

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CÂMPUS CANOINHAS  
AGRONOMIA

Taila Valéria Müller

**OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS  
APLICADAS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE *Euschistus heros*  
(HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

Canoinhas – SC (2023)

Taila Valéria Müller

**OTIMIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS APLICADAS NO  
CONTROLE BIOLÓGICO DE *Euschistus heros* (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**

Projeto de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Bacharelado em Agronomia do  
Câmpus Canoinhas do Instituto Federal de  
Santa Catarina como requisito parcial à  
obtenção do título de **Engenheiro(a)  
agrônomo(a)**

Orientador  
Dr. Eduardo Henrique Goulin  
Coorientador  
Dr. João Paulo Pereira Paes

Canoinhas – SC (2023)

Taila Valéria Müller

**Otimização e avaliação da eficiência de bactérias aplicadas no controle biológico de  
*Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)**

Este trabalho foi aprovado pela Banca examinadora composta por (Dr. Eduardo Henrique Goulin, Dr. Cícero Venâncio Nunes Jr. e Me. Silas Issamu Shishido) na data (05/06/2023), cujas notas e assinaturas constam em Ata de Defesa/Ficha de Avaliação. Por fim, as considerações propostas pela Banca foram incorporadas no trabalho, estando esse apto para arquivamento.



Dr. Eduardo Henrique Goulin

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por tudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo pelo tempo de dedicação, pela paciência, incentivo e ensinamentos.

Ao meu coorientador Prof. Dr. João, pelo auxílio e incentivo.

Aos meus pais, Leoni e Adilson pelo amor e apoio.

Aos meus amigos e família por toda motivação.

Aos colegas que me ajudaram durante esse trabalho, principalmente as bolsistas dos projetos, Larissa, Amanda e em especial a Rafaela por auxiliar também durante o experimento nos percevejos.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu atingisse esse momento.

## RESUMO

Uma das principais pragas da soja é o percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), causando significativas perdas na cultura, quando esse inseto-praga atinge o nível de dano é necessário o controle, que pode ser o biológico, que além de ser eficiente possibilita reduzir o uso de produtos químicos. Inúmeros inimigos naturais podem ser usados, como bactérias do gênero *Chromobacterium* spp., cuja eficiência já é descrita para controle de insetos-pragas. No entanto, para sua eficiência é necessário utilizar essa bactéria em regiões onde sejam adaptadas, por conta das condições climáticas, sendo a temperatura ótima de crescimento, de acordo com as especificações das empresas especializadas, em torno de 28°C. Assim, valendo-se da engenharia evolutiva, que de forma artificial propicia aos organismos de interesse adaptação às condições desejadas, os objetivos deste trabalho são otimizar cepas de *Chromobacterium* spp. para 16°C, próximo às temperaturas médias mínimas anuais da região do Planalto Norte Catarinense, através de reduções na temperatura de crescimento, a cada geração, e, também, por mutação utilizando luz UV; e avaliar a eficiência da *C. substugae* no controle biológico do *E. heros*. Cepas de produtos comerciais foram coletadas e isoladas, para otimização a temperatura de crescimento é reduzida em 2°C a cada 24h, em meio líquido sob agitação, até 14°C. A cada ciclo de temperatura foram selecionadas cinco colônias, repetindo a metodologia periodicamente. Também, foi realizada a indução de mutação por UV, com três amostras para cada tempo de exposição (0; 1; 3; 5; 10; 15; 20; 30 minutos), após a exposição, foram incubadas em BOD a 18°C. Posteriormente, avaliou-se a eficiência da *C. substugae* no controle de *E. heros*, criados em laboratório, e submetidos a solução concentrada de bactérias com 5 tratamento com 25 repetições. Obtiveram-se cepas de bactérias por otimização e por indução a mutagênese. Através dos ensaios de mortalidade a cepa de *C. substugae* foi eficiente no controle do *E. heros*. Dessa forma, esse trabalho tem grande importância para o controle biológico do *E. heros*, possibilitando que opções de cepas de controle sejam disponibilizadas futuramente para os produtores da região, inclusive com o possível desenvolvimento de novos produtos, especificamente adaptados às condições da região e para usos já estabelecidos, como a multiplicação via a estratégia “on farm”.

**Palavras-chave:** *Chromobacterium substugae*, Inseto-praga, Engenharia Evolutiva.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
2.1 Objetivos gerais.....	7
2.2 Objetivos específicos.....	7
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
3.1. Engenharia evolutiva.....	8
3.2 Controle Biológico.....	9
3.3 <i>Chromobacterium substugae</i> .....	10
3.4 Percevejo-marrom <i>Euschistus heros</i> (Hemiptera: Pentatomidae).....	11
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 Otimização de cepas de bactérias.....	14
4.2 Indução a mutação por luz UV.....	16
4.3 Criação de <i>E. heros</i> .....	17
4.4 Preparo de <i>C. substugae</i> em diferentes meios para o bioensaio.....	18
4.5 Bioensaio da eficiência de bactérias no controle no <i>E. heros</i> .....	19
4.6 Análise estatística dos dados.....	19
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
5.1 Otimização de cepas de bactérias.....	21
5.2 Indução a mutagênese por radiação ultravioleta.....	21
5.3 Bioensaio de eficiência das bactérias no controle biológico do <i>E. heros</i> .....	22
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais problemas na agricultura é a incidência de pragas, causando prejuízos econômicos pela perda de produtividade. Dentre os insetos-pragas da cultura da soja *Glycine max* (L.), um destaque é o percevejo marrom, *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), que causa danos significativos a cultura (JUSTINIANO, 2015; GAZZONI, 1994). No entanto, para ser considerada praga são avaliadas a abundância desses indivíduos e o tipo de lesão que esse inseto causa (GULLAN; CRANSTON, 2017). Quando a incidência do inseto chega ao nível de controle, para soja é de 4 percevejos/m de fileira, é necessária aplicação de táticas para realizar seu controle, que geralmente é realizado o controle químico. Porém, uma alternativa que vem sendo utilizada de forma crescente no país é o controle biológico, esse é eficiente e reduz problemas de contaminações ambientais, além disso, diminui a incidência de resistência dos insetos (SIMONATO, GRIGOLLI, OLIVEIRA, 2014; FONTES, INGLIS, 2020; BORGES, 2021).

O controle biológico tem uma grande relevância como ferramenta do Manejo Integrado de Pragas (MIP) e visa o controle com uso de organismos que são considerados inimigos naturais das pragas. Mas, para seu uso no controle biológico é necessário conhecimento sobre os inimigos naturais, dos possíveis impactos e sobre quais pragas tem eficiência (SIMONATO, GRIGOLLI, OLIVEIRA, 2014).

No mercado há produtos comerciais biológicos para controle de diversas pragas, como o caso de produtos à base de *Chromobacterium* spp., entretanto, esses organismos em específico apresentam temperatura ótima de crescimento em torno de 28°C (Martin *et al.*, 2007).

Dessa forma, torna-se interessante adaptação desses organismos para garantir a viabilidade desse produto considerando diferentes condições de temperatura no país. Com o uso da engenharia evolutiva, que com seleção de modificações genéticas propicia a adaptação de organismos em determinadas condições ambientais (CAKAR *et al.*, 2012), é possível selecionar bactérias do gênero *Chromobacterium* spp. adaptadas as temperaturas próximas as mínimas anuais médias da região do Planalto Norte Catarinense (PNC), e avaliação de sua eficiência no *E. heros*, praga da cultura da soja, possibilitando o uso desses produtos pelos agricultores.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Otimização de microrganismos utilizados no controle biológico através de mecanismos de seleção e mutagênese induzida, seguida de seleção de características agronômicas relevantes.
- Avaliação da eficiência de cepas de bactérias no controle biológico do percevejo marrom *Euschistus heros*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a otimização e seleção de cepas de *Chromobacterium subtsugae* considerando condições de temperatura reduzida.
- Induzir, via radiação ultravioleta (UV), mutagênese em espécies de bactérias *Chromobacterium* spp. a partir de amostras comerciais.
- Selecionar cepas de bactérias com maior taxa de crescimento.
- Avaliar a eficiência de diferentes cepas de *Chromobacterium subtsugae* em diferentes meios no percevejo-marrom *Euschistus heros*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Engenharia evolutiva

Os microrganismos têm grande importância para sociedade, servem como fonte de produtos e processos para uso humano, como fermentação de grãos que gera álcool, substâncias medicinais, como a insulina humana por microrganismos produzidos por engenharia genética, sendo que por anos somente a insulina bovina era utilizada no tratamento de diabetes. Esses organismos são importantes também para decomposição de componentes de petróleo, decomposição de inseticidas e herbicidas utilizados na agricultura e na composição de produtos biológicos (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997).

