

Wilker Dhenison Barbosa de Oliveira

**Detecção Molecular de *Chromobacterium subtsugae* em Insumo Biológico Comercial
por PCR**

São Cristóvão – SE

Outubro-2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE – UFS

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS APLICADAS – CCAA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA – DEA

**Detecção Molecular de *Chromobacterium subtsugae* em Insumo Biológico Comercial
por PCR**

**Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia Agrônômica – Universidade
Federal de Sergipe, como requisito parcial para
obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.**

APROVADO em:

ORIENTADO: Wilker Dhenison Barbosa de Oliveira

Documento assinado digitalmente
gov.br PAULO ROBERTO GAGLIARDI
Data: 19/10/2023 13:29:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi

(Orientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br THIAGO LIMA DA SILVA
Data: 19/10/2023 10:28:23-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br VALDINETE VIEIRA NUNES
Data: 19/10/2023 10:43:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Me. Thiago Lima da Silva

(Banca examinadora)

Dr^a. Valdinete Vieira Nunes

(Banca examinadora)

Dedico este trabalho a minha família: minha mãe, Francisca Oliveira; meu pai, Havailso Barbosa; e ao meu irmão, Isaias Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim, por ter dedicação, foco e determinação para continuar; por ter aproveitado a Universidade não apenas para aprender com as aulas, mas também para me desenvolver como pessoa, ampliando minhas habilidades para além do conteúdo técnico-científico do curso.

Agradeço aos meus pais, por todo apoio, carinho e esforços que fizeram durante minha vida para que eu pudesse chegar até aqui e por sempre motivarem a ir além.

Agradeço aos meus amigos que fizeram parte dessa vivência universitária: Jorge, Darliton, Hanna, Daniel, Higor, Pedro, Gabriel Batistuta, Tarcísio, Augusto, Marcel, João Batista, Yasmine, João Abreu, Gabriel Fernandes, Rafaela, Gabriela Mendes, Gefersson, Thales, Thiago, Eduarda, Polyana, Emanuel, Brian, Eduardo, Iago, Galo, Brenda Heinzen, Wallison, Jackelyne Panta, Paulinha e a galera do dominó.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Gagliardi e ao meu Coorientador, MSc. Wallison Oliveira Vieira, por disponibilizarem tempo e intelecto para construir esse trabalho comigo.

Agradeço a Dr^a. Valdinete Vieira Nunes e ao Dr. Tiago Lima da Silva por aceitarem a participar da minha banca de defesa.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Engenharia Agrônômica e aos professores de outros departamentos que estão envolvidos com o curso de Engenharia Agrônômica por prestarem esse serviço imensurável de educar, estimular, motivar, mentorear, orientar todos os discentes que adentram neste curso.

Agradeço ao Núcleo de Empreendedorismo da UFS, por desenvolver experiências disruptivas e transformadoras para todos aqueles que desejavam participar das ações.

Agradeço ao SEBRAE Sergipe e em especial, minha equipe de trabalho: Débora Mendonça, Rosana Leite, Mariana Araújo, Bethânia, Cainã, Fernanda, Aldjane, Márcia, Frank, Angélica, Antônio Neto, Antônio Ramos e Rejane.

Agradeço a Biomulti Soluções em Agronegócio Ltda por apoiarem o desenvolvimento deste trabalho e por contribuírem com a minha graduação.

Para todos os engenheiros:

“Gostaria de recorrer à mitologia e citar Dédalo – que é, no meu ponto de vista, o exemplo típico do engenheiro de hoje– para ilustrar o mito do Progresso. Minos tomou emprestado um touro de Zeus e não o devolveu. Zeus, para puni-lo, infunde em Pasífae, a esposa de Minos, uma paixão pelo touro. Pasífae quer copular com o touro. Minos, que é um homem declaradamente muito aberto, concorda e chama seu engenheiro Dédalo. Este fabrica uma vaca de couro e madeira (mais ou menos do jeito que se utiliza hoje nos centros de inseminação artificial) e Pasífae copula com o touro. Dessa união, nasce o Minotauro. Novamente Dédalo é solicitado para solucionar o problema. Dédalo inventa seu famoso labirinto para ali confinar o monstro, mas o Minotauro devora alguns e algumas atenienses a cada ano. É preciso, portanto, livrar-se dele. Encarregam Teseu de matar o Minotauro, mas permanece uma dúvida: como Teseu sairá do labirinto após ter cumprido sua missão? Ariane, a filha de Minos, que está apaixonada por Teseu, pergunta a Dédalo como proceder. Dédalo indica-lhe a técnica do fio. Teseu mata o Minotauro e sai graças ao fio de Ariane, mas infelizmente esquece Ariane no caminho. Minos, furioso, acha um bode expiatório na pessoa de Dédalo, que ele encerra no labirinto com seu filho Ícaro. Para escapar, Dédalo, que declaradamente tem fé nas soluções técnicas para resolver os problemas apresentados por suas próprias técnicas, fabrica asas e foge com seu filho; mas este se aproxima muito do sol e morre, para desespero de seu pai. Esta história mostra como, a partir de uma necessidade ilegítima salva pela técnica, o recurso sistemático à solução técnica somente causa novos problemas.”

PIERRE-HENRY GOUYON

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS.....	7
LISTAS DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1. Bioeconomia e o Mercado de Bioinsumos.....	12
2.2. Controle Biológico.....	13
2.2.1. Controle Biológico de Artrópodes.....	14
2.2.1.1 Bactérias Entomopatogênicas.....	16
2.2.1.1.1. A <i>Chromobacterium subtsugae</i>	17
2.3. Multiplicação “On Farm”.....	17
2.4. Identificação de Bactérias no Controle de Qualidade de Bioinsumos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Obtenção do isolado da <i>Chromobacterium subtsugae</i>	21
3.2. Extração de DNA.....	21
3.3. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Obtenção da <i>Chromobacterium subtsugae</i>	23
4.2 Extração de DNA.....	23
4.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	25
5. CONCLUSÕES.....	28
6. REFERÊNCIAS.....	29

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1: Colônias de <i>Chromobacterium subtsugae</i> após 24h de repicagem e incubação em BOD a 28 °C.....	23
FIGURA 2: Teste de integridade das amostras de DNA.....	24
FIGURA 3: Gel de agarose com o resultado da PCR.....	25
FIGURA 4: Fragmentos de referência de leader de 100pb da Invitrogen.....	26

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1. <i>Primers</i> e respectivas seqüências da subunidade ribossomal 16S utilizados no estudo.....	22
TABELA 2: Concentrações oriundas do processo de extração de DNA da <i>Chromobacterium subtsugae</i>	24
TABELA 3. Comparação entre seqüência do primer recebido. (a) e a seqüência relatada por Martins <i>et. Al.</i> (2007) (b).....	27

RESUMO

Nos dias atuais, os avanços em direção a uma sociedade mais sustentável estão impulsionando o surgimento de um novo setor econômico – a bioeconomia. Este campo se baseia na aplicação de práticas biotecnológicas para o desenvolvimento de produtos e serviços inovadores. Entre as alternativas disponíveis na agricultura, o controle biológico empregando microrganismos tem se destacado devido à sua vasta gama de aplicações no manejo da fitossanidade. Nesse contexto, merece destaque o uso da bactéria *Chromobacterium subtsugae* para o controle de insetos-praga, graças à presença da violaceína, um pigmento com propriedades antibióticas. Esta característica torna essa bactéria uma candidata ideal para produção comercial, inclusive para multiplicação "On Farm". No entanto, é essencial otimizar os protocolos de controle de qualidade, a fim de garantir a detecção eficiente e confiável dessa bactéria, uma vez que a produção fora dos padrões de qualidade pode resultar em inóculos contaminados ou impuros. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo sugerir uma metodologia para detecção molecular da bactéria *Chromobacterium subtsugae* em inoculante biológico, visando a utilização em trabalhos rotineiros de controle de qualidade. Após o cultivo *in vitro* da bactéria em meio de cultura sólido, coletou-se amostras para extração e quantificação do DNA. Posteriormente, as amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase, juntamente com amostras de controle negativo, e os produtos de amplificação resultantes foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras de DNA apresentaram concentrações satisfatórias, e a relação 260/280 nm indicou a presença de proteínas na maioria das amostras, sem, no entanto, afetar a amplificação do gene. A avaliação demonstrou que o fragmento amplificado tinha o tamanho esperado de 600 pb, conforme relatado em estudos semelhantes. Em conclusão, este estudo demonstra a viabilidade da detecção molecular de *C. subtsugae* de forma rotineira no controle de qualidade da produção de insumos comerciais.

