

**VINÍCIUS MONTEIRO FERREIRA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEMATICIDA *IN VITRO* DE FORMULAÇÕES  
COMERCIAIS À BASE DE *BACILLUS* SPP.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Artur Kanadani Campos

Coorientador: Alexmiliano Vogel de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

Ferreira, Vinícius Monteiro, 1995-

F383a Avaliação do potencial nematicida *in vitro* de formulações  
2021 comerciais à base de *Bacillus* spp / Vinícius Monteiro Ferreira. –  
Viçosa, MG, 2021.  
1 dissertação eletrônica (101 f.): il.

Orientador: Artur Kanadani Campos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Veterinária, 2021.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.205>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Bacillus*. 2. Nematoda - Controle biológico. 3.  
*Metarhabditis*. I. Campos, Artur Kanadani, 1975-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 579.362

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 2523

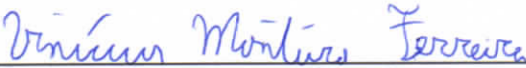
VINÍCIUS MONTEIRO FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEMATICIDA *IN VITRO* DE FORMULAÇÕES  
COMERCIAIS À BASE DE *BACILLUS* SPP.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de setembro de 2021.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Vinícius Monteiro Ferreira  
Autor

  
\_\_\_\_\_  
Artur Kanadani Campos  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter colocado oportunidades e pessoas incríveis na minha vida, desde sempre.

Aos meus pais, por sempre me ter dado todo o suporte e nunca deixarem de acreditar em mim.

À todos os funcionários do Departamento de Veterinária, em especial ao Samuel, Calzinho, Alex e seu Luís, por toda a boa vontade para ajudar e ensinar.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia Artur e Jackson por todos os ensinamentos e motivação desde a graduação.

À todos os estagiários, pós graduandos e residentes por me dar a oportunidade de troca de experiências e crescimento profissional e pessoal.

A minha família e amigos, por toda a motivação e por serem sempre meu porto seguro.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

*“A vida te dá golpes duros, mas é você quem decide se vai se levantar ou não”.*

(Sr. Hunt – Karatê Kid – 2010)

## RESUMO

FERREIRA, Vinícius Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2021. **Avaliação do potencial nematicida de formulações comerciais à base de *Bacillus* spp.** Orientador: Artur Kanadani Campos. Coorientador: Alexmiliano Vogel de Oliveira.

Animais da raça Gir no Brasil e no mundo sofrem frequentemente com otite parasitária externa. Esta doença é causada principalmente por nematoides do gênero *Metarhabditis* spp. e pode causar desconforto, secreções purulentas, sinais neurológicos e morte dos animais, além de queda no desempenho produtivo e reprodutivo no rebanho. Diferentes bactérias do gênero *Bacillus* já possuem ação consolidada no controle de pragas agrícolas e algumas já são comercialmente utilizadas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia de produtos comerciais A, B e C, compostos por *Bacillus* spp. no controle *in vitro* de *Meterhabditis* sp., além dos modelos *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans*. O produto A é constituído por *Bacillus subtilis* QST-713, o produto B de *B. thuringiensis* CCT 1306 e o produto C trata-se de uma associação entre *B. subtilis* CCTB 04, *B. pumilus* CCTB 05 e *Bacillus amyloliquefaciens* CCTB 09. Quando testados contra *C. elegans*, cepa N2, o produto A apresentou DL50 mínima de 0,5 ml/L, dentro de 24h e manteve-se altamente eficaz mesmo quando autoclavado ou diluído em PBS a 5% da concentração original. O produto B apresentou DL50 de 3,1 ml/L, dentro de 24h e manteve a grande eficácia quando autoclavado diluído em concentrações a partir de 10%. O produto C apresentou DL50 169 ml/L, obtida em 48h, tempo máximo que delongou este experimento e apresentou alta eficácia apenas quando foi testado sem ser diluído, autoclavado ou não. Já nos ensaios com *P. redivivus*, o produto A apresentou DL50 mínima de 47 ml/L, observada em 96h e obteve alta eficácia a partir de quando diluído a 25% e mesmo quando autoclavado em concentração máxima. O produto B, obteve DL50 mínima de 165 ml/L, obtida em 120h, tempo máximo que delongou este experimento, e manteve alta eficácia a partir de quando diluído a 50% e quando autoclavado em concentração máxima. O produto C não obteve eficácia significativa. No caso de *Metarhabditis* sp., o produto A apresentou DL50 mínima de 5 ml/L em apenas 24h e permaneceu com máxima eficácia a partir da diluição de 5%, a menor testada, e após autoclavado em concentração máxima. O produto B apresentou DL50 mínima de 2 ml/L em 24h e também apresentou máxima eficácia a partir da