Variedades específicas de microrganismos são utilizadas e desenvolvidas através de pesquisas para substituir e/ou diminuir substâncias químicas usadas no controle de insetos-pragas. O ato de desenvolver geneticamente microrganismos para finalidades específicas é denominado biotecnologia (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997).

A biotecnologia é qualquer técnica que use de organismos vivos, seja para realização ou modificação de produtos, melhoramento de plantas ou animais, ou desenvolvimento de microrganismos para utilizações específicas, cerca de 12.000 anos a civilização humana tem utilizado de técnicas biotecnológicas desde o princípio da agricultura (RAMALHO *et al.*, 2012).

Através da engenharia evolutiva é possível obter modificações genéticas que codificam determinadas funções biológicas possibilitando a adaptação do organismo nas condições ambientais impostas (CAKAR *et al.*, 2012).

A evolução ocorre por um processo que envolve muitos fatores, dentre esses, a seleção natural. De acordo com a teoria darwinista, os organismos se diferenciaram ao decorrer do tempo, com as mudanças nas características físicas ou comportamentais que trazem vantagens de sobrevivência e reprodução desses indivíduos, que geram descendentes, perpetuando a adaptação na espécie, ou gerando outra espécie. Essas alterações possibilitam que o organismo tenha vantagem adaptativa no ambiente, influenciando sua sobrevivência e reprodução (MANSOUR; TREVISAN; DAGNINO, 2020).

Dessa forma, a seleção tem relação com a adaptação herdada dos organismos, sua sobrevivência e reprodução, agindo com o decorrer do tempo para que os genótipos superiores aumentem sua frequência na população (MANSOUR; TREVISAN; DAGNINO, 2020).

As mutações, fonte da variabilidade genética, podem ser herdadas e são matéria-prima para processos de melhoramento genético, podendo ser espontâneas ou induzidas por agentes mutagênicos (químicos, biológicos ou radioativos) (RAMALHO *et al.*, 2012; PIMENTA, LIMA, 2015). A mutagênese é um processo onde os ácidos desoxirribonucléicos (DNA) de um organismo se modificam, sendo assim uma mutação genética, que é permanente e hereditária no material genético (DURLAND; AHMADIAN-MOGHADAM; 2022). Como resultado da variação gerada por mutação, novas características surgem e podem ser favoráveis ou prejudiciais à capacidade de sobrevivência desse indivíduo, quando as mudanças são favoráveis, selecionam-se as novas características (MANSOUR; TREVISAN; DAGNINO, 2020).

A luz ultravioleta é um tipo de radiação não ionizante mutagênica, com capacidade microbicida se usada com intensidade e tempo de exposição suficientes, no entanto, tem pouca capacidade de penetração, dessa forma o controle microbiano é limitado a superfície (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1997). É possível utilizar essa radiação através de lâmpadas ultravioletas, com comprimento de onda dominante de 254 nm (UV-C) e que contém ação germicida, segundo informações presente no site do fornecedor (OSRAM). A radiação interfere no DNA com lesões, tal como a UV que é um mutagênico físico com capacidade de danificar o DNA, age induzindo a formação de ligações cruzadas entre pirimidinas adjacentes em um dos dois filamentos de polinucleotídeos, o qual forma dímeros de pirimidinas, podendo interferir na transcrição ou replicação do DNA (PIMENTA, LIMA, 2015; BROOKS *et al.* 2014).

### **3.2 Controle biológico**

O controle biológico é um processo de regulação populacional, e pode envolver plantas, espécies fitófagas, parasitas, predadores e entomopatógenos, dessa forma, promovendo o equilíbrio entre os organismos que compõe os ecossistemas (SIMONATO, GRIGOLLI, OLIVEIRA, 2014). Esse processo ocorre naturalmente em qualquer ecossistema sem demandar ação humana. Porém, pode haver interferência do homem, manipulando e facilitando a ação do agente de controle biológico, de acordo com seus interesses, principalmente, econômicos (FONTES, INGLIS, 2020).

O controle biológico, atualmente, tem grande relevância em programas de manejo integrado de pragas (MIP), principalmente, considerando uma produção integrada a uma agricultura sustentável. Com isso, o controle biológico estabelece um dos pilares de sustentação dos programas de MIP, com procedimentos básicos como introduzir, conservar e multiplicar,

constituindo uma opção de estratégia de manejo que pode ser utilizado com outros métodos de controle como o cultural, comportamental, mecânico, resistência de plantas a insetos e químico (principalmente produtos que sejam pouco agressivos), utilizados para garantir manutenção de pragas abaixo do nível de dano econômico (PARRA *et al.*, 2002; ABREU, ROVIDA, CONTE, 2015).

A história do controle biológico se dá no século III a.C., observado pelos chineses que relataram que as formigas predadoras eram capazes de reduzir as populações de pragas existentes em citros. A partir disso, em 1602 foi relatado o primeiro registro do controle biológico com uso de parasitoides, o qual tratava-se do parasitismo da lagarta-das-crucíferas por *Apanteles glomeratu*. Porém, somente no ano de 1888 na Califórnia, nos Estados Unidos, que foi realizado o primeiro caso de controle biológico clássico para o controle da cochonilha ou também chamado de pulgão branco *Icerya purchasi* com a joaninha *Rodolia cardinalis*, que no decorrer de dois anos houve total controle dessa praga (PARRA *et al.*, 2002).

Com a utilização desse método, tem-se a capacidade de reduzir o número de aplicações de inseticidas químicos, além de reduzir o custo de produção e os riscos de contaminação dos recursos naturais, como a água e o solo, porém, para maioria dos agricultores, ainda há um desconhecimento dessas vantagens (SIMONATO; GRIGOLLI; OLIVEIRA, 2014).

Em ambientes agrícolas, quando populações de insetos aumentam com níveis economicamente inaceitáveis e atingindo o status de praga, é possível manejar, conservar ou inserir os inimigos naturais no sistema para realização do controle, possibilitando o uso de forma alternativa aos agrotóxicos, produzindo alimentos mais sustentáveis e a conservação de habitat naturais (FONTES; INGLIS, 2020).

A utilização do controle biológico tem uma ampla relevância como ferramenta do MIP, entretanto, para o controle de uma praga através de inimigos naturais é necessário conhecimento de quais são seus inimigos naturais e dos possíveis impactos, como a redução dos impactos ambientais ou em espécies nativas (SIMONATO; GRIGOLLI; OLIVEIRA, 2014; ERTHAL, 2011).

### **3.3 *Chromobacterium substugae***

A *Chromobacterium substugae*, pertencente ao gênero *Chromobacterium* spp., é uma eubactéria Gram-negativa, com mobilidade flagelar e apresenta coloração violeta, devido à produção de violaceína que ocorre na fase estacionária, podendo ser encontrado no solo e água e contém atividade microbiana contra bactérias gram positivas e negativas. O crescimento ideal

ocorre em temperatura de 25-28 °C. Quanto a faixa de pH ideal varia de 6,5-8,0 com NaCl de 1,5 adicionado ao meio, com pH abaixo de 4,5 e acima de 9,0 ocorre inibição de crescimento (MARTIN *et al.*, 2007; CALVACANTE *et al.*, 2022).

Figura 1 – *Chromobacterium* spp.



Fonte: Autor.

A ação inseticida dessa bactéria acontece por ingestão, sendo eficiente para algumas espécies de diferentes ordens, tais como de Lepidoptera, Coleoptera e Hemiptera. Quanto ao mecanismo de ação provavelmente tem relação com a produção de diversos compostos químicos, tais como pela produção de toxinas termoestáveis e de metabólitos bacterianos. Dentre os metabólitos que essa bactéria faz a sintetização, está o derivado do triptofano violaceína (RUIU *et al.* 2015).

O modo de ação nos insetos ocorre por inibição alimentar, parecendo ser uma combinação de atividades antialimentares e tóxicas, com a mortalidade entre 7 a 10 dias (MARTIN *et al.* 2007). Nas formulações dos produtos disponíveis comercialmente de *C. subtsugae*, o ingrediente ativo é representado pela cepa PRAA4-1 e meios de fermentação utilizados (RUIU *et al.* 2015). No entanto a atividade inseticida da *C. subtsugae* pode ser limitante devido as condições ambientais, a campo essa bactéria pulverizada pode não ter eficiência (CALVIN *et al.* 2021).

### 3.4 Percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

O percevejo marrom *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae), tem cerca de 11 mm de comprimento e coloração marrom, contém no pronoto prolongamentos laterais pontiagudos, considerado o principal percevejo presente na cultura da soja no país (JUSTINIANO,

2015). Espécie rara nos anos 70, e atualmente é a mais abundante. Inseto esse que é nativo da Região Neotropical, tem a cultura da soja *Glycine max* (L.) como hospedeiro principal. Adaptado às regiões mais quentes, sendo considerado mais abundante do Norte do Estado do Paraná ao Centro Oeste Brasileiro (GAZZONI, 1994). No entanto, contém uma ampla distribuição no País, sendo encontrado em diversos estados, como também em Santa Catarina (SARAIVA, LEITE, ORTIZ, 2006).