PALAVRAS-CHAVE: Bioinsumos, bactéria entomopatogênica, biologia molecular.

1. INTRODUÇÃO

A Organização das Nações Unidas - ONU, estabeleceu em 2015, os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável - ODS, para melhorar as condições da existência da sociedade e para melhorar as condições ambientais. Foram 17 objetivos com 169 metas, dentre as quais podem-se citar a Meta 2.4 do ODS 2, que diz: “até 2030, garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo” (ONU, 2015); e a Meta 12.4 do ODS 12 que diz “até 2020, alcançar o manejo ambientalmente saudável dos produtos químicos e todos os resíduos, ao longo de todo o ciclo de vida destes, de acordo com os marcos internacionais acordados, e reduzir significativamente a liberação destes para o ar, água e solo, para minimizar seus impactos negativos sobre a saúde humana e o meio ambiente”(ONU, 2015). Além disso, sabe-se que o uso exclusivo do controle químico no manejo de pragas e doenças na agricultura tem gerado problemas de saúde nos seres humanos, resistência às moléculas mais comercializadas, contaminação ambiental e redução da biodiversidade.

A maioria dos problemas gerados pelos agroquímicos estão relacionados ao uso inadequado, que não seguem as recomendações estabelecidas. Dentre essa situação, pode-se citar: o aplicador não usa EPI; dosagem maior do que o recomendado; aplicação fora dos horários indicados por possuírem menos ação do vento; equipamento de pulverização incorreto, mal manejado ou necessitando de manutenção; dentre outras ocasiões. Além do mais, não se sabe o impacto total que uma molécula sintética pode atingir com o acúmulo de resíduos no longo prazo.

Cabe ressaltar que a população mundial em outubro de 2021, atingiu o patamar de 7,9 bilhões de pessoas e as Nações Unidas estimam que no ano de 2100, esse número chegue a 11,2 bilhões. Esse aumento exponencial cria um grande desafio para a soberania e segurança alimentar e nutricional, pois a área terrestre é limitada, e tratando-se de área terrestre destinada para a produção de alimentos, essa tende a diminuir, já que parte da área utilizada pela agropecuária atualmente será destinada para moradia, indústria e lazer das pessoas.

Somando-se a esse contexto de desafios para a produção de alimentos, vale salientar que existe o ataque de pragas e doenças que reduzem a produção. Os danos

causados por insetos-pragas causam em média 7,7% de perdas nas principais culturas agrícolas, em uma lavoura que faz uso de métodos de controle. O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA/USP, desenvolveu um estudo nas culturas do milho, soja e algodão, para estimar o impacto das perdas causadas por pragas e doenças se não fossem utilizados métodos de controle. No milho, escolheram-se os ataques feitos pelo gênero *Spodoptera* para a temporada de 2016/17, e observou-se que os produtores economizaram R\$3,42 bilhões, porém, 40% da produção seria perdida e precisaria investir R\$25,3 bilhões para aumentar a área de cultivo e atender a mesma produção que era obtida quando realizava o controle, além disso, o preço de comercialização interno do grão aumentaria 13,6% e teria um impacto de 0,39% no Índice Nacional de Preços ao Consumidor Amplo (IPCA) geral de 2017.

Esse contexto, faz com que os produtos de base biológica ganhem força de mercado. Estudo feito pelo Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) demonstrou que os bioinsumos movimentaram em 2016 US \$326,1 bilhões. É dentro dessa categoria que se enquadra o controle biológico. Essa técnica, já era utilizada pelos chineses, cerca de três mil anos atrás. Após anos de evolução do modelo de produção agrícola, ela vem ganhando foco e se tornando uma das principais vias no Manejo Integrado de Pragas e Doenças, como alternativa ao controle químico. Atualmente, existem diversas startups e empresas que trabalham no cultivo e comercialização de inimigos naturais. Outra técnica que está sendo bem reproduzida é o sistema “*On Farm*”, que consiste em multiplicar agentes biológicos, principalmente fungos e bactérias, dentro das propriedades rurais. Contudo, a má condução desses sistemas ou a comercialização de produtos de baixa qualidade, podem gerar a multiplicação de microrganismos indesejados. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo sugerir uma metodologia para detecção molecular da bactéria *Chromobacterium subtsugae* em inoculante biológico, visando a utilização em trabalhos rotineiros de controle de qualidade.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Bioeconomia e o Mercado de Bioinsumos

A preocupação mundial por melhorias para a sociedade e para o planeta, fez com que 193 países se reunissem para traçar um planejamento que transformasse as condições mundiais. Esse encontro, planejado e executado pela Organização das Nações Unidas - ONU, debateu e criou os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável - ODS, e estabeleceram 17 objetivos, que nortearão as ações que causarão mudanças na subsistência humana.

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, a Agenda Global 2030 é o direcionamento estratégico para o desenvolvimento da “nova” economia baseada em recursos biológicos renováveis, a bioeconomia (EMBRAPA, 2022). Além disso, Torres et al. (2017) defende que a evolução econômica se dará através dos conhecimentos adquiridos através da biotecnologia, bioinformática, genômica, engenharia genética e biologia sintética. Uma vez que, pelo menos metade dos ODS estão relacionados à agricultura, alimentação, bioenergia, biotecnologia e química verde. Bastos et al. (2022) mostra que esse raciocínio também é defendido pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico – OCDE, para a qual, a bioeconomia envolve três elementos principais: conhecimentos avançados de genética e biologia molecular; o uso de biomassa renovável e bioprocessos eficientes; e a integração do conhecimento biotecnológico nos mais diversos setores (OCDE, 2009). Ademais, Bueno e Torres (2022) relata que a União Europeia utiliza cinco objetivos como estratégia para o desenvolvimento da bioeconomia, e estes, estão relacionados com os ODS da ONU, são eles: assegurar a segurança alimentar e nutricional; gerenciar os recursos naturais de forma mais sustentável; reduzir a dependência de recursos não renováveis; adaptação e mitigação das mudanças do clima; fortalecer a competitividade europeia e criar empregos.

Nos Estados Unidos - EUA, em 2016 a estimativa econômica para o setor da bioeconomia foi de US\$ 50 bilhões de dólares para o PIB estadunidense (United States, 2020). Já no continente europeu, em 2013, esse setor movimentou 2,1 trilhões de euros (BIC Press Release, 2016). Silva, Pereira e Martins (2018) através de estudo feito pelo BNDES, identificaram que em 2016 o Brasil totalizou US \$326,1 bilhões no comércio de produtos e serviços de bases biológicas e na safra de 2020/21 movimentou R\$ 1,7 bilhão.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (2021), define o termo “bioinsumo” como:

[..] o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos.

Porém, Vidal, Saldanha e Veríssimo (2022) enfatizam que na literatura ainda não tem um conceito amplamente utilizado.

A EMBRAPA em parceria com o MAPA, desenvolveu um *software* para dispositivos android, com o intuito de facilitar para produtores rurais e profissionais das ciências agrárias, o acesso ao Catálogo Nacional de Bioinsumos. De acordo com esse sistema, atualmente existem 979 produtos registrados no Brasil, até o mês de agosto de 2022. E esses produtos estão divididos em duas categorias: inoculantes e controle de pragas. Na primeira, é listado todos os produtos inoculantes que foram testados e aprovados. Já na segunda, são listadas as principais pragas agrícolas, e nas subcategorias são listados os produtos que foram testados e aprovados para as respectivas pragas.

2.2. Controle Biológico

De acordo com Van de Bosh et. all (1982), o controle biológico, em sua essência, é uma prática de ecologia aplicada, pois se baseia nas interações ecológicas que equilibram o ecossistema. Sujii *et. al.* (2020), reafirmam as interações tróficas existentes na técnica, e a explicam utilizando as cadeias alimentares, onde os organismos produtores – as plantas – servem de alimento para os consumidores, que nesse caso, em sua maioria são insetos herbívoros ou fitófagos que causam danos econômicos nas lavouras. Em seguida, os consumidores de um nível trófico mais acima, alguns predadores ou parasitoides, por exemplo, se alimentam do nível trófico de consumidores inferior. Porém, essa cadeia não segue uma linearidade, se enquadra melhor como uma teia, onde os seres consumidores servem de alimento para um emaranhado de outros seres consumidores.

Essa teia trófica é uma das ações que limitam o crescimento populacional naturalmente. Outra ação, são as doenças, e em sua maioria, são causadas por fungos, bactérias e vírus. Nos insetos, recebem a denominação de microrganismos entomopatogênicos e nas plantas, fitopatogênicos, são inimigos naturais utilizados no controle biológico (Sujii *et. al.*, 2020).