diluição de 5% e no produto autoclavado em concentração máxima. O produto C também não apresentou eficácia significativa no caso de *Metarhabditis* spp. A partir destes resultados, podemos concluir que os produtos A e B podem ser considerados eficientes nematicidas mesmo diluídos ou autoclavados, não só contra *Metarhabditis* spp., mas também contra outras espécies de nematoides. Apesar do produto C não ter se mostrado eficaz contra *Metarhabditis* sp. e ter se mostrado, em geral, com menor potencial nematicida, ele não pode ser completamente descartado para avaliação de nematotoxicidade em outras espécies de importância veterinária.

Palavras-chave: Controle biológico. Nematoides. *Bacillus* spp. *Metarhabditis* spp.

## ABSTRACT

FERREIRA, Vinícius Monteiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2021. **Evaluation of nematicidal potential of comercial formulations based on *Bacillus* spp.** Adviser: Artur Kanadani Campos. Co-adviser: Alexmiliano Vogel de Oliveira.

Gyr breed in Brazil and around the world often suffer from external parasitic otitis. This disease is mainly caused by nematodes of the genus *Metarhabditis* spp. and it can cause discomfort, purulent secretions, neurological signs and death of animals, besides a drop in productive and reproductive performance in the herd. The bacteria genre *Bacillus* are widely used in biological control, as they are highly effective in controlling different agricultural pests. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of commercial products A, B and C compounds of *Bacillus* sp. in the *in vitro* control of *Meterhabditis* sp., in addition to the models *Panagrellus redivivus* and *Caenorhabditis elegans*. Product A consisted of *Bacillus subtilis* QST-713, product B of *B. thuringiensis* CCT 1306 and product C was an association between *B. subtilis* CCTB 04, *B. pumilus* CCTB 05 and *Bacillus amyloliquefaciens* CCTB 09. When tested against *C. elegans*, strain N2, product A had a minimum LD50 of 0.5 ml/L within 24h and remained highly effective even when autoclaved or diluted in PBS at 5% of the original concentration. Product B had a LD50 of 3,1 ml/L within 24 hours and maintained its great efficacy when diluted in concentrations from 10% and after autoclaving. Product C presented DL50 169 ml/L, obtained in 48h, the maximum time that prolonged this experiment and showed high efficacy only when tested undiluted or after autoclaving. In the experiment with *P. redivivus*, product A had a minimum LD50 of 47 ml/L, observed in 96h and obtained high efficacy from when diluted to 25% and even when autoclaved at maximum concentration. Product B obtained a minimum DL50 of 165 ml/L, obtained in 120h, the maximum time that prolonged this experiment, and maintained high efficacy from when diluted to 50% and when autoclaved at maximum concentration. Product C did not achieve significant efficacy. In the case of *Metarhabditis* spp., product A had a minimum LD50 of 5 ml/L in just 24 hours and remained with maximum effectiveness from the 5% dilution, the smallest tested, and after autoclaving at maximum concentration. Product B had a minimum DL50 of 2ml/L in 24h and also showed maximum efficacy from a 5% dilution and in the autoclaved product at maximum concentration. Product C also did not show significant efficacy in

the case of *Metarhabditis* spp. From these results we can conclude that products A and B can be considered efficient nematicides even diluted or autoclaved, not only against *Metarhabditis* sp., but also against other nematode species. Although product C has not been shown to be effective against *Metarhabditis* spp. and having shown, in general, to have less nematicidal potential, it cannot be completely ruled out for evaluation of nematotoxicity in other species of veterinary importance.