Figura 2 – Adulto de *Euschistus heros*.



Fonte: Autor.

O desenvolvimento dos percevejos transcorre pelas fases de ovo e ninfa, o qual é composto de cinco estádios (ou também chamado de instares), e adultos. O desenvolvimento das ninfas acontece ao decorrer de 25 dias, a coloração das ninfas é variada com manchas distribuídas pelo corpo. Com longevidade média variando de 50 a 120 dias e número de gerações anuais de 3 a 6, isso depende da região, geralmente os machos são menores que as fêmeas. Ocorre variação quanto à fecundidade de 120 a 170 ovos/fêmea, dependendo da espécie, considera-se que à medida que as fêmeas envelhecem o ritmo de postura reduz. Esses parâmetros biológicos podem ser influenciados pela dieta alimentar do inseto e pela temperatura, ou seja, em soja e a uma temperatura média de 25°C. As oviposições geralmente são realizadas sobre folhas, de 5 a 7 ovos amarelados. As ninfas quando recém eclodidas permanecem sobre os ovos e quando alteram para o segundo instar que iniciam o processo alimentar (GAZZONI, 1994).

Sua ocorrência é ao decorrer da safra da cultura da soja, encontrado nos meses de novembro a abril, e produz três gerações. Após a colheita da soja, alimentam-se de outras plantas hospedeiras, como carrapicho-de-carneiro *Acanthospermum hispidum* DC, girassol *Helianthus annuus* L., e de guandu *Cajanus cajan* (L.) Millsp., dessa forma, sendo capaz de completar a quarta geração, para depois entrar em dormência, ou também chamada diapausa,

até a próxima primavera, protegendo-se da ação dos parasitoides e predadores, esse período favorece também a sua abundância, além de possibilitar que esse inseto sobreviva pelo período desfavorável (maio a novembro) sem se alimentar. Nesse período, de aproximadamente sete meses, é capaz de sobreviver das reservas de lipídios, armazenadas antes do período da diapausa (HOFFMANN-CAMPOS *et al.*, 2000; GAZZONI, 1994).

A colonização do *E. heros* na soja ocorre no final do período vegetativo (V6-V8), nesse período os percevejos saem da diapausa ou de hospedeiros alternativos. Assim, há crescimento da população que provocam danos significativos na fase de enchimento dos grãos (R5-R6) (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Quanto aos danos o *E. heros* se alimentam diretamente das vagens, dessa forma atingindo as sementes, conseqüentemente, prejudicando seriamente o rendimento e a qualidade fisiológica e sanitária dos grãos, além de ocasionar a murcha e má formação dos grãos e vagens, com isso a planta de soja não amadurece normalmente, permanecendo verde durante a época da colheita. Além disso, aspectos fisiológicos, como a viabilidade e vigor, também são afetados, produzindo estames desuniformes e prejudicam a produtividade (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999; MULLER, 2017).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

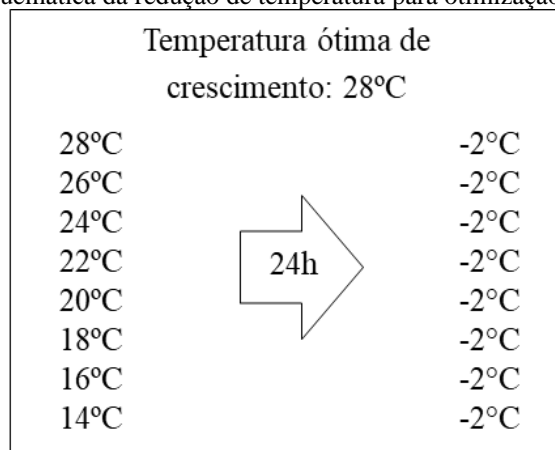
Os experimentos realizaram-se nos laboratórios de Microbiologia e Fitossanidade do Instituto Federal Santa Catarina - Câmpus Canoinhas (-26.183190330349042, -50.36697896062006), seguindo uma ordem de realização, sendo assim, sucederam primeiramente a otimização de cepas de bactérias do gênero *Chromobacterium*, procedendo com a indução a mutação por luz UV e por último o ensaio de eficiência no *E. heros*.

E para metodologias com o uso das bactérias, manutenção e experimento de eficiência das mesmas foram feitos meios de culturas. Simultaneamente aos métodos citados ocorreu a criação dos insetos. Todas as metodologias com as bactérias decorreram em fluxo laminar, a fim de evitar contaminações.

##### 4.1 Otimização de cepas de bactérias

A otimização iniciou-se com cepas de bactérias de *C. subtsugae* isoladas de amostras comerciais (estoque de microrganismos do laboratório de microbiologia do centro de citricultura “Sylvio Moreira”), com temperatura ótima de crescimento a 28°C, quais foram coletadas do “*on farm*”<sup>1</sup>. Dessa forma, na temperatura de 28°C a cada 24 horas reduzindo 2°C, seguindo esse procedimento até a temperatura desejada de 14°C, conforme figura 3. Esse processo ocorreu considerando a média da temperatura mínima anual da região, a qual é 16°C, dado referente à estação meteorológica de Major Vieira (Instituto Nacional de Meteorologia, 2021).

Figura 3 – Representação esquemática da redução de temperatura para otimização de cepas de bactérias.



Fonte: Autor.

<sup>1</sup> Produção de insumos biológicos para utilização própria nas propriedades agrícolas, que ocorre pela replicação de produtos comerciais ou pré-inóculos ofertados por empresas especializadas (EMBRAPA, 2021).

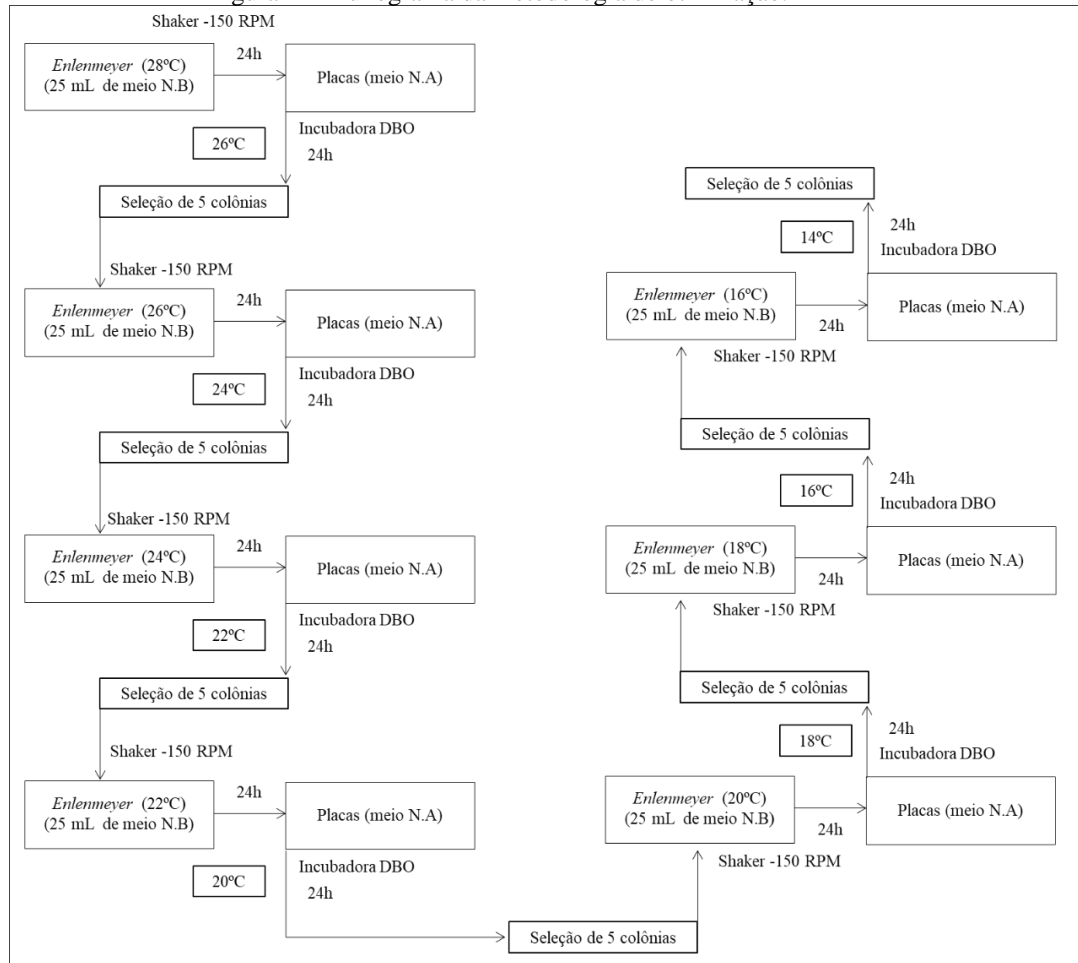
De maneira descritiva, essa metodologia iniciou-se em um *Erlenmeyer* com meio líquido contendo 25 ml de *Nutrient Broth* (N.B) e inoculado 0,25µL da solução de *C. subtsugae* (28°C). Posteriormente o *erlenmeyer* foi transferido para o agitador *shaker* a 150 rotações por minutos (RPM) com a temperatura de 26°C, permaneceu sob agitação durante 24 horas.