O controle biológico, serve tanto para pragas, quanto para doenças e plantas espontâneas e, por mais que seja um campo de estudo recente para a ciência, indícios mostram que a quatro mil anos atrás, os egípcios já utilizavam desta técnica para proteger o armazenamento de grãos contra o ataque de pragas, como os roedores (Smith e Kennedy, 2009) e os chineses, no século III a.C., utilizavam formigas no controle de algumas pragas (Parra et. al., 2002; Clausen, 1956; van den Bosch et al., 1982).

Por ser uma área ampla, a EMBRAPA divide em cinco vertentes de estudo: 1 - Biodiversidade, 2 - Estratégias Incrementais de Desempenho de Agentes de Controle Biológico Nativos e Exóticos, 3 - Integração das Estratégias de Proteção de Cultivos, 4 - Impactos do Uso de Agentes de Controle Biológico e 5 - Estratégias incrementais de Adoção de Agentes de Controle Biológico. A primeira vertente abrange desde a prospecção até a valoração do organismo (biogeografia, metabólitos secundários, variabilidade genética e espectro de atividade). A segunda vertente atua desde a análise bioecológica até o desenvolvimento de metodologias de produção em larga escala. A terceira foca nas técnicas de manejo. A quarta, avalia os impactos ambientais, econômicos e sociais, baseando-se na especificidade e persistência. A quinta, e última vertente, fornece formação de profissionais e transferência de metodologias para o setor produtivo.

2.2.1. Controle Biológico de Artrópodes

Segundo Fontes e Valadares-Ingliš (2020) é possível dividir o controle biológico de artrópodes-pragas em sete grandes grupos de agentes: os parasitoides, os predadores – insetos e ácaros –, os fungos entomopatogênicos, as bactérias entomopatogênicas, os vírus entomopatogênicos e nematoides entomopatogênicos.

Laumann e Sampaio (2020) demonstraram o quantitativo de espécies parasitoides por família, e as três maiores são: Ichneumonidae, com 24.000 espécies; Braconidae, com 19000 espécies; Tachinidae, com 8.000 espécies. As mesmas, são muito difundidas no controle biológico. Ademais, uma das famílias mais importantes é a Trichogrammatidae, com 700 espécies. Essa, ganha destaque por ser facilmente produzida em escala massal e é utilizada em todo o mundo. Em sua maioria, são parasitoides solitários de ovos, que atacam todas as ordens de insetos holometábolos e Hemiptera, Orthoptera e Thysanoptera.

Dentre os predadores, existem duas classes taxonômicas importantes, a Insecta e a Arachnidae. Na primeira destacam-se 7 ordens - Coleoptera, Dermaptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Neuroptera e Thysanoptera - e na segunda, duas - Araneae e Acari. E das espécies e famílias mais utilizadas como agentes de controle do tipo predador,

pode-se citar: a *Doru luteipes* (Dermaptera: Forficulidae) que é predadora da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera: Noctuidae); a *Calosoma granulatum* (Coleoptera: Carabidae), predadora da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis* Lepidoptera: Erebidae); a *Hippodamia convergens* que preda os pulgões (*Aphis gossypii* e *Myzus persicae*, Hemiptera: Aphididae); e *Macrolophus* spp. (Hemiptera: Miridae) que é predadora da Mosca branca (*Bemisia tabaci*, Hemiptera: Aleyrodidae)(Sujii *et. al.*, 2020b).

Os fungos entomopatogênicos, são microrganismos capazes de causar doenças e até mesmo a morte de insetos. Algumas espécies também são inimigos naturais de outros animais do Filo Arthropoda, além dos insetos. Uma das primeiras espécies utilizada racionalmente como agente de controle microbiano foi a *Beauveria bassiana*, a partir dos estudos realizados obteve-se fundamentos para propor o uso de outras espécies como agentes de controle biológico. Atualmente já foram catalogadas 700 espécies fúngicas entomopatogênicas, e com o uso da bioprospecção tem-se potencializado ainda mais essa área. Dentre essa vastidão de espécie, ganha destaque no meio comercial os seguintes gêneros: *Metarhizium*, *Hirsutella*, *Beauveira*, *Isaria*, *Lecanicillium* e *Aschersonia* (Valadares-Inglis, Lopes & Faria, 2020).

Tratando-se de nematoides, atualmente existe apenas uma ordem que contém microrganismos entomopatogênicos, a Rhabditida (Nematoda: Chromadorea). Onde destaca-se as famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae e seus respectivos gêneros: *Steinernema* e *Neosteinernema*; e *Heterorhabditis*. Ao todo, somam-se 112 espécies descritas. Eles agem em simbiose com bactérias da família Enterobacteriaceae, que liberam toxinas que impedem o crescimento de outros microrganismos e que auxiliam na morte do inseto (Dolinski, 2020).

Diferentemente dos microrganismos descritos anteriormente, os vírus não são considerados seres vivos, pois são constituídos apenas de DNA ou RNA e um capsídeo. São classificados como parasitas intracelulares obrigatórios, pois necessitam parasitar células vivas e não possuem metabolismo próprio. Castro *et. al.* (2020) citam que o principal agrupamento entomopatogênico é do Baculovírus. E a principal ferramenta de infecção são os genes que eles carregam, já que são responsáveis por inibir a apoptose, inativar o hormônio ecdisona, degradar a quitina através de liberação de enzimas, codificação da enzima chamada de proteína tirosina fosfatase e interferência no metabolismo de nucleotídeos dos hospedeiros.

2.2.1.1 Bactérias Entomopatogênicas

Bactérias são seres procariontes, ou seja, desprovidos de núcleo envolto por membrana e unicelulares. A estrutura mais externa que dá forma à sua estrutura corporal é uma parede celular formada principalmente por peptidoglicano. Esse composto, consiste em um dissacarídeo repetitivo que se unem por ligações polipeptídicas. A porção dissacarídica é composta por dois monossacarídeos, a N-acetilglicosamina (NAG) e o ácido N-acetilmurâmico (NAM). A depender da estrutura da parede celular, as bactérias são classificadas em gram-positivas e gram-negativas. A principal diferença entre esses dois grupos é que o primeiro, possui uma camada espessa e rígida de peptidoglicano com ácido teicoico e ácido lipoteicoico; já o segundo possui uma camada fina de peptidoglicano sobreposta por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e uma membrana fosfolipídica, com ausência dos ácidos teicoico e lipoteicoico (Tortora *et. al*, 2017).

As bactérias entomopatogênicas são divididas em dois grupos, as esporulantes e as não esporulantes. Dentre as esporulantes, têm-se as aeróbicas, como as do gênero *Bacillus*, e as anaeróbicas, do gênero *Clostridium*. Já nas não esporulantes, participam os gêneros *Pseudomona*, *Xenorhabdus*, *Serratia* e *Streptococcus*. O gênero *Bacillus* é o mais utilizado como agente de controle biológico. As espécies desse gênero são Gram-positivas e têm ocorrência cosmopolita, podendo ser encontrada em qualquer parte do mundo, nos mais diferentes substratos, como solo, plantas, rizosferas, entre outros (Monnerat *et. al.*, 2020).

A *Bacillus thuringiensis* (Berliner) é a bactéria mais utilizada no controle biológico, pois abrange diferentes insetos das Ordens Lepidoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Diptera e alguns nematoides (Bravo *et al.*, 2005). O que lhe dá destaque dentre as outras espécies, é a presença de um cristal protéico intracelular, que ocorre durante a esporulação. Esses cristais são formados por proteínas Cry, que formam uma inclusão paraesporal e são sintetizadas na forma de prototoxinas. Essas, são ativadas no aparelho digestório dos insetos, que é o primeiro órgão a ser paralisado, em seguida os são os músculos e a ocorrência de septicemia, ocasionando morte por inanição. Ademais, existem outras proteínas como Cyt, Vip e as PS (1A, 2A, 3A e 4A), que assim como a Cry, incrementa a entomopatogenicidade da espécie (Aangelo *et al.*, 2010).

Monnerat et al. (2020) destacam a diversidade bacteriana utilizada atualmente. As principais são: *Paenibacillus popilliae*, *P. lentimorbus*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Serratia entomophila*, *S. proteamaculans*, *Pseudomonas entomophila*, *Clostridium bifermentans*, *Photorhabdus luminescens*, *X. nematophila* e *Chromobacterium subtsugae*. Cada uma tem seu respectivo mecanismo de ação.