Keywords: Biological control. Nematodes. *Bacillus* spp. *Metarhabditis* spp.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. Gado Gir na atividade leiteira	12
2.2. <i>Rhabditis</i> spp. e <i>Metarhabditis</i> spp	12
2.3. Otite parasitária externa	14
2.4. Controle biológico	16
2.5. <i>Bacillus thuringiensis</i>	17
2.6. <i>Bacillus subtilis</i>	19
2.7. <i>Bacillus pumilus</i>	21
2.8. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	22
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

### **Capítulo 1: Avaliação da atividade nematicida de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. contra *Caenorhabditis elegans***

<b>RESUMO</b>	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. Cultivo de <i>C. elegans</i>	40
2.2. Produtos utilizados	41
2.3. Testes de eficácia dos produtos	41
2.4. Análises estatísticas	42
3. RESULTADOS	42
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÃO	52
6. REFERÊNCIAS	52

### **Capítulo 2: Avaliação de eficácia de formulações comerciais à base de *Bacillus* spp. contra os nematoides *Panagrellus redivivus* e *Metarhabditis* spp**

<b>RESUMO</b>	64
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1. Comitê de Ética de Uso de Animais	68

2.2. Produtos utilizados	68
2.3. Testes de eficácia dos produtos contra <i>Panagrellus redivivus</i>	68
2.4. Teste de eficácia dos produtos contra <i>Metarabditis</i> spp	69
2.5. Análises estatísticas	70
3. RESULTADOS	70
4. DISCUSSÃO	82
5. CONCLUSÃO	91
6. REFERÊNCIAS	91
<b>CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quinto maior produtor de leite do mundo. A atividade leiteira tem grande importância econômica e social nacional, já que emprega muitas pessoas em mão-de-obra, além de movimentar financeiramente o mercado de insumos e os laticínios, especialmente em Minas Gerais, maior estado produtor do país (CONAB, 2018; EMBRAPA). Animais de genética zebuína têm grande importância na produção leiteira brasileira, porque conferem ao rebanho rusticidade, fertilidade e vigor (SILVA *et al.*, 2018).

A raça Gir origina o Girolando, quando cruzada com o gado Holandês (SILVA *et al.*, 2018). A raça Gir apresenta grande susceptibilidade à doença chamada otite parasitária externa, que tem como um dos principais agentes etiológicos no Brasil, nematoides do gênero *Metarhabditis* (BARBOSA *et al.*, 2016, SILVA *et al.*, 2016; SOBRAL *et al.*, 2019). A otite parasitária externa é identificada facilmente pela presença de secreção purulenta no pavilhão auricular, mas apresenta variados sintomas, desde portadores assintomáticos, até infecções no sistema nervoso e morte (CARDONA *et al.*, 2012; DUARTE e HANDAM, 2004; LEITE *et al.*, 2013). Diversos tratamentos são utilizados no combate à otite parasitária, mas muitos são ineficazes, a recidiva da doença é comum e os gastos com medicamentos tornam-se altos (LEITE *et al.*, 2012, VEROCAI *et al.*, 2007, VIEIRA *et al.*, 1998).

Os nematoides *Caenorhabditis elegans* e *Panagrellus redivivus* são dois modelos de experimentação animal amplamente utilizados em testes de toxicidade de substâncias (LIU *et al.* 2021; LUBIAN *et al.*, 2019; SALAS *et al.*, 2021; ORTIZ 2021). No entanto, existem diferenças na forma de reprodução, comportamento e preferências por pH e temperatura (FIGUEROA, 2009; HALL *et al.*, 2008; KOLENSKI *et al.*, 2019; STIERNAGLE, 2006). Diferenças de resistência e susceptibilidade entre os dois nematoides a diferentes toxinas, também já foram relatadas em outros trabalhos (BOYD e WILLIAMS, 2003; LAWS *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2003).

Bactérias do gênero *Bacillus* são bactérias gram-positivas, aeróbicas, produtoras de esporos e originalmente saprófitas, mas muito utilizadas como controladores biológicos naturais (GENG *et al.*, 2015; SANCHIS, 2011; VASEEHARAM, RAMASAMY, 2002). Diversos autores encontraram eficácia de *Bacillus* sp. contra diferentes pragas da produção agrícola, além de insetos de importância sanitária e

alguns parasitos de importância médico-veterinária (CHANDRASENA et al. 2017; PINEDA et al., 2011, RITCHIE et al., 2010).