Depois de 24 horas, do conteúdo do *Erlenmeyer* submetido a 26°C inoculou-se 0,25µL em três placas de *petri* contendo *Nutrient Ágar* (N.A). O espalhamento do conteúdo contendo *C. Subtsugae* foi realizado com auxílio de uma alça de *Drigalski*. Posteriormente as placas foram incubadas em incubadora DBO a 26°C durante 24 horas novamente.

Após esse período, com o crescimento das bactérias na temperatura de 26 °C em placas foram selecionados cinco colônias e cada uma transferida com auxílio de uma alça de platina para um *Erlenmeyer* contendo N.B, que totalizará cinco *Erlenmeyer*. Em seguida os *Erlenmeyer* permaneceram em *Shaker* a 150 RPM, a 24°C por 24 horas. Posterior a esse tempo decorrido, realizou-se o espalhamento da solução bacteriana em 15 placas de *petri* contendo N.A (três placas para cada colônia), as quais permaneceram em DBO a 24°C por 24 horas. Metodologia semelhante das técnicas do estudo de Araújo, Rodrigues e Demiate (2023).

A metodologia acima descrita foi realizada periodicamente, de forma a reduzir a temperatura de crescimento das bactérias em 2°C com etapas de agitação e crescimento em DBO, a fim de otimizar seu crescimento na temperatura de 14°C, em conformidade ao esquema seguir (Figura 4).

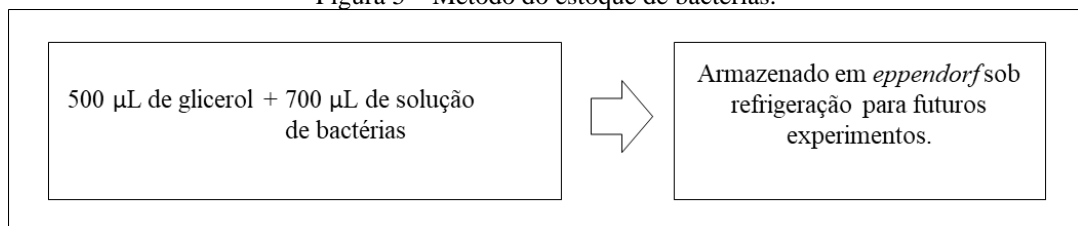
Figura 4 – Fluxograma da metodologia de otimização.



Fonte: Autor.

Ao final de cada rodada de crescimento de *C. subtsugae* nos *Erlenmeyer*, realizou-se o armazenamento do estoque destas, em *ependorf*, utilizando 500  $\mu\text{L}$  de glicerol e 700  $\mu\text{L}$  da solução de bactérias, figura 5 (GIRÃO *et al.* 2004; RUFFATTO, ZIEM, MACIEL, 2021).

Figura 5 – Método do estoque de bactérias.



Fonte: Autor.

## 4.2 Indução a mutação por UV

Primeiramente, realizou-se a preparação das soluções de bactérias. Em um *Erlenmeyer* contendo N.B adicionado 200 $\mu\text{L}$  do estoque de bactérias (temperatura ótima 28°C) e em outro

*Erlenmeyer* adicionado 100µL do estoque de bactérias (temperatura 2°C menor da anterior). Para assim, os dois *Erlenmeyer* permaneceram sob agitação de 150 RPM, em 28°C por 24 horas.

Após esse período, para realização da indução de mutagênese por exposição à luz UV, foi realizada a inoculação de 100µL de solução de *C. subtsugae* em 24 placas de *petri* contendo N.A, com auxílio de uma alça de *Drigalski*. Foram utilizadas três placas de *petri* para cada tempo de exposição, sendo esses: 0 (controle); 1; 3; 5; 10; 15; 20 e 30 minutos. Com uma distância das placas de 15 cm da lâmpada de radiação ultravioleta (marca OSRAM Germicidal – PURITEC HNS 15W G13 G15T8/OF) do fluxo laminar. Por fim, as placas expostas serão incubadas em DBO a 18°C durante 24h. Metodologia adaptada de KANAKDANDE, KHOBRADE, MANE (2021).

Depois esse intervalo de tempo o intuito foi identificar o crescimento de cepas com mutações. Com o crescimento de cepas de bactérias, as colônias foram inoculadas para crescerem em placas, e posteriormente quando constatadas crescimento foram transferidas para *Erlenmeyer* para se desenvolverem durante 24h, com isso possibilitando a realização do armazenamento sob refrigeração do estoque das cepas obtidas (figura 5).

### 4.3 Criação de *Euschistus heros*

A criação de adultos e ninfas de *E. heros* foi realizada no laboratório de Fitossanidade climatizado à temperatura de  $26 \pm 1^\circ \text{C}$ , umidade relativa de  $60 \pm 10 \%$  e foto fase de 14: 10E horas.

O desenvolvimento de adultos ocorreu em recipientes de plástico transparente (4000 ml) com tampa, provida de uma abertura central, fechada com tela de náilon a fim de permitir a ventilação e evitar a fuga dos insetos. No interior das gaiolas foram inseridas telas de tecido algodão (15 cm<sup>2</sup>) que serviram de abrigo e substrato de oviposição.

A dieta natural será composta de amendoim cru, *Arachis hypogaea* (L.), grãos secos de soja, *Glycine max* (L.), vagem frescas de feijão, *Phaseolus vulgaris* (L.) e água.

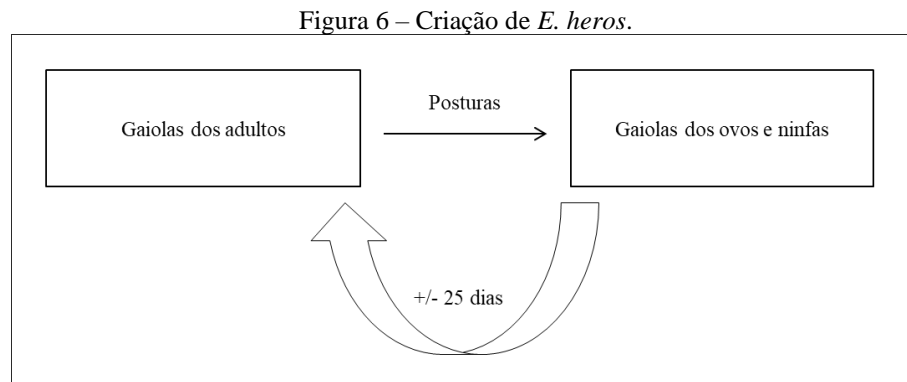
A cada dois dias, foi realizado a coleta de massas de ovos, posteriormente colocados em placas de *petri* (9 cm x 2 cm) forrado com papel filtro e mantidas nas mesmas condições climáticas dos adultos. A fim de evitar a desidratação dos ovos, pedaços de vagens frescas de feijão foram colocados dentro das placas.

Após eclosão das ninfas, entre as fases do 1º e 2º instar eram transferidas para recipientes de plásticos transparentes (900ml) com tampas e com uma abertura central com tela de *voil*. Sendo alimentados com pedaços de feijão vagem, grãos secos de soja e amendoim. Os insetos

foram mantidos nessas gaiolas até a fase adulta para posteriormente serem transferidos para as gaiolas de adultos.

Em todas as fases de criação as gaiolas eram forradas com papel filtro. Na fase adulto a disponibilidade de água foi feita através de algodão e placas de petri, para ninfas o acesso a água era por tubos *Duran* fechados com algodão, ambos foram usados água destilada.

Essa é a metodologia convencional para criar ninfas e adultos de *E. heros*, segundo SILVA, *et al.* (2007).



Fonte: Autor.

#### 4.4 Preparo de *C. substugae* em diferentes meios para bioensaio

O preparo de meios de culturas foi realizado em meio líquido com N.B utilizando duas cepas de *C. substugae* (Cepa 1 e Cepa 2) e primeiramente a *C. substugae* foi inoculada em *Erlenmeyer* com meio de cultura sem sais por 24h.

Após as 24h foram transferidas para outros *Erlenmeyer* com meio de cultura sem sais e com sais, ambos foram colocados no *shaker* a 150 RPM a 28°C, foi utilizado essa configuração em toda essa metodologia citada. Os *Erlenmeyers* com sais permaneceram no *shaker* por 48h para realização da fermentação.