2.2.1.1.1. A *Chromobacterium subtsugae*

A *Chromobacterium subtsugae* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica facultativa, móvel de flagelos polares, da classe das betaproteobactérias. Suas células são bastonetes afilados, medindo entre 0,7+/-0,1 mm de largura e 2,4+/-0,2 mm de comprimento. Seu crescimento se dá na faixa de pH 6,5 a 8,0, com temperatura ideal de 25-28 °C e inicia após 24h na cor creme e vão se tornando violeta profundo do centro para as extremidades durante as próximas 24h. Porém, destaca-se que em recipientes selados, limitando a quantidade de oxigênio, o pigmento não é formado. Esse pigmento é denominado de violaceína, um derivado do composto violeta di-triptofano (Martin *et al.*, 2007).

A primeira bactéria relatada que realiza a síntese da violaceína, foi a *Chromobacterium violaceum*, a espécie tipo do gênero *Chromobacterium*. Porém, atualmente, sabe-se que outras bactérias também produzem esse composto químico. Mas, as bactérias do gênero *Chromobacterium*, que sintetizam, fazem esse processo via *quorum sensing*, um mecanismo de comunicação entre as bactérias que permite controlar a expressão de genes específicos de acordo com a densidade celular. No caso da violaceína, ela se torna importante devido sua atividade biológica que é caracterizada como antifúngica, antiviral, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante (Cauz *et al.*, 2019). Inclusive, estão utilizando-a para produzir biossensores biológicos (Hui *et al.*, 2022).

Os testes utilizando *Chromobacterium subtsugae* como agente de controle biológico foram realizados através de ensaios *in vitro* com as seguintes espécies de insetos: besouro da batata do Colorado adulto (*Leptinotarse decemlineata*), a lagarta da raiz do milho ocidental adulta (*Diabrotica virgifera*), a lagarta da raiz do milho do sul adulta e larval (*Diabrotica undecimpunctata*), a larva do pequeno besouro das colmeias (*Aethina tumida*), larvas de traça-diamante (*Plutella xylostella*), mosca-branca da batata-doce adulta e larval (*Bernisia tabaci*) e percevejo-verde-do-sul adulto (*Nezara viridula*) (Martin *et al.*, 2007). Porém, o mecanismo de ação é complexo, por conta dos diferentes metabólitos com efeito inseticida, o que torna difícil até o momento a seu descritivo (Asolkar *et al.*, 2015).

2.3. Multiplicação “On Farm”

A busca por tecnologias e processos capazes de maximizar a produção e reduzir o custo da produção não é recente, principalmente no contexto que envolve a sustentabilidade. Desse modo, muitos produtores rurais têm produzido parte dos insumos

em suas propriedades para consumo próprio, principalmente tratando-se de bioinsumos. Esse processo é chamado de multiplicação *on farm* (Lana *et al.*, 2022).

Bocatti *et al.* (2022) explicam que essa técnica tem ganhado força no meio rural, inclusive existem agricultores com biofábricas com produção significativa. Entretanto, ainda é um processo que ocorre de forma rudimentar, na maioria dos casos. Não ocorrendo o controle e os equipamentos adequados para a produção. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, demonstra preocupação diante da produção de microrganismos em grande escala sem o controle de qualidade necessário, pois “o bioinsumo bem manejado é de baixíssimo risco, sendo uma alternativa sustentável e interessante, mas o mal manejado torna-se produto com potencial risco à saúde humana” (Agência Senado, 2022).

Lana *et al.* (2022), avaliaram a produção de inoculantes “*on farm*” à base de *Bacillus*, e ao analisarem características físico-químicas, moleculares e genéticas, concluíram que os inoculantes oriundos das propriedades rurais estavam altamente contaminados com microrganismos não-alvo, trazendo potencial risco para a saúde humana, animal e ao meio ambiente. Já que dos 41 microrganismos encontrados nas amostras, 37 eram compatíveis geneticamente com agentes patogênicos humanos. Além disso, destacaram que o sistema *on farm*, não estava de acordo com a premissa contida na Lei nº 13.123/2015 (Brasil, 2015) e no Decreto Regulamentador nº 8.772/2016 (Brasil, 2016) “que estabelecem que o acesso ao patrimônio genético brasileiro será realizado mediante cadastro, autorização ou notificação, e serão submetidos à fiscalização, restrições e repartição de benefícios nos termos e nas condições estabelecidas na legislação.”

2.4. Identificação de Bactérias no Controle de Qualidade de Bioinsumos

A produção de bioinsumos a base de microrganismos precisa de um controle de qualidade que estabeleça um conjunto de procedimentos que proporcione ações preventivas e corretivas, para garantir a segurança ao meio ambiente e a saúde humana. Nesse sentido, a identificação correta do microrganismo é o primeiro passo para obter qualidade na produção. Cabe salientar que esse processo precisa ser realizado por profissionais qualificados para tal. Dentre os parâmetros para a identificação exata do material cultivado, utilizam-se: análises morfológicas das colônias e das estruturas celulares, testes bioquímicos e técnicas moleculares (Iwanicki *et al.*, 2022).

De acordo com Rocha (2023), a caracterização morfológica e citomorfológica se baseia nas análises de composição da parede, mobilidade, diâmetro, forma, textura da

superfície da colônia, cor e forma de adesão das colônias. Monnerat *et al.* (2020), exemplificam a caracterização morfológica do gênero *Bacillus* sp., que utilizam microscópio com contraste de fase no aumento de 1000x com o auxílio de óleo de imersão para visualizar célula vegetativa, forma e posição do esporo, presença de corpos paraesporais (cristais) e motilidade, evidenciando que as morfologias desse gênero são relativamente próximas.

Hussain *et al.* (2013) estabelecem que a caracterização bioquímica envolve o pH para crescimento bacteriano, concentrações de sais, metabolização e solubilização de compostos, testes com substâncias antimicrobianas e dados sobre a presença ou atividade enzimática.

Mas, Iwanicki *et al.* (2022) informam que normalmente, os métodos morfológicos e bioquímicos são usados apenas para análises iniciais. Pois, para garantir a identificação precisa das espécies, é essencial que esses métodos sejam enriquecidos com a identificação molecular. Salienta-se que os métodos citados anteriormente são baseados em características fenotípicas, ou seja, podem sofrer alterações de acordo com a influência do ambiente. Sendo assim a caracterização e identificação deve se dar pelo DNA (Barcellos e Hungria, 2010).

Tratando-se especificamente sobre bactérias, destaca-se o uso dos genes ribossomais, também conhecidos como rRNA, que são encontrados obrigatoriamente em todos os organismos vivos, expressam estruturas secundárias altamente conservadas, são abundantes nas células, pois fazem parte da estrutura dos ribossomos e a evolução das sequências desses genes ocorrem em taxas diferentes, permitindo análises filogenéticas em vários níveis taxonômicos. E especificamente nas bactérias, destaca-se o gene ribossomal denominado de 16S rRNA (Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990; Vandamme *et al.*, 1996; Garrity *et al.*, 2001 apud. Barcellos e Hungria, 2010).

Clarridge (2004) descreve que em 1960, Dubnau *et al.*, já observavam o estado de conservação da sequência do gene 16S rRNA em *Bacillus* sp. e que Woese *et al.*, em 1985 e 1987, definiram propriedades importantes dessa região que fazem com que ela seja referência na sistemática bacteriana atual. De acordo com Woese (1987), essa região funciona como cronômetro molecular, pois as alterações são tão raras e lentas que é capaz de abranger todo o espectro evolutivo. Esse gene engloba em torno de 1550 pares de bases (pb) e é composto por regiões conservadas e regiões variáveis. Essa característica, faz com que seja grande o suficiente e tenha polimorfismos interespecíficos suficientes para realizar comparações distintivas e estatisticamente válidas. Além disso, o GenBank, Banco de

Dados de Sequências de Nucleotídeos, possui mais de 20 milhões de sequências depositadas, e dessas, mais de 90.000 são do 16S rRNA (Clarridge, 2004).

Barcellos et al (2015) compilaram as principais técnicas utilizadas atualmente para identificação taxonômica bacteriana. Destacam dezoito técnicas e comentam sobre seis técnicas genotípicas. Dentre as técnicas destacadas estão: Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), Análise de Fragmentos de Restrição de Baixa Frequência (LFRFA ou RFLP-PFGE), Amplificação de DNA (AFLP, AP-PCR, rep-PCR, DAF, RAPD, ARDRA), Hibridização DNA-DNA, Sequenciamento de RNAr, e a “Multilocus Sequence Analysis” - MLSA.

