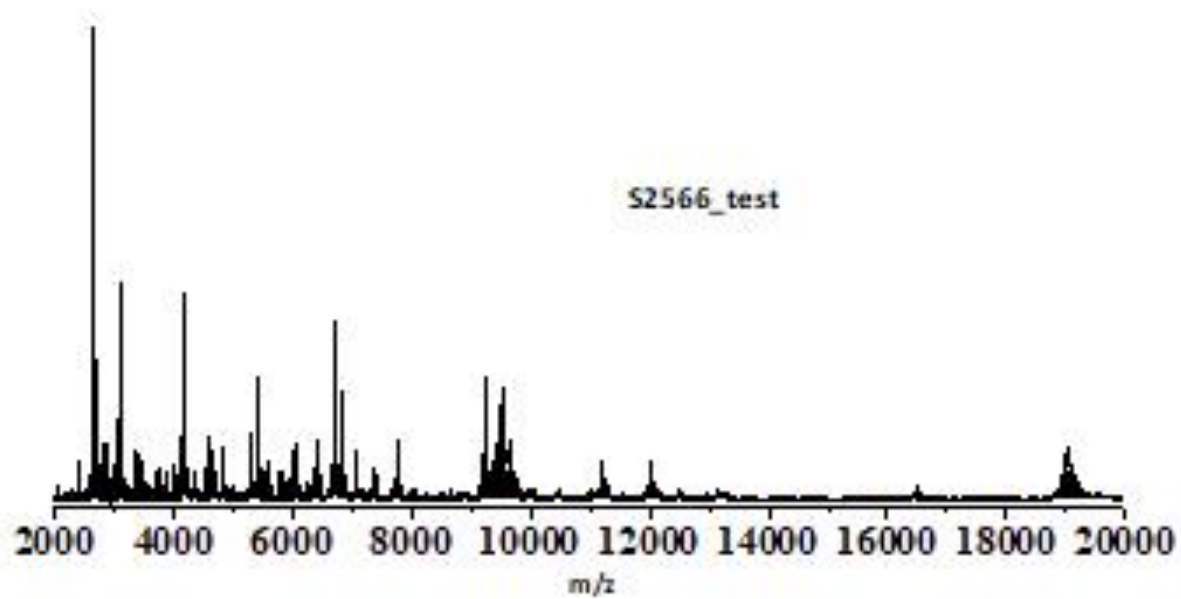


Figura 74. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2566			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2566_cultivo 1			S2566_cultivo 2			S2566_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,34 •	1	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,54 •	1	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,38 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,24 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,09 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,13 •
	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,79 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,03 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,97 •
	--	--		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,83 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,51 •	2	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,43 •	2	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,41 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,19 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,15 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,17 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,08 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,03 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,04 •
	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,91 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,88 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,50 •	3	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,38 •	3	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,36 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,31 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,05 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,04 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,06 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,93 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,97 •
	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,89 •		--	--		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,77 •
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus thuringiensis</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2776 – *Bacillus subtilis*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

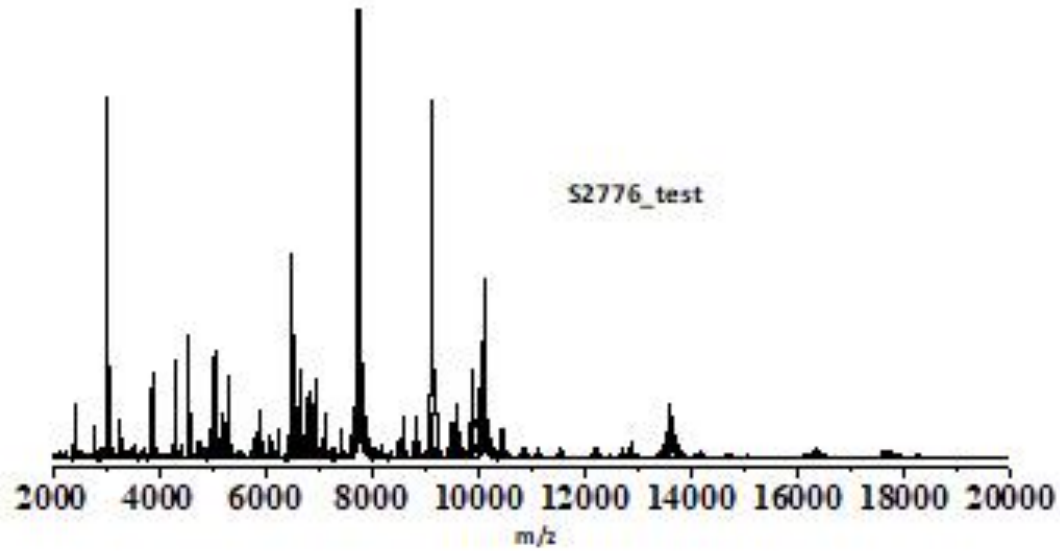


Figura 85. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2776		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S2776_cultivo 1			S2776_cultivo 2			S2776_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,31 •	1	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,46 •	1	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,39 •
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
2	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,41 •	2	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,56 •	2	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,51 •
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
3	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,57 •	3	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,50 •	3	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,34 •
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
	--	--		--	--		--	
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus subtilis</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2777 – *Bacillus licheniformis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

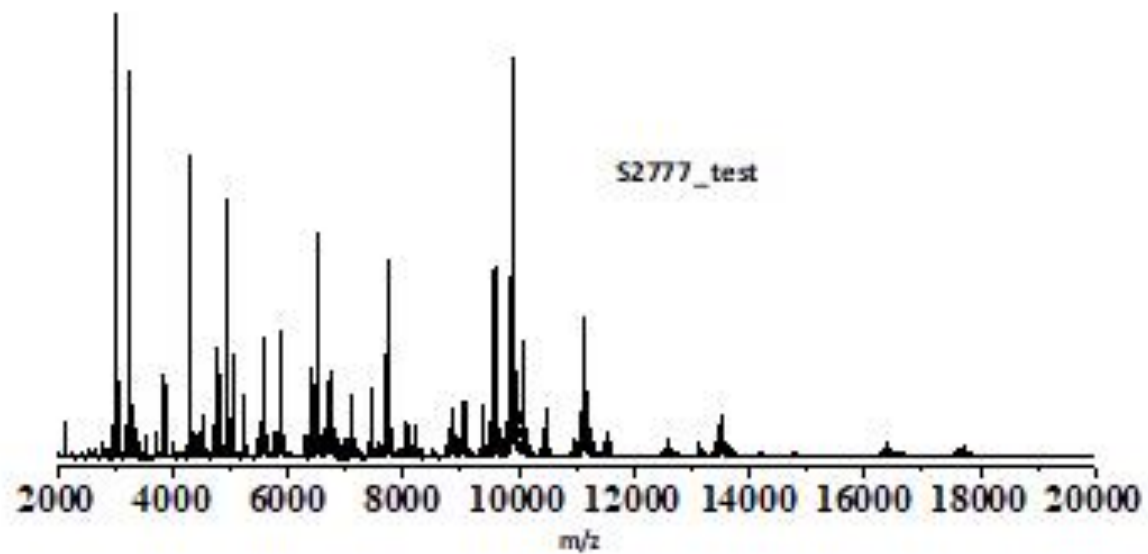


Figura 96. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2777	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2777_cultivo 1			S2777_cultivo 2			S2777_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,51 •	1	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	1,74 •	1	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,03 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,54 •	2	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,60 •	2	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,38 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,54 •	3	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,38 •	3	<i>S2777 – B. licheniformis</i>	2,19 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Espécie	Identificação: <i>Bacillus licheniformis</i>
---	--	---

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2781 – *Bacillus paratrachis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