Um dos produtos, abordados nesse estudo, o produto A, é à base de *Bacillus subtilis*, isolado QST-713, na concentração de  $1,3 \times 10^7$  UFC/ml é utilizado na agricultura como fungicida e bactericida. O produto B, é à base de *Bacillus thuringiensis*, subespécie kurstaki, cepa CCT 1306, na concentração  $5 \times 10^{10}$  esporos viáveis/ml, utilizado como inseticida. O produto C, é utilizado como inoculante do solo e promotor de crescimento das plantas. Este produto é formulado à base das bactérias *Bacillus subtilis* CCTB04, *Bacillus amyloliquefaciens* CCTB09 e *Bacillus pumilus* CCTB05, todos na concentração mínima de  $1 \times 10^{11}$  endósporos/ litro. Como alguns autores já encontraram ação nematicida em todas as espécies de *Bacillus* presentes nos três produtos mencionados (ABD- EI- KHAIR et al., 2019; XIONG et al., 2015, WEI et al., 2003), esperamos que estes produtos também tenham eficácia positiva contra os nematoides *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus* e *Metarhabditis* spp.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Gado Gir na atividade leiteira

O Brasil produz cerca de 7% de todo o leite do mundo, o que lhe confere a quinta posição no ranking mundial de produção (EMBRAPA, 2018). Dentre as principais raças produtoras de leite, a raça Gir vem conquistando cada vez mais sua importância. Desde 1993, a produção média de leite em 305 dias de lactação duplicou e o ganho genético nessa característica aumenta cerca de 1% a cada ano (PANETTO, et al., 2019). Do cruzamento do Gir com o gado Holandês, tem-se como produto a raça Girolando. Devido à grande capacidade de adaptação a diversos climas e sistemas, o gado Girolando foi muito bem aceito nos rebanhos brasileiros e atualmente produz 80% do leite nacional (SILVA et al., 2018).

### 2.2. *Rhabditis* spp. e *Metarhabditis* spp.

*Rhabditis* é um gênero do filo nematoda, ordem Rhabditida superfamília Rhabditoidea e família Rhabditidae. Este é um nematoide de porte pequeno, corpo fusiforme com comprimento entre 1 mm e 2,8 mm de comprimento esôfago rhabditiforme e uma pequena cavidade bucal que tem entre quatro e seis lábios curtos, estreitos e duas papilas cada um (TAYLOR; COOP; WALL, 2016; URQUHART et

al.,1998). *Rhabditis* spp. necessitam de sete a oito dias para completar seu ciclo de vida quando crescem em ágar-sangue, se estiverem em temperatura ambiente. Os ovos das fêmeas eclodem no interior do útero e as larvas são liberadas após consumirem todos os tecidos do organismo materno, até que a fêmea seja reduzida a mera cutícula, fenômeno conhecido como endotonquia matricida (MARTINS et al.,1985).

Parasitas gênero *Rhabditis* são saprófitas encontrados em terras úmidas, fezes e material em decomposição (ASIF et al., 2013; CARDONA et al., 2012). Entretanto, existem algumas espécies de importância veterinária: *Rhabditis bovis* é o principal causador de otite parasitária externa, amplamente encontrado em rebanhos da África e alguns países da América do Sul (CARDONA et al., 2010; MSOLLA 1993, OBATOLU, 1999). No Brasil, as espécies descritas foram *Rhabditis freitasi*, *Rhabditis blumi*, *Rhabditis costai* (BARBOSA et al., 2016; MARTINS, 1985; SILVA et al., 2016) que podem causar otite parasitária externa em bovinos das regiões tropicais (BARBOSA et al. 2016; LEITE et al., 2013; SOBRAL et al., 2019). Em raros casos, nematoides do gênero *Rhabditis* podem infectar seres humanos e causar otite (TESCHNER et al., 2014) e diarreia (CAMPOS et al., 2002; MEAMAR et al., 2007; YE et al., 2002).

Em 2004, Thassen et al., classificaram um novo gênero de nematoides na Índia, o *Metarhabditis andrassyana*. Segundo os autores, esse gênero se difere do gênero *Rhabditis* spp. por dentículos com botão de setose sobre as placas metastegostomais, estreitos e fracamente diferenciados, corpo faringeal cilíndrico e faixas de músculos copulatórios. Em 2011, após uma análise detalhada de morfologias, Sudhaus transfere algumas espécies do gênero *Rhabditis* e *Oscheius* para o gênero *Metarhabditis*. Dentre elas estão as espécies *Rhabditis freitasi*, *Rhabditis blumi*, *Rhabditis costai*, as causadoras de otite parasitária no Brasil.