Nesse sentido, ressalta-se a aplicação da técnica de amplificação via reação em cadeia da polimerase - PCR, de uma determinada região específica. Essa técnica consiste em gerar várias cópias da sequência desejada *in vitro*. Os elementos básicos para a reação são: água, solução tampão, o DNA molde, os *primers* (oligonucleotídeos com a sequência do fragmento desejado para amplificação), desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPS), íons de Mg^{2+} e a enzima DNA polimerase termoestável. Após gerar as ampliações, o resultado é visualizado via Eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida acrescido de brometo de etídio. E então a espécie pode ser identificada através da comparação do peso molecular da sequência do fragmento amplificado com o peso molecular descrito para aquele fragmento referência da espécie (Pereira, 2018).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Bioinsumos (LAFIBio) em parceria com o Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia – LAMEB, ambos da Universidade Federal de Sergipe.

3.1. Obtenção do isolado da *Chromobacterium subtsugae*

Uma Placa de Petri contendo a *Chromobacterium subtsugae* (utilizada no inóculo comercial ControlBio Chromobac), foi concedida pela empresa Biomulti Soluções em Agronegócio Ltda. A bactéria foi repicada para duas novas placas contendo o meio de cultura, recomendado e padronizado pela própria empresa, e incubada em BOD por 24h à 28° C.

3.2. Extração de DNA

A extração seguiu o protocolo estabelecido por Gama & Covelho (2016). Foram adicionadas três alças de crescimento bacteriano em microtubos contendo 567 μL de TE 1X e agitado no vórtex. Em seguida foi adicionado 30 μL de SDS a 10% e agitado no Vórtex. Posteriormente, foi acrescentado 100 μL de NaCL 5M e agitado em Vórtex. Logo após, adicionou-se 80 μL de CTAB/NaCl, agitado em Vórtex e levado ao banho maria a 65 °C por 1h e 30 min. Em seguida adicionou-se 780 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitado manualmente por 10 min e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm.

O sobrenadante foi removido para novos microtubos e adicionado 600 μL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitado manualmente por 10 min e centrifugado por 5 min a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionado 360 μL de isopropanol gelado. O microtubo foi invertido manualmente até a visualização do DNA e centrifugado a 14.000 rpm por 25 min. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado, restando o pellet de DNA preso no fundo do tubo, adicionou-se 1 mL de etanol a 70% e centrifugado por 3 min a 14000 rpm. Novamente descartou-se o sobrenadante e deixou-se o DNA secar em *overnight* em câmara de fluxo laminar. Em seguida, o DNA foi ressuspendido com 50 μL de tampão TE 0,1X. Esse procedimento foi realizado em quatro repetições por placa.

Foi realizado o teste de integridade das amostras extraídas em eletroforese com gel de agarose a 1%. E para a quantificação e determinação da pureza foi utilizado o

espectrofotômetro Epoch da BioTek Instruments. A pureza foi analisada observando a razão das leituras 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e esperava-se como ideal o valor 1,8. Posteriormente, as repetições foram diluídas para 10 ng/ μ L e armazenadas em freezer a -20 °C.

3.3. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A confirmação da identidade da bactéria utilizando PCR-específico foi realizada através da amplificação do gene 16S rRNA, com *primers* baseando-se no estudo de Martin *et al* (2007), foram testadas duas sequências de pares de *primers* conforme tabela abaixo.

TABELA 1. *Primers* e respectivas sequências da subunidade ribossomal 16S utilizados no estudo.

Primer	Sequência
16SF1 Chromo forward	5'-CCTACGACGTCTTTACGCCC-3'
16SF2 Chormo reverse	5'-GAGGAAATCCCCGCTGGTTA-3'
chromo16SF1 forward	5'-AACGCTGGCGGCATGCTTTACAC-3'
chromo16SF2 reverse	5'-GAGGAAATCCCCGCTGGTTA-3'

O protocolo utilizado para o preparo do mix da PCR seguiu as recomendações padrão fornecidas pelo fabricante Taq polimerase Platus. Além disso, foi testado um Mix pronto de PCR comercial. Para obter o controle negativo, empregou-se água ultrapura e as bactérias *Saccharopolyspora spinosa*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus*.

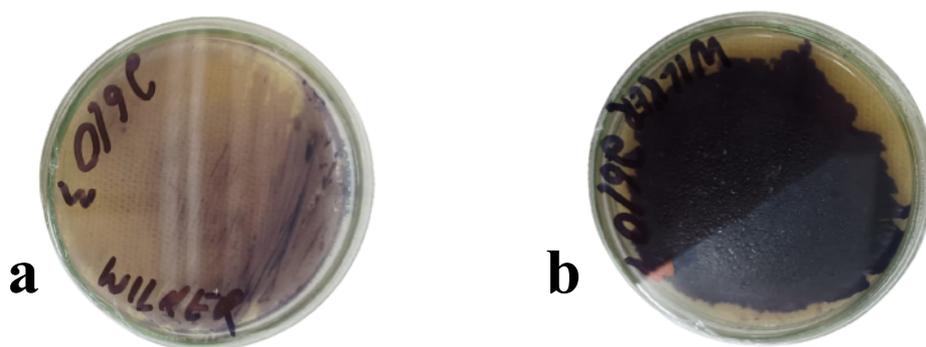
O mix foi preparado com 5,0 μ L de tampão 10x, 2,5 μ L de MgCl (25mM), 0,5 μ L de dNTP (10mM), 1,0 μ L de Primer R (10 μ M) e 1,0 μ L de *Primer* F (10 μ M), 0,3 μ L da Taq polimerase Platus, 4,7 μ L de água ultrapura, 5,0 μ L de DNA (10 ng/ μ L). Após o preparo do mix, as amostras foram levadas ao termociclador da GenePro, configurado para 38 ciclos, sendo desnaturação a 96 °C, anelamento a 55 °C e extensão a 72 °C. Em seguida, a eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1%, por 90 minutos a 100 volts. Os pesos moleculares dos fragmentos gerados foram estimados com base em comparação com o marcador molecular 100 pb DNA *Ladder* da Invitrogen.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção da *Chromobacterium subtsugae*

Ao decorrer de um período de 24 horas, as placas exibiram colônias bem desenvolvidas. Entretanto, uma das placas exibia colônias pigmentadas, enquanto a outra apresentava colônias em estágio inicial de pigmentação, conforme ilustrado na Figura 1.

FIGURA 1. Colônias de *Chromobacterium subtsugae* após 24h de repicagem e incubação em BOD a 28 °C. a) Em processo de pigmentação; b) Totalmente pigmentada.



Este resultado está em consonância com o padrão de desenvolvimento observado para esta espécie, conforme relatado por Martin et al. (2007), a equipe responsável pela identificação desta bactéria. Conforme documentado, as colônias inicialmente apresentam uma coloração creme nas primeiras 24 horas e gradualmente evoluem para uma coloração violeta nas 24 horas subsequentes. Vale ressaltar que um ambiente selado com restrição de oxigênio pode influenciar no processo de pigmentação.

4.2 Extração de DNA

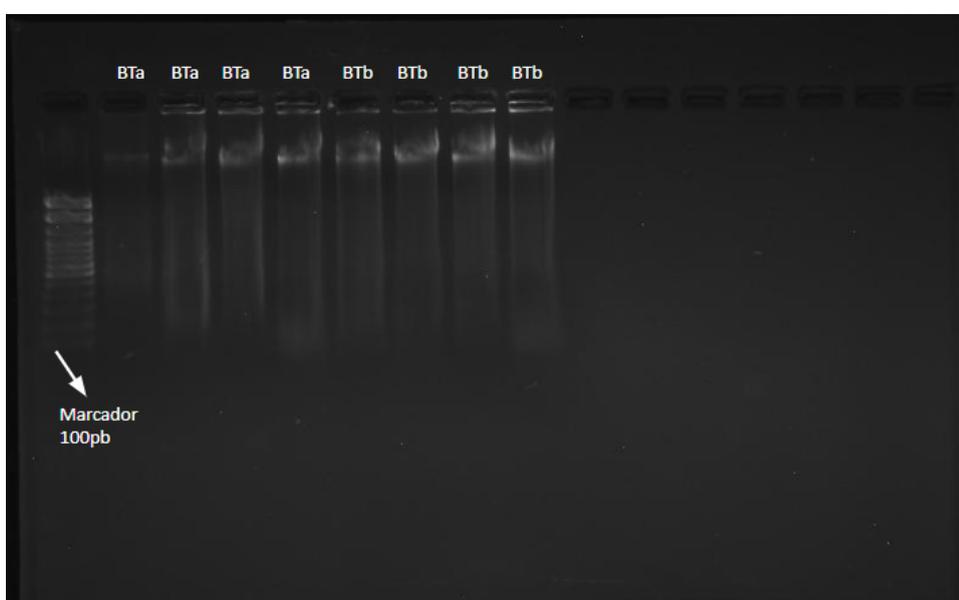
A extração resultou em concentrações substanciais nas repetições, conforme evidenciado na Tabela 2. Entretanto, ao avaliar a razão entre as leituras a 260 e 280 nm, nota-se que esses valores se situam abaixo do ótimo alvo de 1,8. Isso sugere que, de acordo com a pesquisa de Turner *et al.* (1997) citado por Viana *et al.* (2012) as amostras podem estar contaminadas por proteínas. Além disso, é necessário ressaltar que no protocolo original era recomendado a adição da enzima proteinase k, que auxiliaria na degradação das proteínas. Desse modo, essa alteração do protocolo justifica o teor de impurezas encontrado nas amostras.