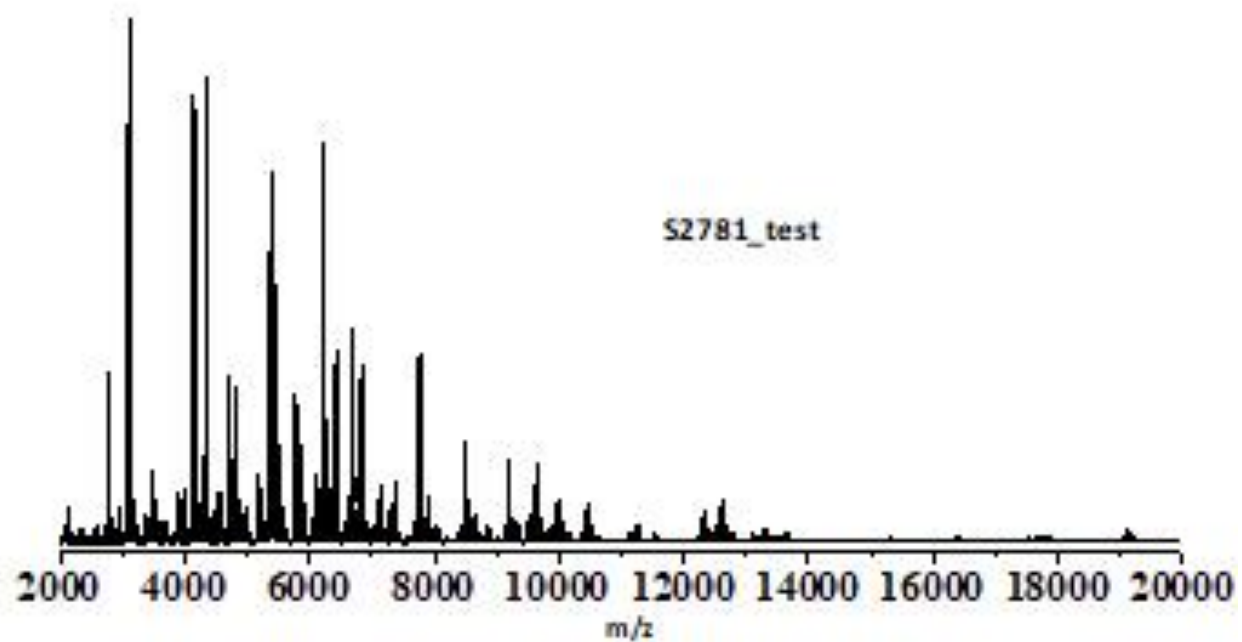


Figura 107. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2781	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2781_cultivo 1			S2781_cultivo 2			S2781_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,36 •	1	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,34 •	1	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,11 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,88 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,05 •		--	--
	--	--		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,93 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,47 •	2	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,24 •	2	--	--
	<i>S0167 – B. cereus</i>	2,02 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	2,07 •		--	--
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,99 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,06 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,44 •	3	<i>S2781 – B. paratraxis</i>	2,24 •	3	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,88 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	2,08 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	2,07 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,83 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,86 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,06 •		<i>S2781 – B. paratraxis</i>	1,80 •
	--	--		--	--		--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Parcialmente Identificado	Nível de identificação: Gênero e Provável Espécie	Identificação: <i>Bacillus paratraxis/Bacillus cereus</i>
--	--	--

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2782 – *Bacillus thuringiensis*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

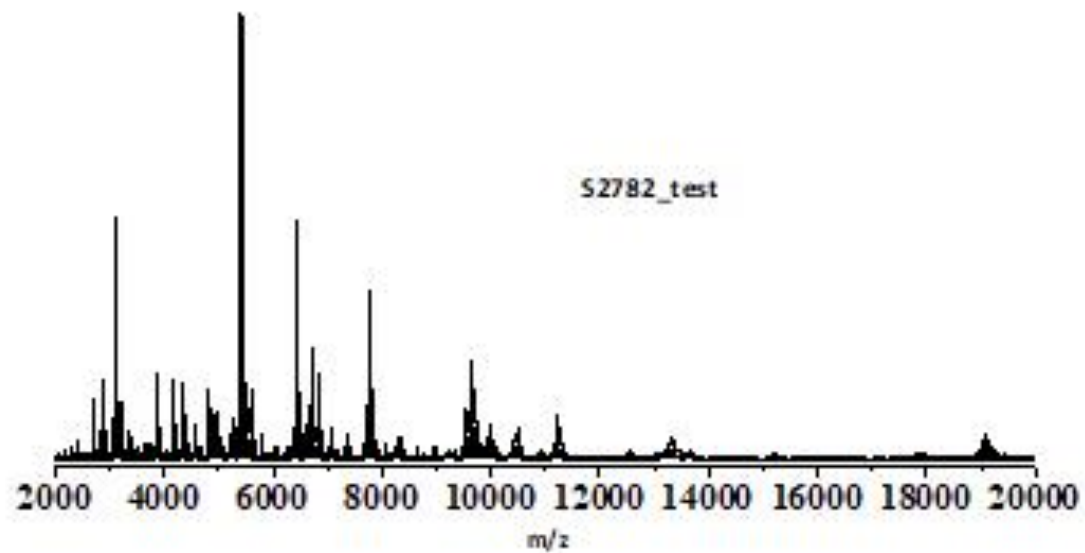


Figura 118. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2782	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2782_cultivo 1			S2782_cultivo 2			S2782_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,19 •	1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,53 •	1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,64 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,09 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,49 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,32 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,05 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,33 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,23 •
	--	--		<i>S0167 – B. cereus</i>	2,13 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,16 •
2	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,09 •	2	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,32 •	2	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,64 •
	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,01 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,06 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,23 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	2,00 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,04 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,11 •
	--	--		--	--		<i>S0167 – B. cereus</i>	2,09 •
3	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,99 •	3	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,50 •	3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,60 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,96 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,00 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,20 •
	--	--		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	1,83 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,13 •
	--	--		--	--		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,08 •

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Gênero – Grupo Filogenético	Identificação: <i>Bacillus cereus sensu lato</i>
---	--	---

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2783 – *Bacillus pumilus*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

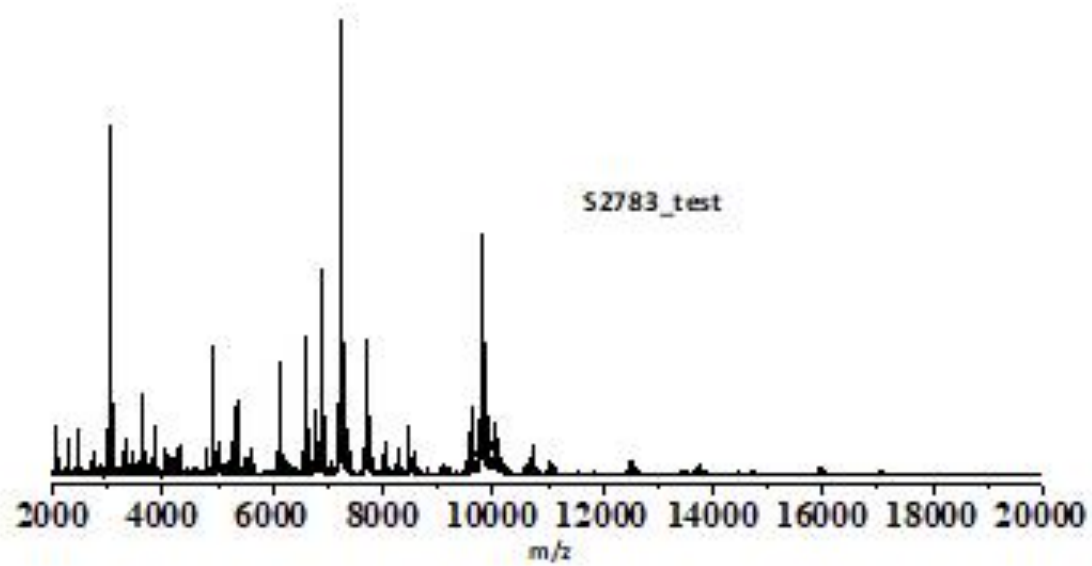


Figura 129. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2783	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2783_cultivo 1			S2783_cultivo 2			S2783_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,39 •	1	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,41 •	1	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,54 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,38 •	2	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,24 •	2	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,46 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,39 •	3	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,24 •	3	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,44 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Espécie	Identificação: <i>Bacillus pumilus</i>
---	--	---

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2784 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

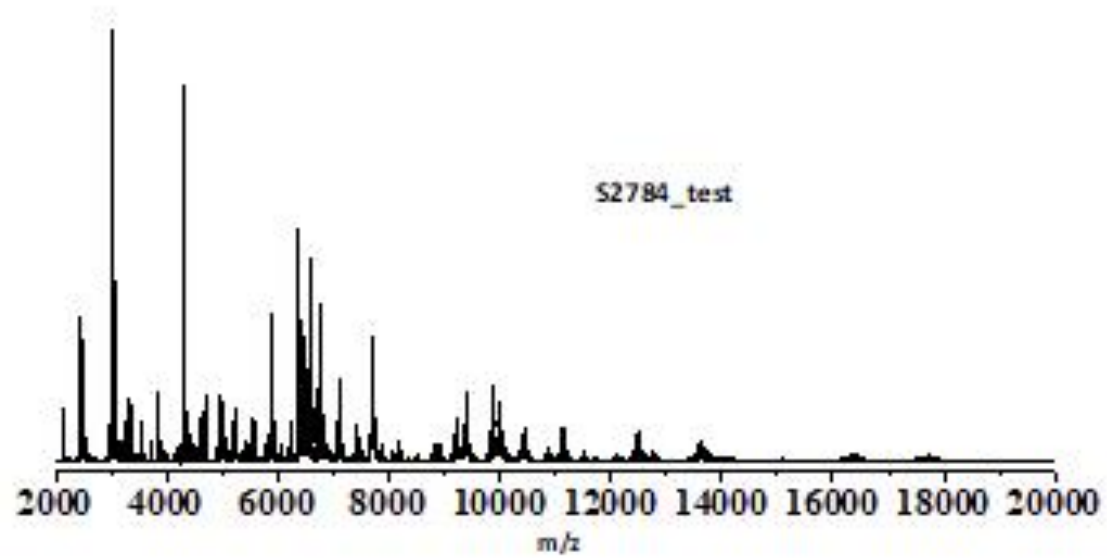


Figura 20. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2784			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BioCtrl modified			Método de comparação dos perfi: Medium Mass Method_BioCtrl modified		
S2784_cultivo 1			S2784_cultivo 2			S2784_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,49 •	1	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,32 •	1	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,34 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,09 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,13 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,05 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,56 •	2	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,27 •	2	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,29 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,14 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,06 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,07 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,43 •	3	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,10 •	3	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,07 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,03 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,93 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,86 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	1,95 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2785 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