A coleta de *Metarhabditis* spp., nos casos de otite clínica é feita com auxílio de uma zaragatoa (CAMPOS et al., 2009; VEROCAI, 2009; VIEIRA et al., 1998). A zaragatoa, pode ser feita com uma haste de bambu de 15 cm e um chumaço de algodão preso na ponta. Com o auxílio da zaragatoa, executa-se a técnica de swab. O swab é feito por meio de movimentos rotativos dentro do pavilhão auricular. O algodão, com material purulento aderido, é então introduzido em um frasco de aproximadamente 20 mL de capacidade, que é fechado e colocado no sol. Dentro de poucos minutos, os nematoides (se presentes), migram do pus aderido ao algodão

para as paredes do tubo e podem ser vistos a olho nu. Normalmente são encontrados de 1 500 a 13 500 nematoides (LEITE et al., 1993; SOUZA et al., 2008).

Nos casos de otite subclínica, o diagnóstico pode ser realizado por meio de lavados com jatos de água dentro do pavilhão auricular. O líquido recuperado é colocado em um pote fundo preto, onde os nematoides (se presentes) poderão ser vistos a olho nu (LEITE et al., 1994, SOUZA et al., 2008). Em ambos os métodos, o conteúdo obtido nas coletas pode ser conservado em álcool 70%, para o transporte até um laboratório e posterior observação em microscópio estereoscópico. (VEROCAI et al., 2009, SILVA et al., 2016).

### **2.3. Otite parasitária externa**

A otite parasitária é um problema grave e recorrente em rebanhos bovinos das regiões tropicais e subtropicais do mundo que acarreta grandes perdas econômicas. (CARDONA et al., 2012; LEITE et al., 2012; MSOLLA et al., 1993). Este tipo de otite afeta o pavilhão auditivo externo de bovinos de raças zebuínas, por isso é chamado de otite parasitária externa (LEITE et al., 2012; SOBRAL et al., 2019; VEROCAI et al., 2009). Casos de otite parasitária já foram contabilizados em diferentes estados brasileiros. Vieira *et al.* (1998), encontraram uma ocorrência de 78,43% de otite parasitária em rebanhos de gado Gir de Goiás. Duarte *et al.* (2001) encontraram 60,1% dos rebanhos de Gir de Minas Gerais infectados. Já Barbosa *et al.* (2016) encontraram uma prevalência de 71,4% dos rebanhos de gado Gir de toda a região Norte do Brasil.

O principal agente causador da otite em bovinos é o nematoide *Metarhabditis* spp. Entretanto, ainda há relatos de otite externa causada por outros parasitas ao redor do mundo: Os ácaros *Railletia auris* e *Dermanyssus avium*; o carrapato *Otobius magnini*, a larva *Stephanofilaria zahaeri*, e a mosca *Chrysomia bezziana* (DUARTE e HANDAM, 2004). Leite *et al.* (2013) ainda citam a capacidade de potencialização dos efeitos da otite em animais infectados concomitantemente por *Metarhabditis* e *Railletia*.

As raças Gir e Indubrasil são as mais afetadas por esse problema devido a presença de um pavilhão auricular muito longo e penduloso, que forma um microclima, com temperatura e umidade ideais para o desenvolvimento de parasitas (DUARTE et al., 2001; LEITE et al., 1993; VIEIRA et al., 1998). Além disso, essa mesma estrutura auricular favorece um acúmulo de cerúmen que, associada à presença de pelos e

proliferação de outras bactérias, como *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas* spp. e *Streptococcus* spp. Todo esse conteúdo torna-se um importante substrato para a proliferação de parasitas (MSOLA, 1986; VEROCAI et al., 2007). Infecções no meato acústico interno e médio também podem causar otite parasitária no meato acústico externo (ROSEMBERGER e STÖBER, 1993).

Animais com otite parasitária aparentam desconforto e podem apresentar abano frequente da cabeça, bem como coceira nas orelhas com o membro pélvico e perda de apetite (DUARTE e HANDAM, 2004; LEITE et al., 2012). Outros sintomas da doença são inchaço ao redor dos olhos e orelhas, inflamação no linfonodo parotídeo, sensibilidade ao toque, lacrimejamento dos olhos, secreção auricular purulenta de leve a severa. Nos casos mais severos de secreção, esta pode vir acompanhada de mal odor e com presença de moscas (LEITE et al., 2013; SILVA et al., 2016; SOBRAL et al., 2019).