No entanto, nos *Erlenmeyers* sem sais que continham somente meio de cultura após 24h da inoculação da bactéria foi acrescentado sais no meio, para assim ficar 24h fermentando, totalizando 48h.

Para realização do experimento de eficiência foi necessário adicionar cloreto de magnésio e cloreto de sódio no meio de cultura, dessa forma feito dois tratamentos, um com sais adicionados antes de autoclavagem, deixando a bactéria fermentando por 48h (T2 e T4), sendo 0,45g de NaCl e 0,15g de MgCl para 30 mL de meio e outro para adicionar os sais após 24h da *C. substugae* inoculada (T1 e T3) adicionando 0,18 g/mL de NaCl e 0,06 g/mL de MgCl, ambos em 2,5 mL de água destilada cada. Posteriormente adicionado 2,5 mL de MgCl e 2,5

mL de NaCl juntamente com 25mL de meio de cultura e colocado no *shaker* para realizar a fermentação por mais 24h. Metodologia semelhante de Araújo, Rodrigues, Demiate (2023).

Tratamentos:

T1 - Cepa 1: *C. subtsugae* inoculada somente no meio de cultura por 24 h e mais 24h de fermentação com sais;

T2 - Cepa 1: *C. subtsugae* 48h de fermentação com sais;

T3 - Cepa 2: *C. subtsugae* inoculada somente no meio de cultura por 24 h e mais 24h de fermentação com sais;

T4 - Cepa 2: *C. subtsugae* 48h de fermentação com sais;

T5 – Testemunha.

Para o bioensaio com o *E. heros* foi utilizado 1,5ml da solução com concentração de  $8,8 \cdot 10^9$ .

#### **4.5 Bioensaio de eficiência das bactérias no controle *E. heros***

Inicialmente as ninfas de percevejos do terceiro instar foram submetidas a um jejum de 2 horas antes do início da avaliação, devido ao jejum, garante-se a alimentação do inseto da solução com bactérias, visto sua necessidade de alimentação. Após esse período, foram colocados em um tubo *ependorf* 1,5mL de solução concentrada de bactérias (*C. subtsugae*), em meio de cultura líquido, e fechado com algodão. E esse dentro de uma placa de Petri com um percevejo forrados com papel filtro esterilizado. Após 1 hora, os percevejos foram alimentados com vagem de feijão, sua alimentação normal.

Esses indivíduos foram avaliados quanto ao tempo de mortalidade após a exposição à solução bacteriana. Como cada indivíduo caracteriza uma repetição, foram utilizadas, ao menos, 25 repetições para cada tratamento, com 5 tratamentos, utilizados duas cepas de *C. Substugae* (Cepa 1: T1 e T2 e Cepa 2: T3 e T4). Dois tratamentos diferentes para cada cepa, sendo assim dois com a solução contendo as bactérias crescidas com meio acrescido de sais após 24h de crescimento (T1 e T3) e dois tratamentos com a solução com meio e sais juntos desde a inoculação das bactérias (T2 e T4), e a testemunha (água destilada e esterilizada), para realizar a comparação. Para assim, realizar a avaliação da eficiência da toxina resultante do metabolismo secundário da bactéria secretado no meio (MARTIN, HIROSE, ALDRICH, 2007).

#### **4.6 Análise estatística dos dados**

Os dados de mortalidade do *E. heros* foram submetidos ao teste de Qui-quadrado de independência, realizado análise de resíduos padronizados (resíduos de Pearson), com alfa de 5%, pelo software Rstudio (SHARPE, 2015).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização de cepas de bactérias

Através da metodologia de otimização, após seleção por ciclo de crescimento obteve desenvolvimento de cepas de bactérias em todas as temperaturas testadas, principalmente na temperatura de 14°C. Em todas as temperaturas testadas houve seleção de colônias e armazenamento de cinco isolados de cada temperatura.

No entanto, foi necessário um período maior que 24h em temperaturas menores de 20°C, possivelmente ocasionada pelo estresse térmico, já que a temperatura ideal é de 28°C (MARTIN *et al.*, 2007), segundo Cordeiro *et al.* (2013) no trabalho realizado com *C. violaceum*, outra bactéria do mesmo gênero, constatou que a temperatura ótima de crescimento é de 30°C, e temperaturas de 25, 35, 40 °C foram consideradas temperaturas estressantes, pois desencadeia uma proteína de choque térmico, quais podem ser marcadores de estresse térmico ou constitutivas (LOTTERMANN *et al.*, 2003)

A temperatura é um dos principais fatores que influencia o crescimento e reprodutibilidade dos microrganismos, no estudo de Araújo, Rodrigues e Demiate (2023) demonstrou-se que ocorre tendência de aumentar a quantificação de UFC.mL de *C. substugae* com o aumento da temperatura (°C).

Portanto, foi possível obter cepas da *C. substugae* em temperaturas reduzidas, apesar de ser necessário entre 48 a 72h para obter colônias, sendo de grande relevância avaliar a eficiência das diferentes temperaturas em insetos-pragas para compreender se o estresse térmico não influencia na síntese de metabólitos secundários.

### 5.2 Indução a mutagênese por radiação ultravioleta

As mutações interferem na evolução, pois, são fonte da diversidade genética. O estudo da mutagênese em sistemas bacterianos é considerado adequado devido a rápida taxa de crescimento e da disponibilidade de ferramentas experimentais, no entanto, o entendimento dos mecanismos mutagênicos pode ser considerado complicado pelo sistema experimental usado (SCHROEDER *et al.*, 2018).

Com a metodologia de indução a mutação por UV após 48h da exposição, cresceram colônias nos tempos de exposição de 0, 1, 3, 5 e 10 minutos. Obteve crescimento nas três placas do controle, 13 colônias em 1 minuto, 3 colônias em 3 minutos, 1 colônias em 5 minutos e 2

colônias em 10 minutos (tabela 1) demonstrando metabolismo ativo e com capacidade reprodutiva. A radiação U.V causa lesões no DNA induzindo dentro da estrutura do polímero alguns efeitos fotoquímicos, podendo ser benéficos ou deletérios (FRANÇA, 2011).

Em relação a resposta das lesões no DNA, as células influenciam na ativação de respostas que propicia a regulação do ciclo celular e no reparo do DNA, assim evitando danos na replicação ou na mitose. Quando a quantidade de danos nas células ultrapassa a capacidade de reparo, induz as células a morte celular (LIMA, 2005).

Nos experimentos realizados, não houve crescimento nos tempos de 15, 20 e 30 minutos, isso pode ser explicado pelo fato de ocorrer ação da radiação UV-C na célula a que modifica o material genético e causa a não reprodutibilidade, porém, depende do tempo de exposição a radiação para que isso ocorra. A radiação ultravioleta tem capacidade de esterilização e é utilizada há mais que seis décadas com segurança com esse fim em laboratórios, hospitais, clínicas, e indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas e de laticínios (FRANÇA, 2011).

Tabela 1. Crescimento de colônias de *Chromobacterium subtsugae* de acordo com tempo (minutos) de exposição a luz UV.

<b>Tempo de exposição (min)</b>	<b>Crescimento de colônias</b>
0	Nas três placas
1	13
3	6
5	1
10	2
15	-
20	-
30	-

### **5.3 Bioensaio de eficiência das bactérias no controle biológico do *E. heros***

Através dos dados de mortalidade foi avaliado a associação entre os tratamentos com *C. subtsugae* e a mortalidade de percevejo, e houve associação entre os tratamentos ( $X^2 = 12,925$ ;  $p = 0,01165$ ). A análise dos resíduos padronizados ajustados mostrou que há menos mortalidade de percevejo na testemunha e as maiores mortalidade no tratamento *C. subtsugae* de 48h de fermentação com sais (tabela 2).

Tabela 3 - Resultado da associação entre os tratamentos de *C. subtsugae* e mortalidade de *E. heros*. Tratamento 1: Cepa 1 - *C. subtsugae* inoculada no meio por 24 h e mais 24h de fermentação com sais; Tratamento 2: Cepa 1 - *C. subtsugae* 48h de fermentação com sais; Tratamento 3: Cepa 2 - *C. subtsugae* inoculada no meio por 24 h e mais 24h de fermentação com sais; Tratamento 4: Cepa 2 - *C. subtsugae* 48h de fermentação com sais; Tratamento 5: Testemunha.

Tratamentos	Mortos	Vivos
1	-0,934028ns	0,934028ns
2	-0,427223ns	0,427223ns
3	1,749458ns	-1,749458ns
4	2,240605*	2,240605*
5	-2,670866*	2,670866*

Resíduo padronizado ajustado > 1,96 ou < -1,96 -- alfa de 5%.