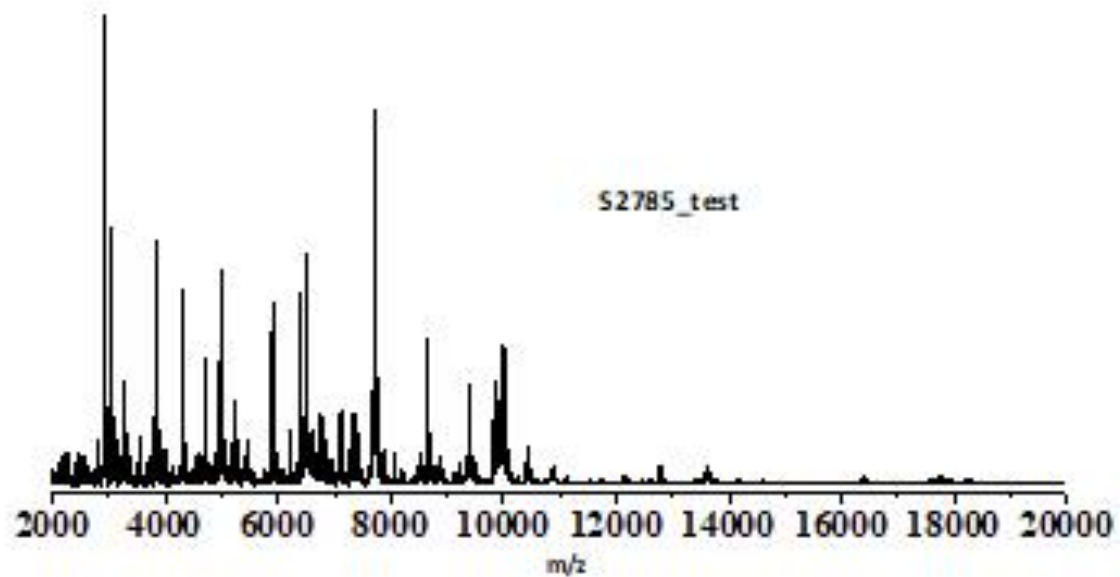


Figura 21. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2785		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S2785_cultivo 1			S2785_cultivo 2			S2785_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,33 •	1	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,46 •	1	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,54 •
	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,04 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,99 •		<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,01 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	1,97 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,34 •	2	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,48 •	2	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,29 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,12 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,14 •		--	--
	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,04 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,36 •	3	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,10 •	3	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,45 •
	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,05 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,14 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,99 •
	<i>S2787 – B. methylotrophicus</i>	1,93 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2786 – *Bacillus mycoides*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

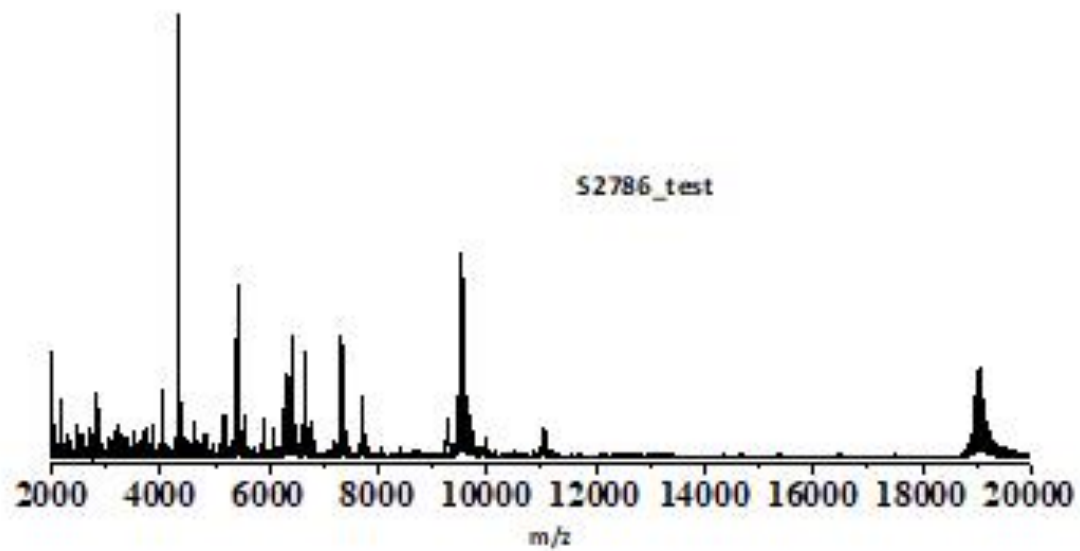


Figura 22. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2786			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2786_cultivo 1			S2786_cultivo 2			S2786_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,39 •	1	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,18 •	1	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,00 •
	<i>MALDI-Biotyper</i>	2,20 •		<i>MALDI-Biotyper</i>	2,08 •		<i>MALDI-Biotyper</i>	2,22 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,01 •	2	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,01 •	2	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,00 •
	<i>MALDI-Biotyper</i>	2,31 •		<i>MALDI-Biotyper</i>	2,35 •		<i>MALDI-Biotyper</i>	2,36 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,01 •	3	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,03 •	3	<i>S2786 – B. mycoides</i>	2,15 •
	<i>MALDI-Biotyper</i>	2,02 •		<i>MALDI-Biotyper</i>	2,12 •		<i>MALDI-Biotyper</i>	2,27 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus mycoides</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2787 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

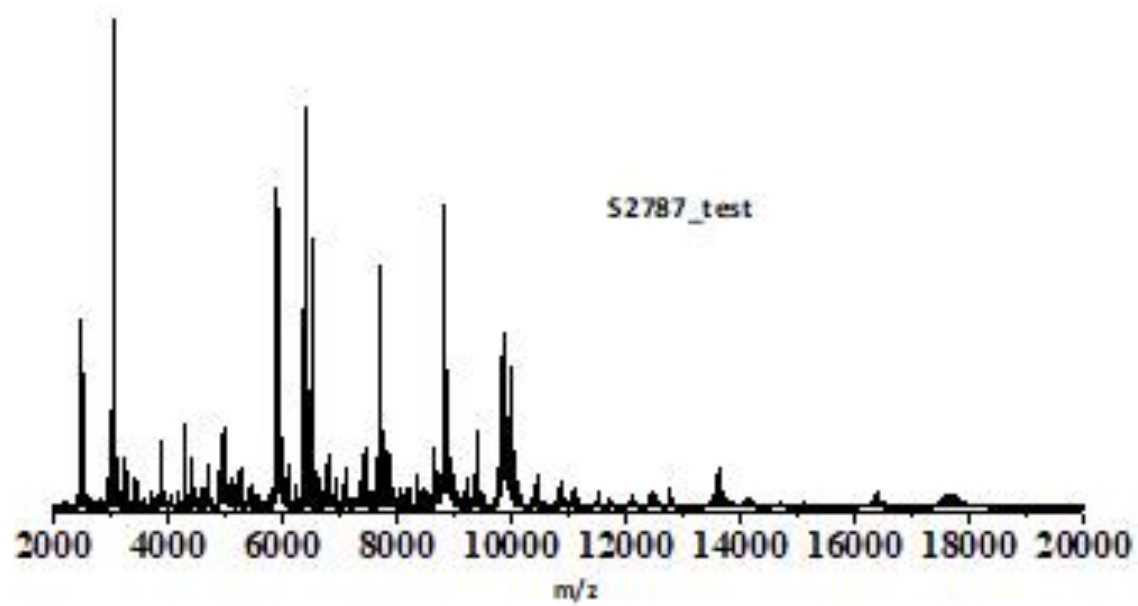


Figura 23. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2787			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2787_cultivo 1			S2787_cultivo 2			S2787_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,19 •	1	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,39 •	1	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,81 •
	S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,89 •		S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,18 •		S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,72 •
	--	--		S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,18 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	S2787 – <i>B. m amyloliquefaciens</i>	2,52 •	2	S2787 – <i>B. methylophycus</i>	2,32 •	2	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,08 •
	S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,36 •		S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,30 •		S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,00 •
	S2536 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •		S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,07 •		--	--
	--	--		S2536 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,39 •	3	S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,35 •	3	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •
	S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,32 •		S2788 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,21 •		S2787 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	1,99 •
	S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,08 •		S2791 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,12 •		--	--
	--	--		S2785 – <i>B. amyloliquefaciens</i>	2,01 •		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2788 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