Em situações mais raras, a otite parasitária externa pode também acarretar sintomatologia nervosa. Os principais sintomas são hemiplegia facial e movimentos circulares na direção do lado afetado, dificuldade de mastigação e nos casos mais agravados esses animais se deitam no chão e apresentam movimentos de pedalagem até a morte (BARBOSA et al., 2016; MSOLLA et al., 1993, VEROCAI et al., 2007). Os achados em necropsia mais encontrados são inflamação no meato acústico externo, presença de conteúdo purulento no pavilhão auricular, comprometimento do ouvido médio e interno, ruptura da membrana timpânica, presença de abscesso cerebral e ingurgitamento dos vasos cerebrais (CAMPOS et al., 2009). Além disso, o aumento no intervalo de partos, a diminuição na produção de leite e o aumento dos gastos com remédios podem interferir negativamente na performance econômica dos rebanhos de animais com otite parasitária (MSOLLA et al., 1987; BARBOSA et al., 2016; MSOLLA et al., 1987; VIEIRA et al., 1998).

Alguns animais, especialmente os mais jovens podem ser portadores assintomáticos de otite parasitária externa. Os sintomas tendem a ser mais frequentes à medida em que o animal envelhece (DUARTE e HAMDAN, 2004; LEITE et al., 2013; MSOLLA et al., 2013). A presença de cornos também é um fator agravante para a formação de otite parasitária externa, pois aumentam a compressão do pavilhão auricular e com isso, dificultam a aeração e reduzem a umidade do meato acústico (DUARTE et al., 2001).

Msolla *et al.*, 1993 evidenciam como principal forma de transmissão da otite parasitária os banhos de imersão dos animais em carrapaticidas. Obutolu *et al.* (1999), não só indicam o papel das moscas na transmissão da otite parasitária, como também indicam um crescimento na taxa de infecção nos períodos mais quentes e úmidos do ano em Zimbábue, devido a uma maior população de moscas. Verocai *et al.* (2007) e Leite *et al.* (2012) confirmam a importância das moscas na transmissão de otite parasitária externa no Brasil. Entretanto, outros autores brasileiros (DUARTE, 2001; VIEIRA *et al.*, 1998) não encontraram sazonalidade nas taxas de infecção dos animais por *Metarhabditis* spp.

Existem variados tratamentos recomendados para otite parasitária externa, mas alguns deles são controversos: Msolla *et al.* (1985) reportaram sucesso no tratamento com ivermectina parenteral e tópica, aplicadas simultaneamente. No entanto, Verocai *et al.* (2009) compararam tratamentos ivermectina tópica com albendazol sulfóxido oral e não encontraram resultados positivos em nenhum dos dois tratamentos. Leite *et al.*, (1994), indicaram como tratamento com 100% de eficácia, a lavagem do pavilhão auditivo com solução de água e éter etílico com sulfato de cobre a 2%. Contudo, Vieira *et al.* (2001) comparam a mesma solução de água e éter etílico com pasta de nitrofurazona associada com triclorfon e dimetilsulfóxido e obtiveram baixas eficácias nos dois tratamentos. Msolla *et al.*, (1987) obtiveram bons resultados com banhos de nicotina com toxaphene e Odongo e D´Souza (1989) recomendam o uso de solução tópica de triclorfon e oxitetraciclina. Mesmo assim, o que Leite *et al.* (2012) observaram nas rotinas das fazendas, foi uma predominância da escolha do lavado do pavilhão auricular com soluções de álcool-éter, álcool bórico ou álcool ionizado, com ou sem a adição de antibióticos. Muitos criadores fazem esse lavado de forma preventiva, repetindo-o três a quatro vezes por ano, para evitar a ocorrência de casos mais graves em suas fazendas (DUARTE e HANDAM, 2004).

#### **2.4. Controle Biológico**

Controle biológico define-se pela utilização de antagonistas naturais dos parasitos, para reduzir a carga parasitária a índices que não interferem na produção animal (CARVALHO, 2014). O controle biológico não é feito sobre os estágios internos dos parasitos, mas sim nos vetores, hospedeiros intermediários, hospedeiros paratênicos e parasitos ou estágios de parasitos de vida livre, a fim de diminuir a contaminação ambiental. Da mesma maneira, o controle biológico diminui fontes de

infecção para hospedeiros finais, sem contudo, causar tantos efeitos negativos no ambiente como o controle químico (BENHAMOU et al., 2013; RODRIGUES, 2016; PÉREZ-SANCHEZ, 2018).