Como demonstrado, somente o tratamento de *C. subtsugae* de 48h de fermentação com sais que tem diferença. Assim, a cepa 2 teve resultado melhor em comparação com a 1, e quanto ao meio de cultura, o que ficou 48h fermentando com NaCl e NaMg teve maior eficiência no controle do *E. heros* do que o tratamento que ficou 24h.

Tabela 2 – Mortalidade de *E. heros* (%). Tratamento 1: Cepa 1 - *C. subtsugae* inoculada no meio por 24 h e mais 24h de fermentação com sais; Tratamento 2: Cepa 1 - *C. subtsugae* 48h de fermentação com sais; Tratamento 3: Cepa 2 - *C. subtsugae* inoculada no meio por 24 h e mais 24h de fermentação com sais; Tratamento 4: Cepa 2 - *C. subtsugae* 48h de fermentação com sais; Tratamento 5: Testemunha.

Tratamentos	Mortalidade ao decorrer dos dias (%)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	14	15	20
1	0	0	0	0	0	12	12	16	16	16	16	16	16	20
2	4	8	8	16	16	16	16	16	20	20	24	24	24	24
3	16	16	16	20	20	24	24	28	28	36	40	40	40	44
4	12	12	20	28	32	32	32	40	44	48	48	48	48	48
5	0	0	0	4	4	4	4	4	8	8	8	8	8	8

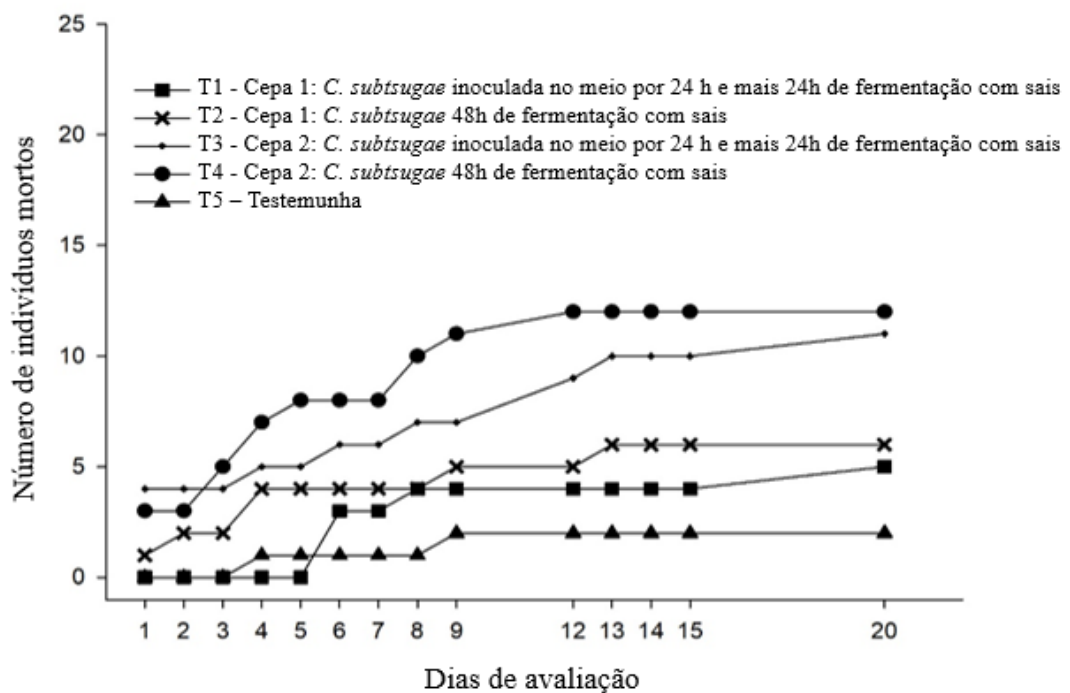
A cepa 2 com 48h de fermentação com sais obteve 48% de mortalidade, apesar de que houve diferença a porcentagem de mortalidade é considerada baixa em comparação com outros estudos aqui citados. Os tratamentos 1, 2 e 3 que não diferiram do controle, apresentaram respectivamente 20%, 24% e 44% e a testemunha 8% de mortalidade (tabela 3).

A *C. subtsugae* produz vários metabólitos secundários, como a violaceína, fornecendo compostos químicos que sozinhos ou em conjunto com outros compostos podem ser utilizados como inseticidas biológicos para controlar insetos-pragas e, assim, reduzir a resistências de

produtos químicos. (BLACKBURN, SPARKS, GUNDERSEN-RINDAL, 2016; KOIVUNEN, 2009).

Segundo Martin *et al.* (2007) a ação da *C. subtsugae* está relacionada com a inibição da alimentação dos insetos, principalmente em estágios de larvas e ninfas. Onde a toxicidade dos metabolitos secundários, como a violaceína, diminui a reprodução e aumenta a mortalidade. Um dos primeiros estudos realizados com a *C. subtsugae* foi identificado por Martin *et al.* (2007) com mortalidades por toxicidade em larvas do besouro da batata do Colorado *Leptinotarsa decemlineata* (say) por inibição da alimentação, onde também foi realizado estudo com outras pragas.

Figura 7 – Evolução de mortalidade do *E. heros* ao decorrer dos dias de avaliação.



Fonte: Autor.

Ocorreu aumento de mortalidade ao decorrer dos dias avaliados, como indicado na figura 7. No tratamento 4, 66,6% da mortalidade ocorreu até o dia 5. Foi possível constatar mortalidade a partir de 24h nos tratamentos 2, 3 e 4, diferente do estudo de Hirose (2005) que *C. subtsugae* mostrou-se eficiente quanto a toxicidade com adultos de *Nezara viridula*, percevejos da mesma família do *E. heros*, a mortalidade iniciou a partir do 4º dia, sendo constatado eficiência tanto para fêmeas como para machos, nesse mesmo estudo foi avaliado se essa bactéria sobrevive e reproduz nas carcaças dos insetos mortos, e através dos resultados, concluiu-se que não. De acordo com Hirose a aplicação prática desta bactéria para o controle do *N. viridula* é difícil por conta de ser por ingestão.

Segundo Carvalho *et al.* (2020), a *C. subtsugae* no controle de *E. heros* adultos não foi eficiente para as condições de produções testadas, e nas doses utilizadas. No entanto, pode ser justificado pelo fato de não ter quantificado a solução das bactérias, e há relação também com a qualidade do material. A toxicidade não tem relação com o número de bactérias na solução, porque o importante é a produção de compostos no processo fermentativo, segundo MARTIN *et al.* (2007).

Outra questão é quanto a metodologia utilizada, tanto quanto ao meio ou ao tempo de fermentação, como no estudo de Carvalho *et al.* (2020), não houve eficiência contra *E. heros*, os autores citam que utilizaram 24h de fermentação, mas, estudos indicam que seria necessário mais tempo de fermentação, e nesse ensaio foi realizado somente 48h de fermentação, principalmente, porque a produção de metabólitos secundários acontece a partir do terceiro dia de fermentação, na fase estacionária segundo o Koivunen (2009) que avaliou a eficiência dessa bactéria na *Spodoptera exigua* e obteve 75% de mortalidade aos 7 dias e 100% após 8 dias.

Martin, Hirose e Aldrich (2007) avaliaram a eficiência da *C. subtsugae* em adultos e ninfas de *N. viridula* (L.) por suspensões bacterianas, para adultos obteve mortalidade de 100% em 6 dias, não sendo necessário bactérias vivas para ter toxicidade. Para as ninfas não foi constatado eficiência, isso porque não se alimentaram do produto líquido de forma consistente.

Segundo GUADAGNIN (2022) produtos comerciais a base de *Bacillus thuringiensis* foram considerados patogênicos para ninfas de 3º instar do *E. heros*, porém, são necessários mais estudos, visto que não há relação desse inseto com a toxicidade da *B. thuringiensis*, principalmente quanto aos potenciais efeitos. Em outro estudo, duas estirpes de *B. thuringiensis* e uma de *B. cereus* foram selecionadas com efeitos de toxicidade ao *E. heros*, com 100% de mortalidade. Além dessas espécies, *B. amyloliquefaciens* e *B. safensis* foram consideradas tóxicas pela primeira vez no *E. heros* (STEFANELLO, 2021).

Visto isso, o uso do controle biológico é uma opção promissora para a produção agrícola, mas, para a comercialização de um inseticida biológico é necessário que seja produzido por fermentação em escala industrial, além disso, sua fermentação deve ter aditivos para aumentar a eficácia do produto, maximizar a aplicação, garantir a estabilidade e qualidade em condições de campo e de armazenamento (KOIVUNEN *et al.*, 2009). Segundo Cavalcante *et al.*, em uma revisão realizada em 2022, foram registrados cerca de 25 insetos e ácaros são controlados pela *C. subtsugae*, presentes na literatura dentre os anos de 2011-2021, dos gêneros Acari, Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Thysanoptera.