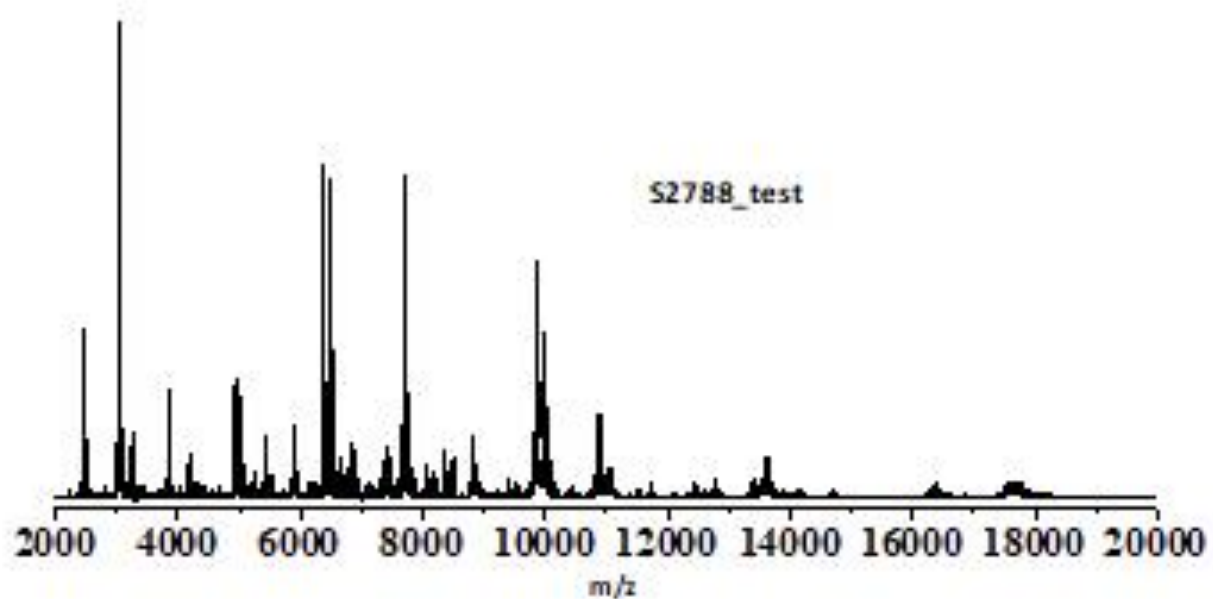


Figura 24. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2788			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2788_cultivo 1			S2788_cultivo 2			S2788_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	2,14 •	1	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,15 •	1	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	2,01 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,76 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	2,03 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,80 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	2,14 •	2	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,05 •	2	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,18 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,93 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	2,01 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,99 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	2,14 •	3	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,94 •	3	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,79 •
	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,97 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,72 •		<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	1,76 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado	
Código do isolado: S2790 – <i>Bacillus subtilis</i>	
Consta sequenciamento genômico: Não	Identificação prévia: Sim - qPCR

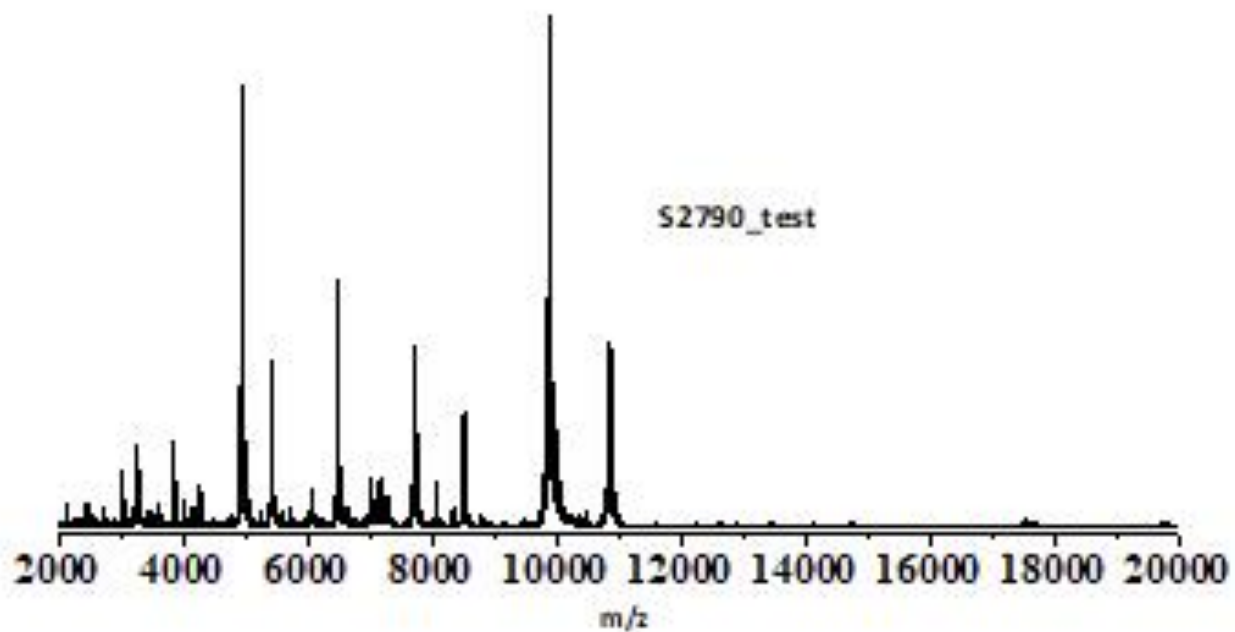


Figura 25. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2790			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2790_cultivo 1			S2790_cultivo 2			S2790_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,16 •	1	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,12 •	1	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,61 •
	<i>S2790 – B. subtilis</i>	1,16 •		--	--		<i>S2790 – B. subtilis</i>	1,15 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,60 •	2	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,48 •	2	<i>S2790 – B. subtilis</i>	1,67 •
	--	--		<i>S2790 – B. subtilis</i>	1,09 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,01 •	3	<i>S2796 – B. subtilis</i>	1,34 •	3	<i>S2790 – B. subtilis</i>	1,15 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Não Identificado			Nível de identificação: --			Identificação: --		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2791 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