Ao analisar os resultados do teste de integridade, como mostrado na Figura 2, é possível observar que os valores obtidos na quantificação e no exame de pureza podem explicar o perfil de conformação do DNA no gel. É relevante destacar que a única amostra que atingiu o grau de pureza ideal também se destacou como a única banda no gel de agarose que não exibiu qualquer arrasto.

TABELA 2. Concentrações oriundas do processo de extração de DNA da *C. subtsugae*.

Repetição	Concentração (ng/ μ L)	260/280
BTa	11,9	1,8
BTa	2995,5	1,05
BTa	338,6	1,5
BTa	3628,8	1,11
BTb	3289,0	1,17
BTb	3633,5	1,11
BTb	3616,3	1,15
BTb	3586,4	1,4

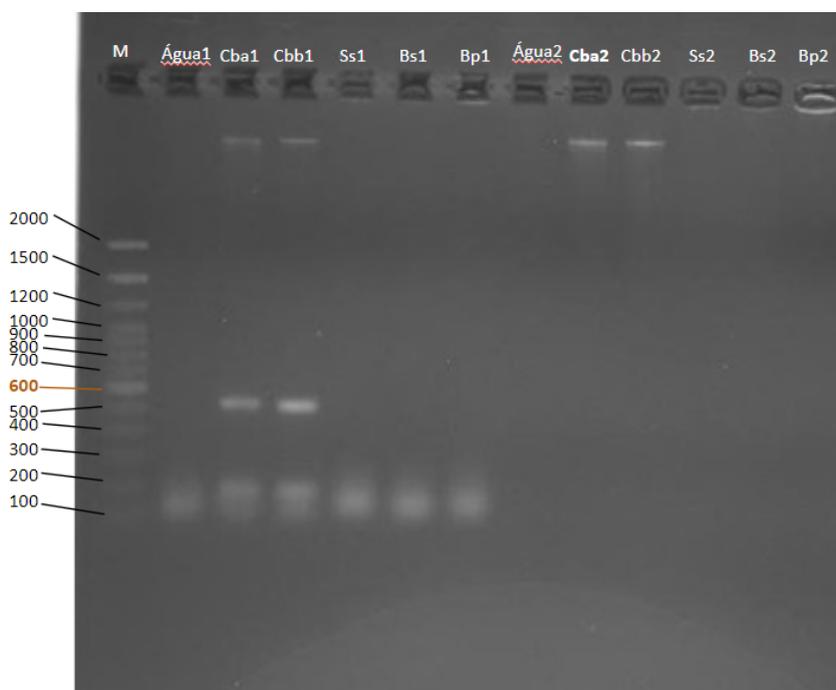
FIGURA 2. Teste de integridade das amostras de DNA.



4.3 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

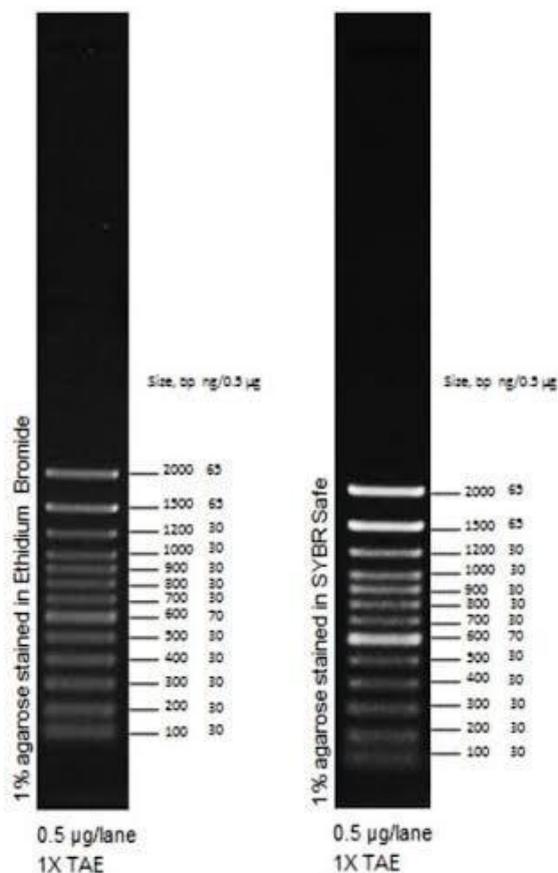
A análise por eletroforese no gel de agarose permitiu constatar que somente o Primer 1 (16SF1 Chromo FORWARD [5'-CCTACGACGTCTTTACGCCC-3'] e 16SF2 Chromo REVERSE [5'-GAGGAAATCCCCGCTGGTTA-3']) foi capaz de efetuar com sucesso a amplificação visando à identificação da bactéria. Além disso, foi possível inferir que os primers não estão contaminados, uma vez que nenhuma amplificação ocorreu na amostra de água, conforme ilustrado na Figura 3.

FIGURA 3. Gel de agarose com o resultado da PCR. Sequência: Marcador - Água1 - ChromoA1 - ChromoB1 - S. spinosa1 - B. subtilis1 - B. pumilus1 - Água2 - ChromoA2 - ChromoB2 - S.spinosa2 - B.Subtilis2 - B.Pumilus2 (Sendo: 1 = Primer 1 e 2 = Primer 2)



Pode-se afirmar que realmente é a *Chromobacterium subtsugae* pois as sequências dos *primers* são as mesmas descrita por Martin *et al.* (2007) e que Voing *et al.* (2017) constataram que esses fragmentos tinham aproximadamente 600pb. Sabe-se que as amplificações obtidas têm essa faixa pois estão alinhadas com os fragmentos do marcador (Figura 4), sendo de mesmo peso molecular.

FIGURA 4. Fragmentos de referência de leader de 100pb da Invitrogen.



Após uma análise da sequência dos *primers* adquiridos, foi observado que o Primer 2 apresentava uma redução de uma molécula de timina em sua sequência, ilustrado na Tabela 3. Este desvio da sequência de referência do gene 16S rRNA, conforme foi sequenciado por Martins *et al.* (2007), estabelece uma distinção e por se tratar de uma PCR-específica, conseqüentemente, representa a principal hipótese para a ineficácia deste *primer* na amplificação.

TABELA 3. Comparação entre sequência do primer recebido. (a) e a sequência relatada por Martins *et. Al.* (2007) (b).

Primer	Sequência	Observações
chromo16SF1 forward	5'-AACGCTGGCGGCATGCTTTACAC-3'	Utilizada no trabalho
chromo16SF1 forward	5'-AACGCTGGCGGCATTGCTTTACA C-3'	Sequência conforme Martins et al. (2007)

Sabe-se que para uma PCR ocorrer perfeitamente, é necessário que a concentração dos compostos atenda às necessidades da DNA polimerase escolhida. A Taq polimerase, é uma enzima que catalisa a síntese do novo DNA complementar a partir dos primers. Dentre as características gerais, as Taq's precisam apresentar termoestabilidade, especificidade, processividade e fidelidade. Em suma, podem ser classificadas como, *proofreading* e *non-proofreading* (Pereira, 2018).

A Taq classificada como *proofreading* é capaz de realizar ampliações sem, ou com poucos, erros na sequência, pois apresentam atividade exonucleásica 3'- 5', essa característica faz com que tenha alta fidelidade à sequência molde. Já a classificada como *non-proofreading*, pode apresentar alguns erros em relação a sequência molde, pois a fidelidade dela é baixa.(Pereira, 2018).