Considerando a importância dessa bactéria para produção agrícola, como reportado por Oliveira e Mendes (2022), há carência de estudos com *C. subtsugae* e termos relacionados, como aplicação na agricultura, metabólitos secundários e controle biológico.

## 6. CONCLUSÃO

Portanto, foi possível realizar a otimização da temperatura de crescimento das bactérias e por indução a mutagênese por UV de colônias da *C. substugae*. Dessa forma, foram armazenados cinco isolados de cada temperatura testada, principalmente de 14°C. E, armazenamento de colônias isoladas das placas expostas na radiação UV, nos tempos de exposição de 1, 3, 5 e 10 minutos, respectivamente 13, 6, 1 e 2 colônias. Podendo, assim, desenvolver mais estudos sobre esses microrganismos para testar sua eficiência e qualidade.

Quanto a avaliação de eficiência da *C. substugae* no controle *E. Heros*, nas condições e metodologia testadas, apenas uma estirpe de *C. substugae* foi eficiente apresentando diferença, possivelmente devido as 48h de fermentação, apesar da porcentagem de mortalidade de 48% ser menor em comparação com outros estudos.

Esse trabalho tem grande relevância para o controle biológico do *E. heros*, possibilitando que opções de cepas de controle sejam disponibilizadas futuramente para os produtores da região, inclusive com o possível desenvolvimento de novos produtos, especificamente adaptados às condições da região com eficiência garantida, e para usos já estabelecidos, como a multiplicação via a estratégia “*on farm*”. No entanto, novos estudos complementares são necessários.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O apresentado é de grande importância para produção agrícola, visto a possibilidade de diminuir o uso de produtos químicos e sua aplicação no Manejo Integrado de Pragas. A *C. subtsugae* tem grande destaque no controle biológico por conta do seu potencial inseticida, principalmente pela produção dos metabólitos secundários, novos estudos podem avaliar outros aspectos das bactérias e a sua eficiência em insetos com metodologias diferentes, que podem ser ainda mais eficientes.

Os resultados obtidos das metodologias de otimização e indução a mutagênese podem servir de base para outros estudos, sendo de significativa importância realizar avaliação da eficiência da *C. subtsugae* otimizadas e induzidas a mutagênese por UV em insetos-pragas.

## REFERÊNCIAS

ABREU, J. A. S. de.; ROVIDA, A. F. da S.; CONTE, H. Controle biológico por insetos parasitoides em culturas agrícolas no Brasil: Revisão literária. **Revista UNINGÁ**. v.22, n.2, p. 22-25. 2015. Disponível em:

[https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150501\\_153730.pdf](https://www.mastereditora.com.br/periodico/20150501_153730.pdf). Acesso em: 2 jun. 2022.

ARAÚJO, S. P.; RODRIGUES, S. A.; DEMIATE, I. M. Use of a central rotational composite design for microbiological evaluation of *Chromobacterium subtsugae*. **Revista GEAMA - Ciências Ambientais e Biotecnologia** *Scientific Journal of Environmental Sciences and Biotechnology*. ISSN: 2447-0740. v. 9. n1 p. 04-10, 2023, online version, ISSN: 2447-0740. Disponível em: <https://journals.ufrpe.br/index.php/geama/article/view/5139>. Acesso em: 20 mai. 2023.

BLACKBURN, M. B.; SPARKS, M. E.; GUNDERSEN-RINDAL, D. E. The genome of the insecticidal *Chromobacterium subtsugae* PRAA4-1 and its comparison with that of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **National Library of Medicine – National Center for Biotechnology Information**. 2016. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.08.013. PMID: PMC5004236.

BORGES, S. Z. Como manejar percevejos na cultura da soja. Manejo Integrado de Pragas. Embrapa Agropecuária Oeste. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/63509003/como-manejar-percevejos-na-cultura-da-soja#:~:text=Seu%20n%C3%ADvel%20de%20controle%20C3%A9,bio%20C3%B3gico%20e%20explicou%20as%20vantagens>. Acesso em: 27 jun. 2023.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica**.- Porto Alegre : AMGH, 2014. 26. ed p. 874. ISBN 978-85-8055-335-2.

CAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially importante properties. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 171-182, 2012. ISSN 1567-1364. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2011.00775.x,.

CALVIN, W.; BEUZELIN, J. M.; LIBURD, O. E.; BRANHAM, M. A.; SIMON, L. J.. Effects of biological insecticides on the sugarcane aphid, *Melanaphis sacchari* (Zehntner) (Hemiptera: Aphididae), in sorghum. **Crop Protection**, v.142, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105528>

CARVALHO, W. R. De.; FAVORITO, A. C.; FRANCO, J. A. S.; PIETROWSKI, V. Eficiência de *Chromobacterium subtsugae* no controle do percevejo-marrom *Euschistus heros* (F. 1798) (Heteroptera: Pentatomidae). In: **Encontro Anual de Iniciação Científica, XXIX. Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior, VI**. 2020, Ponta Grossa. Disponível: [https://siseve.apps.uepg.br/storage/eaic2020/10\\_william\\_ribeiro\\_de\\_carvalho-160407663056152.pdf](https://siseve.apps.uepg.br/storage/eaic2020/10_william_ribeiro_de_carvalho-160407663056152.pdf). Acesso em: 04 mai. 2023.

CAVALCANTE, J. K. G.; CONTE, H.; DAQUILA, B. V.; CALEFFE, R. R. T. Biotechnological potential of *Chromobacterium subtsugae*: a short review on the biological

management of pest arthropods. **Ibero-American Journal of Environmental Sciences** - v.13 - n.3. p. 200-211. Mar 2022. DOI: <https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2022.003.0016>.

CORDEIRO, I. B.; et al. Electrophoresis and spectrometric analyses of adaptation-related proteins in thermally stressed *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5057-5071, 2013. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/974472>. Acesso em: 14 mai. 2023.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. Percevejos da soja e seu manejo. **Embrapa soja**, Londrina, PR: EMBRAPA CNPSo, 1999. 45p. (EMBRAPA-CNPSo. Circular Técnica, 24). Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/461048/percevejos-da-soja-e-seu-manejo>. Acesso em: 02 mar. 2022.

DURLAND, J.; AHMADIAN-MOGHADAM. Genectis, Mutagenesis. 2022. **StatPearls**. Disponível em: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/25408>. Acesso em: 10 mai. 2023.

EMBRAPA. Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm) – Esclarecimentos Oficiais. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 2021. Disponível em: [https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset\\_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false](https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false). Acesso em: 03. Jul 2022.

ERTHAL, M. Jr. Controle biológico de insetos pragas. I Seminário Mosaico Ambiental: Olhares sobre o Ambiente. 2011. Disponível em: <https://editoraessentia.iff.edu.br/index.php/sMosaicoAmbiental/article/view/2180>. Acesso em: 27 jun. 2023.

FONTES, E. M. G.; INGLIS, M. C. V. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília-DF: Embrapa, 2020. 510 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos/publicacoes/livro-controle-biologico-de-pragas-da-agricultura-embrapa-2020>. Acesso em: 08 mar. 2022.

FRANÇA, F. L. Dispositivo fotônico orgânico para monitoramento de UVC. Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Bianchi. 2011. **Tese (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Ouro Preto**. Escola de Minas. Rede Temática em Engenharia de Materiais. Ouro Preto, p. 97, 2011. Disponível em: <http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/3035>. Acesso em: 03 mai. 2023.

GAZZONI, D. L. **Manejo de pragas da soja: uma abordagem histórica**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo / Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994.72p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/449293/manejo-de-pragas-da-soja-uma-abordagem-historica>. Acesso em: 02 jun. 2022.

GIRÃO, M. D.; DO PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822004000300007>.

GUADAGNIN, J. P. *Bacillus thuringiensis* É PATOGÊNICO AO PERCEVEJO-MARROM-DA-SOJA?. **Monografia (Bacharelado em Agronomia). Universidade Tecnológica Federal do Paraná.** p. 40, Dois vizinhos. 2022. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/31107/1/baciluspatogenicopercevejosoja.pdf>. Acesso em: 14 mai. 2023.

GULLAN, P. J. ; CRANSTON, P. S. **Insetos - Fundamentos da Entomologia.** 5. ed. Rio de Janeiro- RJ: Grupo GEN, Roca, 2017.

HIROSE, E. Estudo de Simbiontes associados a *Nezara viridula* (L.) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). Orientador: Dr. Antônio Ricardo Panizzi. **Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Paraná.** Curitiba, p. 139, 2005. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/34747/R%20-%20T%20-%20EDSON%20HIROSE.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 03 mai. 2023.

HOFFMANN-CAMPO, C. B. H.; MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R. CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. de. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: **Embrapa Soja**, 2000. 70p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.30). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/449719>. Acesso em: 2 jun. 2022.