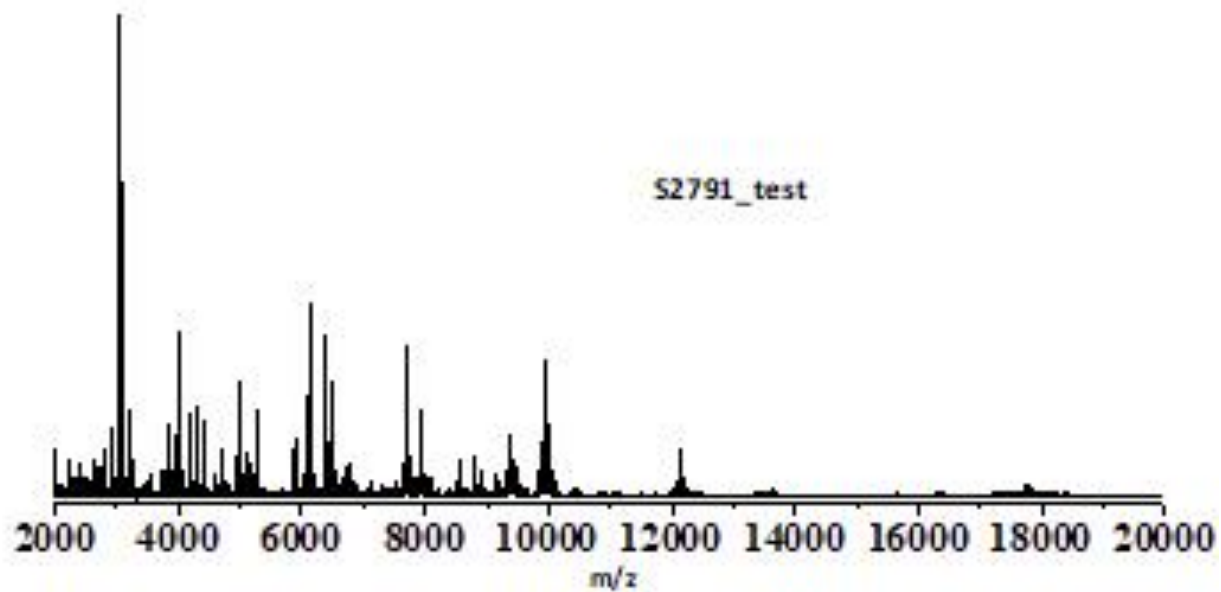


Figura 26. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2791		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S2791_cultivo 1			S2791_cultivo 2			S2791_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,37 •	1	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,44 •	1	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,25 •
	<i>S2787 – B. methylotrophycus</i>	2,11 •		<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,08 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,00 •
	<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	2,00 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,92 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,81 •
	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,97 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,92 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,44 •	2	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,27 •	2	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,04 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,08 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,96 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,90 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,01 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,91 •		--	--
	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,98 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,45 •	3	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,42 •	3	<i>S2536 – B. amyloliquefaciens</i>	2,10 •
	<i>S2787 – B. amyloliquefaciens</i>	2,02 •		<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,86 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,96 •
	<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	2,01 •		<i>S2785 – B. amyloliquefaciens</i>	1,86 •		--	--
	<i>S2791 – B. amyloliquefaciens</i>	1,89 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>B. amyloliquefaciens</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2792 – *Bacillus atropaeus*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

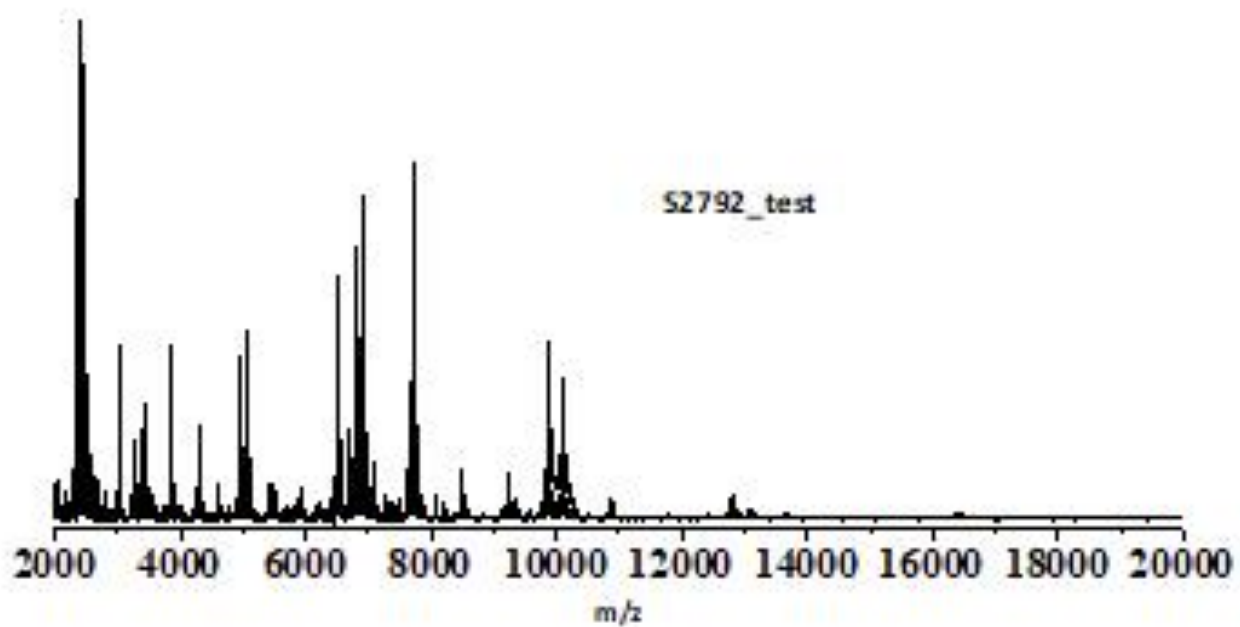


Figura 27. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2792	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2792_cultivo 1			S2792_cultivo 2			S2792_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	--	--	1	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	2,04 •	1	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	1,97 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	2,44 •	2	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	2,00 •	2	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	2,02 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	2,07 •	3	--	--	3	<i>S2792 – B. atrophaeus</i>	1,97 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado Parcialmente	Nível de identificação: Espécie	Identificação: <i>Bacillus atrophaeus</i>
---	--	--

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2794 – *Bacillus subtilis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

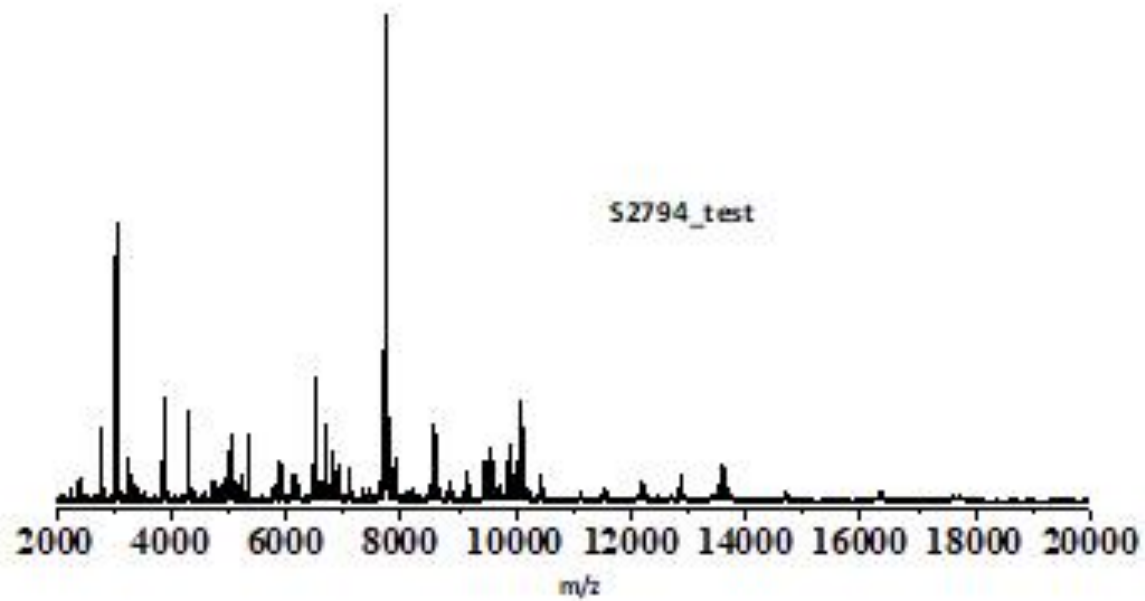


Figura 28. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2794	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2794_cultivo 1			S2794_cultivo 2			S2794_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,47 •	1	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,34 •	1	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,39 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,57 •	2	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,51 •	2	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,47 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,36 •	3	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,35 •	3	<i>S2794 – B. subtilis</i>	2,45 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Espécie	Identificação: <i>Bacillus subtilis</i>
---	--	--

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2795 – *Bacillus pumilus*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

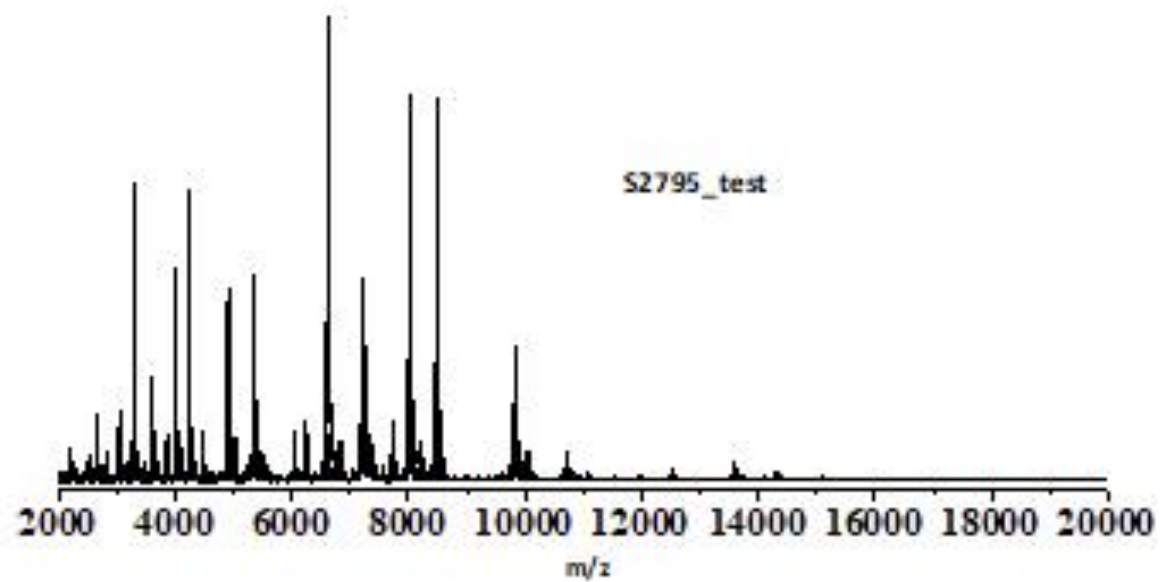


Figura 29. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2795	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2795_cultivo 1			S2795_cultivo 2			S2795_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	--	--	1	--	--	1	--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	--	--	2	--	--	2	--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	--	--	3	--	--	3	<i>S2783 – B. pumilus</i>	2,24 •	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Não Identificado	Nível de identificação: --	Identificação: --
---	-----------------------------------	--------------------------