Apesar da Taq utilizada ser classificada como *non-proofreading*, ela é a mais utilizada para reações de detecção de microrganismos, Inclusive, os teores do tampão e de $MgCl_2$ são fatores críticos, pois proporcionam estabilidade no pH e os íons necessários para atuação da enzima. Vale salientar que alta atividade enzimática resulta em bandas inespecíficas ou inativação por baixa quantidade relativa de substrato; e baixas atividades enzimáticas levam a ausência de amplificação (Vieira, 2011).

5. CONCLUSÕES

Com base nas observações decorrentes do estudo em questão, em comparação com dados previamente estabelecidos, pode-se concluir que a metodologia proposta possibilitou a detecção bem-sucedida da bactéria *Chromobacterium subtisugae*. Esta abordagem é promissora para ser incorporada em procedimentos de avaliação do controle de qualidade de bioinsumos em análises rotineiras, representando uma alternativa vantajosa em relação à tradicional identificação e caracterização morfológica. Vale ressaltar que essa metodologia pode ser adaptada para a análise de outros microrganismos, mediante o uso de *primers* específicos projetados para os genes da espécie de interesse.

Adicionalmente, é importante destacar que investigações futuras podem se beneficiar ao explorar os efeitos de diferentes concentrações de DNA e $MgCl_2$, visando encontrar as condições ideais que otimizem a atividade enzimática durante o processo de amplificação.

6. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA CÂMARA DE NOTÍCIAS. Especialistas alertam para riscos da produção de bioinsumos em fazendas. 2021. Disponível em:

<https://www.camara.leg.br/noticias/815055-especialistas-alertam-para-riscos-da-producao-de-bioinsumos-em-fazendas/>. Acesso em: 05 set. 2022.

AGÊNCIA SENADO; Bioinsumos: favoráveis à legislação, debatedores cobram qualidade e controle fitossanitário. 2022. Disponível em:

<https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2022/07/06/bioinsumos-favoraveis-a-legislacao-debatedores-cobram-qualidade-e-controle-fitossanitario>. Acesso em 26 set. 2022.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula.**; tradução: [Ardala Elisa Breda Andrade et al.] Revisão Técnica: Ardala Elisa Breda Andrade, Cristiano Valim Bizarro, Gaby Renard. – 6. ed. – Porto Alegre : Artmed, 2017.

ANGELO, 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. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744098014.pdf>
Acesso em 14 set. 2022

ASOLKAR, R.; HUANG, H.; KOIVUNEN, M.; MARRONE, P.; **Chromobacterium bioactive compositions and metabolites**. Depositante: Marrone Bio Innovations, Inc. Patente EUA 8715754 Washington: Oficina de Patentes y Marcas de EUA. (2015). Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US8715754B2/en>. Acesso em 17 out. 2023

BASTOS, B. G.; LOPES, J. C. J.; GONÇALVES, A. C. N.; NEIVA, K. N.. Bioeconomia, economia circular e agroindústria 4.0: proposições para as transições tecnológicas emergentes. **COLÓQUIO-Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 19, n. 1, jan/mar, p. 312-338, 2022. Disponível em: <https://seer.faccat.br/index.php/coloquio/article/view/2375>. Acesso em: 22 set. 2022

BARCELLOS, F. G.; DELAMUTA, J. R. M.; HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; RIBEIRO, R. A.. Taxonomia Bacteriana – Aspectos Atuais e Perspectivas. In.: YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M. C.; NOGUEIRA, M. A (org.). **Tópicos especiais em microbiologia**. Londrina: UEL / Departamento de Microbiologia, 2015. Disponível em: <https://www.uel.br/ccb/microbiologia/pages/arquivos/Topicos%20Especiais%20em%20Microbiologia%20-%202015%20-%20UEL.pdf> Acesso em: 05 ago. 2022

BATISTA, A. M. M. et al. Microbiological safety of a small water distribution system: evaluating potentially pathogenic bacteria using advanced sequencing techniques. **Water Science and Technology: Water Supply**, v. 18, n. 2, p. 391-398, 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317879546_Microbiological_safety_of_a_small_water_distribution_system_Evaluating_potentially_pathogenic_bacteria_using_advanced_sequencing_techniques. Acesso em 15 set. 2022

BIC PRESS RELEASE. European Bioeconomy 2013: € 2.1 trillion turnover and 18.3 million employees. Bruxelas, 2016. Disponível em: <https://www.european-bioplastics.org/european-commission-2016-report-on-the-bioeconomy/>. Acesso em: 17 outubro 2023.

BOCATTI, Camila Rafaeli et al. Microbiological quality analysis of inoculants based on Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 267-280, 2022. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-021-00649-2>. Acesso em 28 set. 2022.

BLACKBURN, Michael B.; SPARKS, Michael E.; GUNDERSEN-RINDAL, Dawn E. The genome of the insecticidal Chromobacterium subtsugae PRAA4-1 and its comparison with that of Chromobacterium violaceum ATCC 12472. **Genomics data**, v. 10, p. 1-3, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5004236/>. Acesso em: 24 ago. 2022

BRASIL; Transformando Nosso Mundo: A Agenda 2030 Para o Desenvolvimento Sustentável. 2016. Disponível em: https://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/Brasil_Amigo_Pesso_Idosa/Agenda2030.pdf. Acesso em: 10 set. 2022

BRAVO, A.; GILL, S. S.; SOBERON, M. Bacillus thuringiensis mechanisms and use. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Ed.). Comprehensive molecular insect science. New York: Elsevier, 2005. v. 6, p. 175-206. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/285164063_Bacillus_thuringiensis_Mechanisms_and_Use. Acesso em: 18 out. 2023.

BUENO, A. M. C.; TORRES, D. A. P. Governança, Setores e Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) em Bioeconomia a partir do Mapeamento de Atores Internacionais. In.: _____ (org). **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da agenda 2030 e bioeconomia: oportunidades e potencialidades para atuação da Embrapa**. 2022. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1146719>. Acesso em: 05 set. 2022.

BUENO, Adriana Mesquita Corrêa; TORRES, Danielle Alencar Parente. Experiências recentes da União Europeia e dos Estados Unidos em bioeconomia e oportunidades para o Brasil. **Revista Tempo do Mundo**, n. 28, p. 177-208, 2022. DOI: <https://doi.org/10.38116/rtm28art7>. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/revistas/index.php/rtm/article/view/354>. Acesso em: 15 set. 2022

CAO, Beibei et al. The crystal structure of Cry78Aa from Bacillus thuringiensis provides insights into its insecticidal activity. **Communications biology**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-022-03754-6>. Acesso em: 29 set. 2022

CHOI, Su-In et al. The insecticidal potential of Bacillus velezensis CE 100 against Dasineura jujubifolia Jiao & Bu (Diptera: Cecidomyiidae) larvae infestation and its role in the enhancement of yield and fruit quality of jujube (Zizyphus jujuba Miller var. inermis Rehder). **Crop Protection**, v. 163, p. 106098, 2023. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219422001946>. Acesso em: 27 set. 2022

CLARDY, Jon; FISCHBACH, Michael A.; WALSH, Christopher T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1541-1550, 2006.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17160060/>. Acesso em: 02 out. 2022.

CLARRIDGE III, Jill E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 840-862, 2004. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523561/>. Acesso em: 05 out. 2022.

CAUZ, Ana CG et al. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 4, p. 539-549, 2019.

DURÁN, Marcela et al. Potential applications of violacein: a microbial pigment.

Medicinal Chemistry Research, v. 21, n. 7, p. 1524-1532, 2012.

EMBRAPA; Aplicativo Bioinsumos. 2020. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/7227/aplicativo-bioinsumos>. Acesso em: 15/09/2022.

FIGUEIREDO, M. et al. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Recife: Instituto Agrônômico de Pernambuco, 2010.

FONTES, E. M. G.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R. Estratégias de uso e histórico.

In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 06 out. 2022.

GARCÍA, Sabrina Soledad et al. Paraburkholderia tropica as a plant-growth-promoting bacterium in barley: characterization of tissues colonization by culture-dependent

and-independent techniques for use as an agronomic bioinput. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1, p. 89-106, 2020. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/334043598_Paraburkholderia_tropica_as_a_plant-growth-promoting_bacterium_in_barley_characterization_of_tissues_colonization_by_culture-dependent_and_-independent_techniques_for_use_as_an_agronomic_bioinput.

Acesso em: 26 set. 2022.

HARRISON, Alisha M.; SOBY, Scott D. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae*.

AMB Express, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2020. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7648793/>. Acesso em: 16 out. 2022.

HUI, Chang-ye et al. Metabolic engineering of the violacein biosynthetic pathway toward a low-cost, minimal-equipment lead biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 214, p. 114531, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35810697/>. Acesso em: 20 out. 2022.