INMET. Dados históricos anuais. **Instituto Nacional de Meteorologia, Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**, 2021. Disponível em: <https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>. Acesso em: 12 jun. 2022.  
JUSTINIANO, W. Percevejos e inimigos naturais na cultura da soja. **Informativo de desenvolvimento tecnológico.** Technology Development. Agrônômico Ano 4. n. 4, out 2015. p. 7. Disponível em: [http://www.roundupreadyplus.com.br/2018/wp-content/themes/rrplus/assets/boletins/artigo\\_09.pdf](http://www.roundupreadyplus.com.br/2018/wp-content/themes/rrplus/assets/boletins/artigo_09.pdf). Acesso em: 08 mar. 2022.

KANAKDANDE, P. K.; KHOBRADE, C. N.; MANE. R. S. Ultraviolet induced random mutagenesis in *Bacillus amyloliquefaciens* (MF510169) for improving biodiesel production. **Combustível. Ciência e tecnologia de Combustíveis e Energia.** v. 304. 2021.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121380>.

KOIVUNEN, M; CHANBUSARAKUM, L. F.; ASOLKAR, R.; TAN, E.; WALLNER, D.; MARRONE, P. Development of a new microbial insecticide based on *Chromobacterium subtsugae*. **Insect Parasitic nematodes**, v. 45, p. 183- 186, 2009.

LIMA, L. C. De. A. Resposta a danos no DNA após exposição à luz ultravioleta: apagando o fogo antes do incêndio celular. **Revista da Biologia.** São Paulo, 14(1): p. 6-16, 2015. DOI: 10.7594/revbio.14.01.02.

LOTTERMANN, A.; RANZOLIN, A.; MÜHLEN, C. A. V.; STAUB, H. L. Antibodies to heat-shock proteins, autoimmunity and atherosclerosis. **Revista Brasileira Reumatologia.** , v. 43, n. 5, p. 302-8, set./out., 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/6gWFtVKHwLnjqFcvWBB5TqQ/?lang=pt#>. Acesso em: 20 mai. 2023.

MANSOUR, E. R. M.; TREVISAN, G. L.; DAGNINO, A. P. A. **Genética**. Porto Alegre: SAGAH, 2020.

MARTIN, P. A. W.; HIROSE, E.; ALDRICH, J. R. Toxicity of *Chromobacterium subtsugae* to Southern Green Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) and corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Biological and microbial control**, v. 100, p. 680–684, 2007. DOI: 10.1603/0022-0493(2007)100[680:tocsts]2.0.co;2

MARTIN, P. A. W.; GUNDERSEN-RINDAL, D.; BLACKBURN, M.; BUYER, J. *Chromobacterium subtsugae* sp. nov., a betaproteobacterium toxic to Colorado potato beetle and other insect pests. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 993-999, 2007. DOI: 10.1099/ijs.0.64611-0.

MONNERAT, R. G.; QUEIROZ, P. R. M.; MARTINS, E. S.; PRAÇA, L. B.; SOARES, C. M. S.. Controle de artrópodes-praga com bactérias entomopatogênicas. In: FONTES, E. M. G.; VALADARES, M. C. I. **Controle biológico de pragas da agricultura**. Brasília: Embrapa, 2020. p.167-200.

MULLER, D. *et al.* Controle de percevejo-marrom com uso de produtos químicos e biológicos. **II Congresso Internacional das Ciências Agrárias – COINTER – PDVAgro 2017**. p. 10. Disponível em: <https://cointer-pdvagro.com.br/wp-content/uploads/2018/02/CONTROLE-DE-PERCEVEJO-MARROM-EM-SOJA-COM-O-USO-DE-PRODUTOS-QU%C3%8DMICOS-E-BIOL%C3%93GICOS.pdf>. Acesso em: 09. mar 2022.

OLIVEIRA, J. A. DOS. S. DE.; MENDES, W. M. *Chromobacterium subtsugae* como fonte de metabólitos inseticidas e acaricidas: uma alternativa eco-friendly. **Periódicos São Lucas**. Saber científico: Porto Velho. v. 10 n. 1 p. 1-7. 2022. Disponível em: <http://periodicos.saolucas.edu.br/index.php/resc/article/view/1764>. Acesso em: 03 mai. 2023.

OSRAM. **HNS 15 W G13**. OSRAM: Aplicações Profissionais e Industriais. 2023. Disponível em: [https://www.osram.com.br/ecat/PURITEC%20HNS%20UV-C-UV-C%20lamps%20for%20purification-L%C3%A2mpadas%20ultravioletas-Industry-Illumina%C3%A7%C3%A3o%20especial/br/pt/GPS01\\_1028570/ZMP\\_4021025/](https://www.osram.com.br/ecat/PURITEC%20HNS%20UV-C-UV-C%20lamps%20for%20purification-L%C3%A2mpadas%20ultravioletas-Industry-Illumina%C3%A7%C3%A3o%20especial/br/pt/GPS01_1028570/ZMP_4021025/). Acesso em: 29 jun. 2023.

PARRA, J. R. P.; *et al.* **Controle biológico: Terminologia. Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores** (pp.1-16) 1. ed. Capítulo 1, Editora: Manole, 2002. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/318826631\\_Controle\\_Biologico\\_Terminologia\\_in\\_portuguese](https://www.researchgate.net/publication/318826631_Controle_Biologico_Terminologia_in_portuguese). Acesso em: 2 jun. 2022.

PELCZAR M. J. JR.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, 2. Ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 1997.

PIMENTA, Célia Aparecida M.; LIMA, Jacqueline Miranda de. **Genética Aplicada à Biotecnologia**. São Paulo: Editora Saraiva, 2015. p. 112. 1. ed. *E-book*. ISBN 9788536520988. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536520988/>. Acesso em: 22 mai. 2023.

RAMALHO, M. A. P. *et al.* **Genética na agropecuária**. 5. ed. revisada. Lavras-MG: Editora UFLA 2012.

RIBEIRO, F. de C.; ROCHA, F. de S.; LEMUS ERASMO, E. A.; DE MATOS, E. P.; DA COSTA, S. J. Manejo com inseticidas visando o controle de percevejo marrom na soja intacta. **Revista de Agricultura Neotropical**. , v. 3, n. 2, pág. 48–53, 2016. DOI: 10.32404/rean.v3i2.1132.

RUFFATTO, K.; ZIEM, J. H.; MACIEL, M. J. Avaliação da viabilidade de células fúngicas em diferentes tipos de armazenamento. **Univates. Estudo e Debate**. v. 28, n. 2. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.22410/issn.1983-036X.v28i2a2021.2638>.

RUIU, L. Insect Pathogenic Bacteria in Integrated Pest Management. **Insects**. v. 6, n. 2 p. 352–367. 2015. DOI: 10.3390/insects6020352.

SARAIVA, O. F.; LEITE, R. M. V. B. de. C.; ORTIZ, J. L. Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil (27.: 2006: Uberaba, MG). **Resumos da Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**. Londrina: Embrapa Soja: Fundação Meridional: Fundação Triângulo, 2006. 478p. - (Documentos! Embrapa Soja, ISSN 1516-781X: n.272).

SCHROEDER, J. W.; YEESIN, P.; SIMMONS, L. A.; WANG; I. D. Sources of spontaneous mutagenesis in bactéria. **National Library of Medicine PMC PubMed Central**. 2018. v. 53. n.1 p. 29–48. DOI: 10.1080/10409238.2017.1394262.

SHARPE, D. Chi-Square Test is Statistically Significant: Now What? **Practical Assessment, Research, and Evaluation**. V. 20, n 8. 2015. DOI: <https://doi.org/10.7275/tbfa-x148>

SILVA, C. C.; *et al.* Otimização da técnica de criação de *Euschistus heros* para a multiplicação do parasitoide de ovos, *Telenomus podisi*. **Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia: Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**. 2007. p. 19. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/189407/otimizacao-da-tecnica-de-criacao-de-euschistus-heros-para-a-multiplicacao-do-parasitoide-de-ovos-telenomus-podisi>. Acesso em: 09 mar. 2022.

SIMONATO, J.; GRIGOLLI, J. F. J.; OLIVEIRA, H. N. Controle Biológico de insetos – pragas na soja – Controle Biológico. **Capítulo 08: Tecnologia e Produção: Soja 2013/2014**. p. 179-192. Jan 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/985985/control-biologico-de-insetos-praga-na-soja>. Acesso em: 09 mar. 2022.

STEFANELLO, A. M. SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Bacillus* spp. TÓXICAS A *Euschistus heros* (Fabricius, 1798). **Mestrado em Agronomia (Tese). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília**. p.69, Brasília. 2021. Disponível em: [https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/43085/1/2021\\_AmandaMichelStefanello.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/43085/1/2021_AmandaMichelStefanello.pdf). Acesso em: 14 mai. 2023.