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2796 – *Bacillus subtilis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

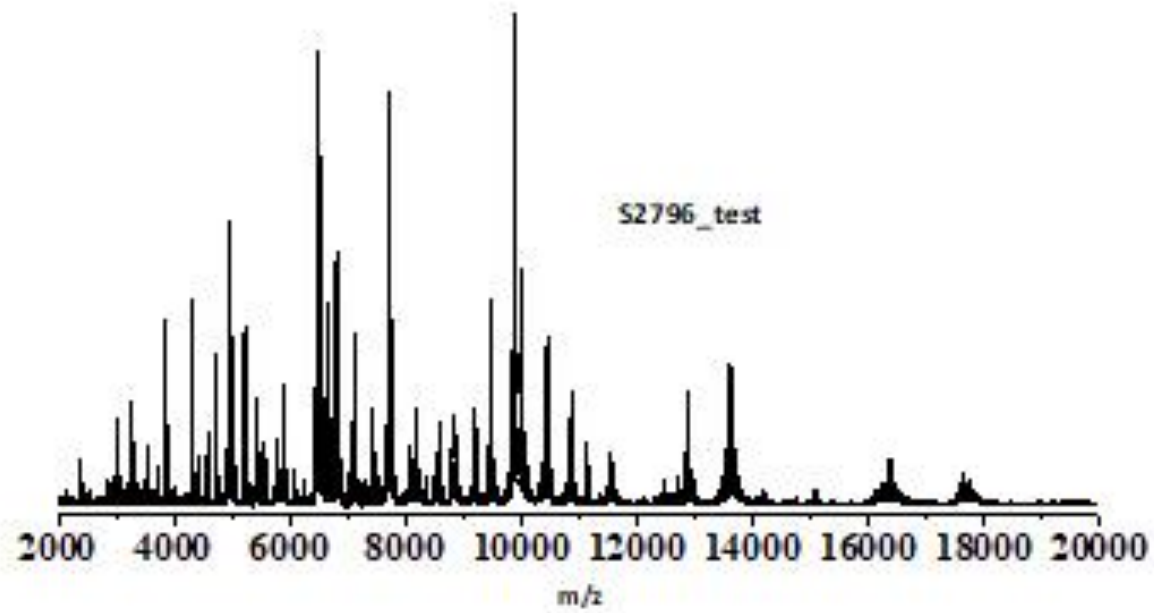


Figura 30. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2796		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S2796_cultivo 1			S2796_cultivo 2			S2796_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,49 •	1	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,19 •	1	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,43 •
	<i>S2794 – B. subtilis</i>	1,71 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,68 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,44 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,34 •	2	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,37 •	2	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,37 •
	<i>S2794 – B. subtilis</i>	1,74 •		<i>S2794 – B. subtilis</i>	1,69 •		<i>S2794 – B. subtilis</i>	1,69 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,19 •	3	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,33 •	3	<i>S2796 – B. subtilis</i>	2,41 •
	<i>S2794 – B. subtilis</i>	1,68 •		<i>S2788 – B. amyloliquefaciens</i>	1,74 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>B. subtilis</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2893 – *Bacillus spizizenii*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

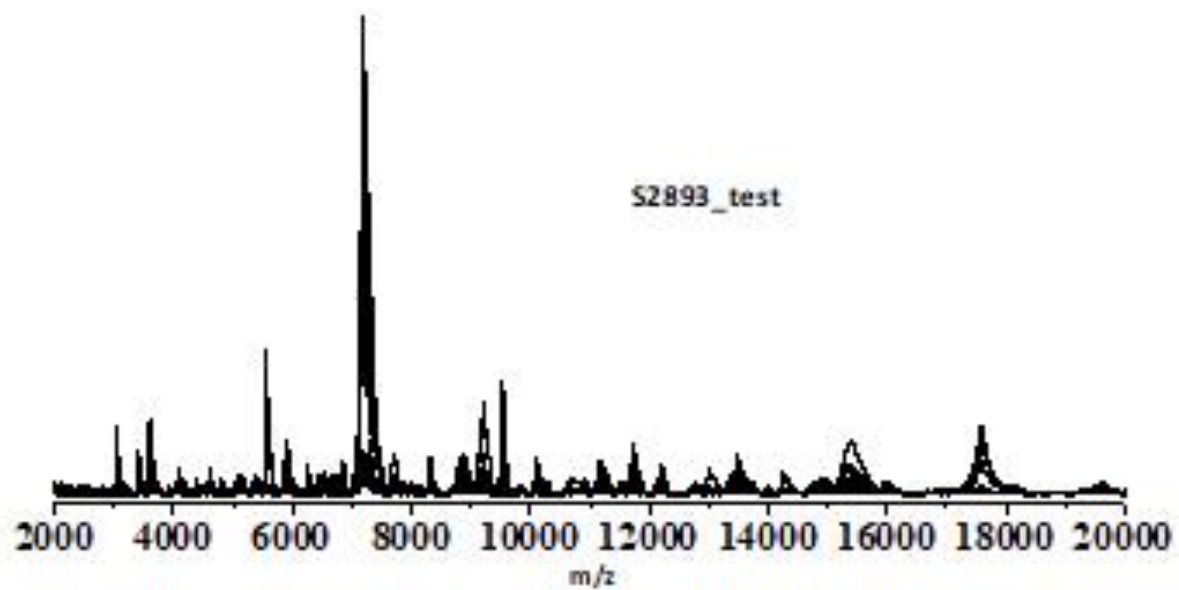


Figura 31. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2893			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2893_cultivo 1			S2893_cultivo 2			S2893_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	2,26 •	1	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	2,36 •	1	--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	1,97 •	2	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	2,40 •	2	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	1,77 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	1,57 •	3	<i>S2893 – B. spizizenii</i>	2,20 •	3	--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificação Não confiável			Nível de identificação: Gênero			Identificação: <i>Bacillus sp.</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2894 – *Lysinibacillus capsici*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

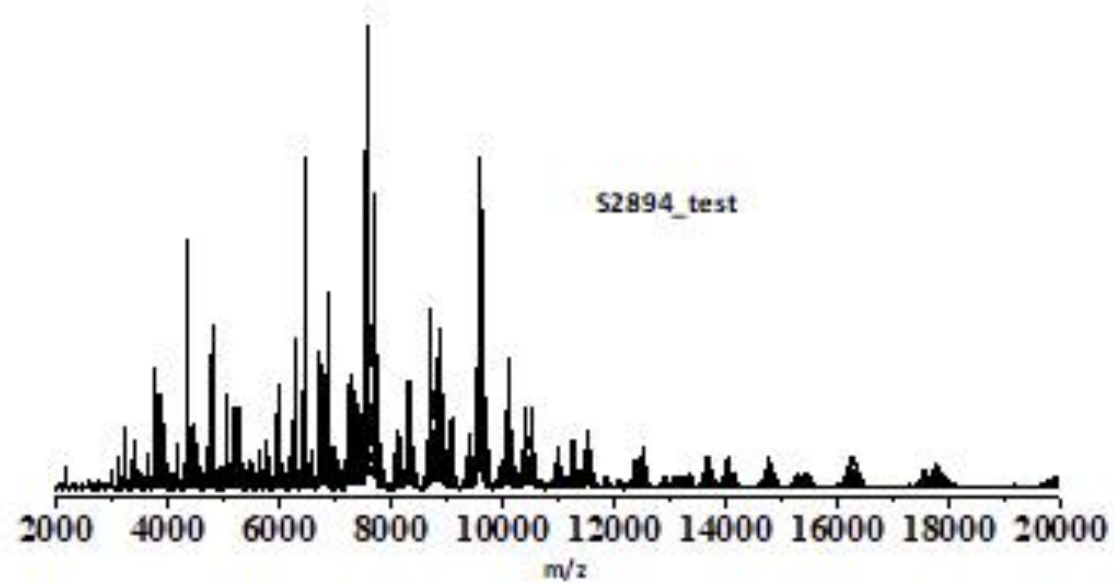


Figura 32. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2894			Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		
S2894_cultivo 1			S2894_cultivo 2			S2894_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	--	--	1	--	--	1	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	1,96 •
	--	--		--	--			
	--	--		--	--			
	--	--		--	--			
2	--	--	2	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	1,88 •	2	--	--
	--	--		--	--			
	--	--		--	--			
3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,09 •	3	--	--	3	<i>S0002 – Ly. sphaericus</i>	2,04 •
	--	--		--	--			
	--	--		--	--			
	--	--		--	--			
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Não Identificado			Nível de identificação: --			Identificação: --		