Hussain, Tassadaq & Roohi, Aneela & Munir, Shahzad & Ahmed, Iftikhar & Khan, Jafar & Edel-Hermann, Véronique & Kim, Kil & Anees, Muhammad. (2013). Biochemical characterization and identification of bacterial strains isolated from drinking water sources of Kohat, Pakistan. **African journal of microbiology research**. 7. 1579-1590.

10.5897/AJMR12.2204. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/236283586_Biochemical_characterization_and_identification_of_bacterial_strains_isolated_from_drinking_water_sources_of_Kohat_Pakistan. Acesso em: 17 out. 2023.

IPEA. **Brasil 2035: cenários para o desenvolvimento**. instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Associação Nacional dos Servidores da Carreira de Planejamento e Orçamento. – Brasília : Ipea : Assecor, 2017. Disponível em:

<https://repositorio.ipea.gov.br/handle/11058/7910>. Acesso em 16 set. 2022.

IWANICKI, Natasha Sant et al. Controle de qualidade de produtos microbiológicos. 2022.

In.: MEYER, Maurício Conrado et al. Bioinsumos na cultura da soja. **Embrapa Soja**, 2022. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1144414/1/Cap-29-Bioinsumos-na-cultura-da-soja.pdf>. Acesso em: 16 out. 2022.

JING, Tian-Zhong; QI, Feng-Hui; WANG, Zhi-Ying. Most dominant roles of insect gut bacteria: digestion, detoxification, or essential nutrient provision?. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1-20, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32178739/>. Acesso em 06 out. 2022.

LANA, U. G. de P.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; VILELA, A. E.; GOMES, E. A.; PIRES, V. L. M.; SOUSA, S. M.; VALICENTE, F. H.. Avaliação da qualidade de inoculantes à base de Bacillus para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema on farm. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 238. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1143636/avaliacao-da-qualidade-de-inoculantes-a-base-de-bacillus-para-promocao-de-crescimento-de-plantas-produzidos-em-sistema-on-farm>. Acesso em 23 set. 2022

LAUMANN, R. A.; SAMPAIO, M. V.; Controle de Artrópodes-praga com Parasitóides. In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 22 set. 2022.

MARTIN, Phyllis AW et al. Chromobacterium subtsugae sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 993-999, 2007. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.64611-0>. Acesso em: 14 out. 2022.

MEJIAS, R. G. Bioeconomia e suas aplicações. **ÂNDÉ: Ciências e Humanidades**, v. 2, n. 3, p. 105-121, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/345423052_Bioeconomia_e_suas_aplicacoes. Acesso em: 21 out. 2022.

MEYER, M. C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed). **Bioinsumos na cultura da soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1143066/bioinsumos-na-cultura-da-soja>. Acesso em: 27 out. 2022.

MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P. R. M.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S.; Controle de Artropodes-praga com Bactérias Entomopatogênicas. In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020a. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 03 set. 2022a.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C. L.; MARTINS, E. S.;... . Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura. 2020b Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1122563>. Acesso em: 17 out. 2023.

MOREIRA, Luciana Fonseca. **Do campo para a indústria química: oportunidades para o Brasil na bioeconomia mundial**. Fundação Getúlio Vargas. 2019. Tese de Doutorado. Disponível em: <https://bibliotecadigital.fgv.br/dspace/handle/10438/26236>. Acesso em: 15 out. 2022.

NASCIMENTO, V. C. et al. Trichoderma: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjb/a/GgZC6GMMpPb8tdhZKrQPg4v/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 23 out. 2022.

NAVIA, D.; CASTILHO, R. C.; MORAES, G. J.; Controle de Artropodes-praga com Ácaros Predadores. In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 17 set. 2022

PINOTTI, Maria Margareth Zamboni; SANTOS, Julio Cesar Pires. Dos primórdios da agricultura ao controle biológico em plantas: um pouco de história. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1797-1803, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/ShHMF9JTtNrJxDSbhLnN9Nm/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 18 set. 2022.

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. Disponível em: <http://icts.unb.br/jspui/handle/10482/46297>. Acesso em: 17 out. 2023.

SILVA, M. F. O.; PEREIRA, F. S.; MARTINS, J. V. B.. **A bioeconomia brasileira em números**. BNDES, 2018. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/15383/1/BS47__Bioeconomia_FECHA_DO.pdf. Acesso em: 13 set. 2022.

SMITH, E. H.; KENNEDY, G. G. History of entomology. In: RESH, V. H.; CARDÂE, R. T. Encyclopedia of insects. 2. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2009. p. 449-585. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/295250359_History_of_Entomology . Acesso em: 16 outubro 2023.

SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; FONTES, E. M. G.; HARTERREITEN-SOUZA, E. S.; FARIA, M. R.; Relações Ecológicas no Controle Biológico. In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 17 set. 2022

SUJII, E. R.; PIRES, C. S. S.; VENZON, M.; FERNANDES, O. A.; Controle de artrópodes-praga com Predadores.In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 17 set. 2022

TEOH, Miao-Ching; FURUSAWA, Go; VEERA SINGHAM, G. Multifaceted interactions between the pseudomonads and insects: Mechanisms and prospects. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 5, p. 1891-1915, 2021. disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33634321/>. Acesso em: 26 out. 2022.

TORRES, D. A.; BUENO, A. M. C.. Breve Panorama da Bioeconomia no Brasil. In.: BUENO, A. M. C.; TORRES, D. A. P. (org). **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da agenda 2030 e bioeconomia: oportunidades e potencialidades para atuação da Embrapa**. 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1142941/objetivos-de-desenvolvimento-sustentavel-da-agenda-2030-e-bioeconomia-oportunidades-e-potencialidades-para-atuacao-da-embrapa>. Acesso em: 15 set. 2023.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12^a** Edição. Artmed Editora, 2017.

United State. **Federal activities report on the bioeconomy: algae**. US Department of Energy (USDOE), Washington DC (United States). Office of Energy Efficiency and Renewable Energy (EERE), 2020. Disponível em: <https://www.osti.gov/biblio/1656710>. Acesso em: 17 outubro 2023.

VALADARES-INGLIS, M. C.; LOPES, R. B.; FARIA, M. R.; Controle de Artropodes-praga com Fungos Entomopatogênicos. In.:FONTES, Eliana Maria Gouveia et al.(org.) **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/212490/1/CBdocument.pdf>. Acesso em: 17 set. 2022

VAN DEN BOSCH, Robert; MESSENGER, Powers Slater; GUTIERREZ, A. P. **An introduction to biological control**. New York: Plenum Press, 1982.

VIANA, J. P. G. et al. Comparação de seis métodos de extração de DNA genômico em Babaçu. In.: **CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS**, 2, 2012, Belém, Pará. Anais do II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/953003/comparacao-de-seis-metodos-de-extracao-de-dna-genomico-em-babacu>. Acesso em: 26 out. 2022.

VIDAL, Mariane C.; SALDANHA, Rodolfo; VERISSIMO, Mario Alvaro Aloisio. Bioinsumos: o programa nacional e a sua relação com a produção sustentável. In.: GINDRI, D. M.; MOREIRA, P. A. B.; VERÍSSIMO, M. A. A. (org.) **Sanidade vegetal: uma estratégia global para eliminar a fome, reduzir a pobreza, proteger o meio ambiente e estimular o desenvolvimento econômico sustentável**. 1. ed. Florianópolis: CIDASC, p. 382-409, 2020. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1130295>. Acesso em 19 set. 2022.

VIEIRA, BSc Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. v. 18, 2011. Disponível em:

https://moodle.ufsc.br/file.php/19765/topico_IV/Principios_da_PCR.pdf. Acesso em: 18 set. 2023.

Vöing K, Harrison A, Soby SD. 2017. Draft genome sequence of *Chromobacterium subtsugae* MWU12-2387 isolated from a wild cranberry bog in Truro, Massachusetts. **Genome Announc** 5:e01633-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01633-16>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5364230/>. Acesso em: 16 set. 2022.

WEINROTH, Margaret D. et al. Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies. **Journal of animal science**, v. 100, n. 2, p. skab346, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35106579/>. Acesso em: 23 out. 2022.

WOESE, Carl R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/>. Acesso em: 19 set. 2022.

WOESE, C. R.; STACKEBRANDT, E.; MACKE, T. J.; Fox, G. E.. A Phylogenetic Definition of the Major Eubacterial Taxa. **Systematic and Applied Microbiology**.1985. 6(2), 143–151. doi:10.1016/s0723-2020(85)80047-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11542017/>. Acesso em: 19 set. 2022