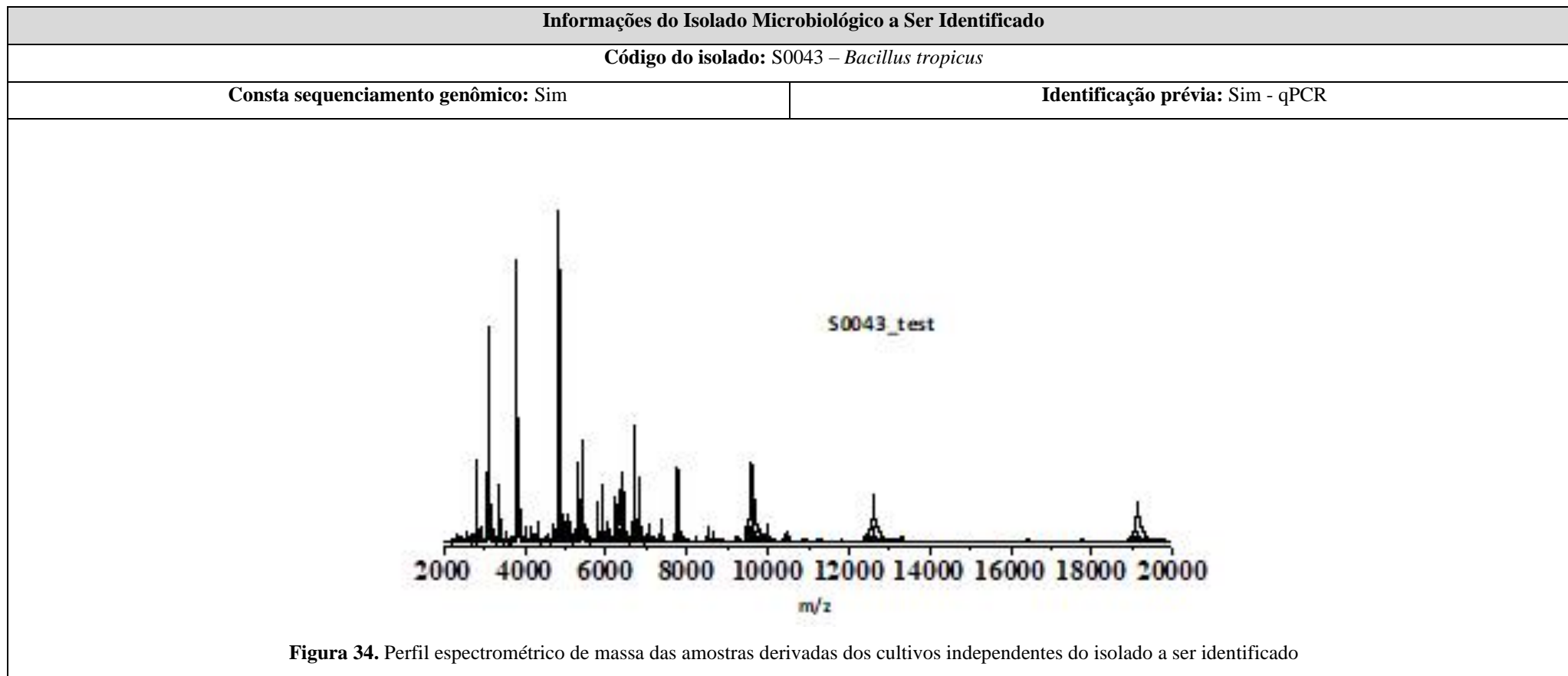


Figura 34. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S0043	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S0043_cultivo 1			S0043_cultivo 2			S0043_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,42 •	1	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,47 •	1	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,45 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,84 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,87 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,83 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,48 •	2	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,34 •	2	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,36 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,85 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,83 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,10 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,39 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,34 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,45 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,89 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,83 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	2,06 •
	--	--		--	--		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,05 •
	--	--		--	--		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,01 •
	--	--		--	--		--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Identificado	Nível de identificação: Espécie	Identificação: <i>Bacillus tropicus</i>
---	--	--

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S0615 – *Bacillus thuringiensis* sotto

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

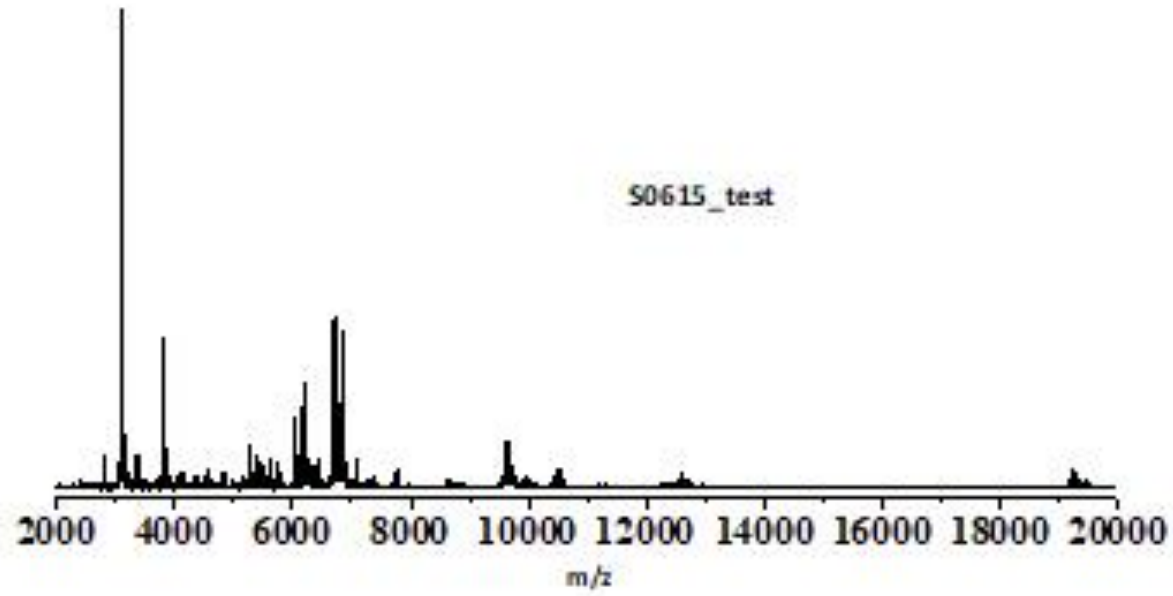


Figura 35. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S0615		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S0615_cultivo 1			S0615_cultivo 2			S0615_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,13 •	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,31 •	1	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,25 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,98 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,93 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	1,95 •
	<i>S0167 – B. cereus</i>	1,85 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,14 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,21 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,27 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,02 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,82 •		<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,09 •
	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,01 •		--	--		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,07 •
	--	--		--	--		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,02 •
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,32 •	3	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,14 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,98 •
	<i>S1576 – B. thuringiensis</i>	2,15 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,87 •		<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,76 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,94 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Espécie			Identificação: <i>Bacillus thuringiensis</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S0663 – *Bacillus cereus*

Consta sequenciamento genômico: Não

Identificação prévia: Sim - qPCR

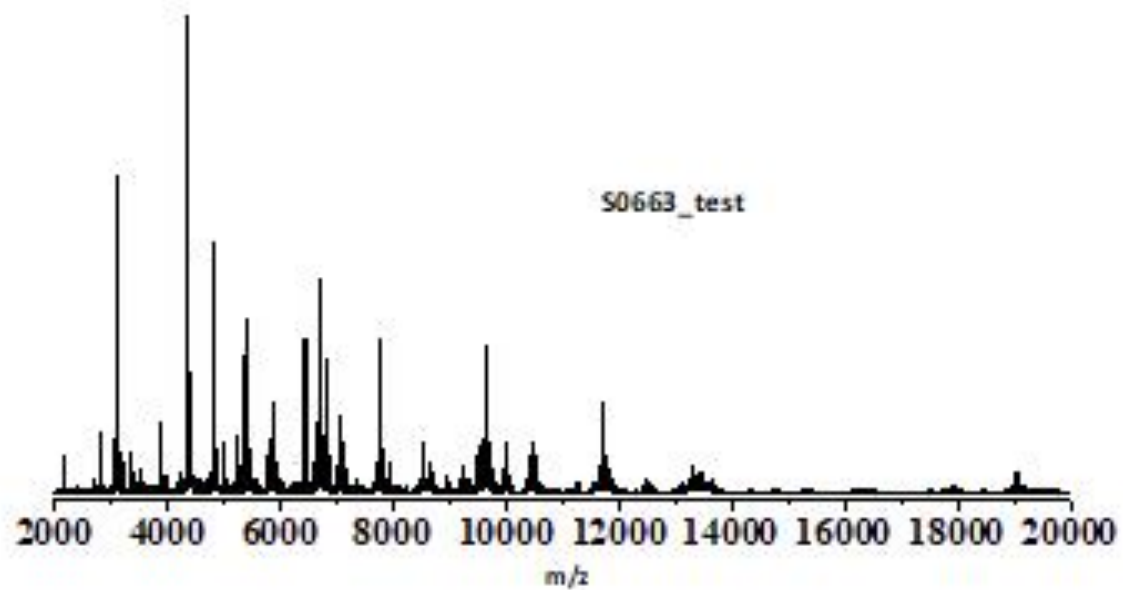


Figura 36. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S0663		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified		Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified				
S0663_cultivo 1			S0663_cultivo 2			S0663_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,37 •	1	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,11 •	1	<i>S0167 – B. cereus</i>	2,04 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,13 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,03 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,95 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,90 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,00 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,42 •	2	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,39 •	2	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,50 •
	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,17 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,09 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,98 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,08 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,04 •		<i>S0167 – B. cereus</i>	1,96 •
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,25 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,09 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,07 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,10 •		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado			Nível de identificação: Gênero – Grupo Filogenético		Identificação: <i>Bacillus cereus sensu lato</i>			

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S0953 – *Bacillus cereus*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

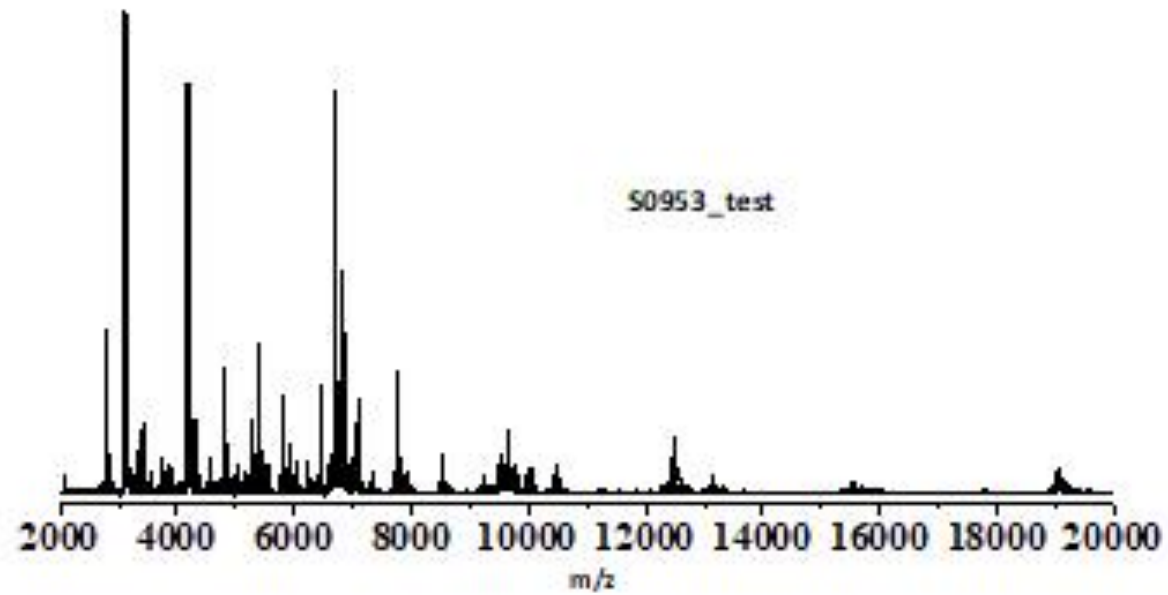


Figura 37. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S0953		Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified			
S0953_cultivo 1			S0953_cultivo 2			S0953_cultivo 3		
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score
1	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,14 •	1	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	1,91 •	1	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,22 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,99 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	1,90 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,97 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,90 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,82 •		--	--
	--	--		--	--		--	--
2	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,26 •	2	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	1,86 •	2	<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,34 •
	<i>S1450 – B. thuringiensis</i>	2,08 •		<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	1,80 •		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,13 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,07 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	1,75 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,11 •
	--	--		--	--		--	--
3	<i>S1989 – B. thuringiensis</i>	2,09 •	3	<i>S0043 – B. tropicus</i>	1,67 •	3	<i>S0663 – B. cereus</i>	2,17 •
	<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,08 •		<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	1,63 •		<i>S2782 – B. thuringiensis</i>	2,15 •
	<i>S2566 – B. thuringiensis</i>	2,07 •		--	--		<i>S0043 – B. tropicus</i>	2,00 •
	--	--		--	--		--	--
Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper								
Estado da identificação do isolado: Identificado Parcialmente			Nível de identificação: Gênero – Grupo Filogenético			Identificação: <i>Bacillus cereus sensu lato</i>		

Informações do Isolado Microbiológico a Ser Identificado

Código do isolado: S2896 – *Bacillus subtilis*

Consta sequenciamento genômico: Sim

Identificação prévia: Sim - qPCR

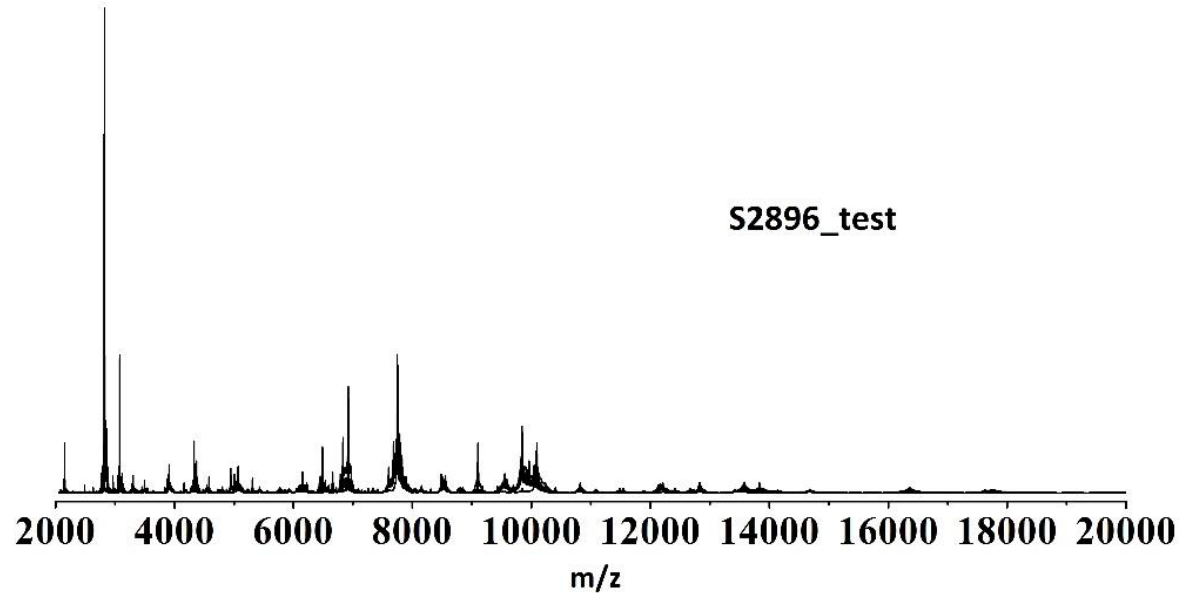


Figura 38. Perfil espectrométrico de massa das amostras derivadas dos cultivos independentes do isolado a ser identificado

Informações da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Código do isolado: S2896	Método de processamento dos espectros: Medium Mass Method_BiolCtrl modified	Método de comparação dos perfis: Medium Mass Method_BiolCtrl modified
---------------------------------	--	--

S2896_cultivo 1			S2896_cultivo 2			S2896_cultivo 3			
Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	Técnica	Identificação	Score	
1	--	--	1	--	--	1	--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
2	--	--	2	--	--	2	--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
3	--	--	3	--	--	3	--	--	
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--
	--	--		--	--		--	--	--

Veredicto da Identificação do Isolado Microbiológico por MALDI-Biotyper

Estado da identificação do isolado: Não Identificado	Nível de identificação: --	Identificação: --
---	-----------------------------------	--------------------------