Microorganismos selecionados para serem antagonistas naturais devem ser eficientes no combate ao patógeno, sobreviver no ambiente em condições adversas, ser fácil manipulação, fácil de produzir em massas; baixo custo de produção e alto tempo de sobrevivência em formulações comerciais. Além disso, as formulações comerciais também devem oferecer segurança para os produtores, consumidores e animais tratados (MOTA, CAMPOS, ARAÚJO, 2003). O controle biológico pode ser feito por meio de fungos, vírus e bactérias (ABD-ALLA, MEKI, DEMIRBAS-UZEL, 2020; ARAÚJO et al., 2021; WANG, et al., 2021).

## **2.5. *Bacillus thuringiensis***

*Bacillus thuringiensis* são bactérias gram-positivas, aeróbicas formadoras de esporos, produtoras de cristais proteicos durante a esporulação e saprófitas, embora possam ser hospedeiras oportunistas em condições específicas GARCZYNSKI e SIEGEL, 2007; SANCHIS, 2011; WEI et al., 2003). Essas bactérias já foram encontradas em diferentes ambientes, como no solo, raízes, na superfície foliar das plantas, na água fresca, em grãos armazenados e sobre insetos, crustáceos, anelídeos e em mamíferos insetívoros (RAYMOND et al., 2010).

O primeiro relato da utilização de *B. thuringiensis* no controle de pragas foi em 1929 contra mariposa-cigana (*Lymantria dispar*), nos Estados Unidos. A partir daí, agrônomos começaram então a se interessar pela bactéria que tinha propriedades entomopatogênicas e matavam insetos rapidamente, em pequenas preparações. Já a primeira formulação comercial produzida a partir de *Bacillus thuringiensis* foi formulada na França, em 1938, pelo nome “Sporéine” (SANCHIS, 2011, SANCHIS e BOURGET, 2008).

Desde então, várias pesquisas à respeito de *Bacillus thuringiensis* e principalmente suas toxinas, tem sido feitas para o controle de diversas pragas de importância agrícola, dentre elas lagartas, traças, besouros, mariposas e cigarrinhas (CHANDRASENA et al., 2017, LIU et al., 2018). Mais recentemente, *B. thuringiensis* também começaram a ser utilizados para controle de larvas de vetores de doenças de importância médico sanitária, como dengue, malária, elefantíase e leishmaniose (KALIMUTHU et al., 2011; RITCHIE et al., 2010, OSBORN et al. 2007,

WERMELINGHER et al., 2000). No contexto da medicina veterinária, *B. thuringiensis* e suas toxinas também já demonstraram efetividade no controle de estágios ambientais de diferentes nematoides parasitas como *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Nippostrongylus*, *Ancylostoma*, *Trichostrongylus* e *Ostertagia* (KOTZE et al., 2005; PINEDA et al., 2011). Siegel et al. (2001) ainda salienta a segurança, no que diz respeito à toxicidade, dos produtos à base de *B. thuringiensis* para mamíferos. Segundo Lecadet et al. (1999), já foram isolados 69 sorotipos de *Bacillus thuringiensis*. Contudo os sorotipos utilizados comercialmente atualmente são *Bacillus thuringiensis kursakati*, *Bacillus thuringiensis israelenses* e *Bacillus thuringiensis tenebrionis* contra pragas agrícolas da ordem Lepidoptera, Diptera e Coleóptera, respectivamente (YAN et al., 2007).

*Bacillus thuringiensis* produzem cristais de inclusões parasporais, chamados proteínas Cry, ou  $\delta$ -endotoxinas, e as proteínas Cyt. Algumas das toxinas Cry e Cyt penetram com facilidade o parasita pela região da boca, e promovem a degradação de células do epitélio intestinal, por desequilíbrio osmótico e formação de poros nas paredes das células (ABDELMONEEIN e MASSOUD, 2009; CRICKMORE, 2005, TIAN et al., 2007). Dunstand-Guzman et al. (2020) ainda encontraram lesões na cutícula e no útero de nematoides *Ancylostoma caninum*. No entanto, essas toxinas não causam danos a mamíferos, se ingeridas, pois não se ligam a receptores de células intestinais de mamíferos (SIEGAL, 2001).

Existem diversos trabalhos de autores que conseguiram utilizar as proteínas Cry isoladas contra diferentes parasitas, de importância agrícola, médica e veterinária. Liu et al. (2018), utilizaram as proteínas Cry 64Ba e Cry64Ca, contra insetos praga de culturas de arroz, *Laodelphax striatellus* e *Sogatella furcifera*. Cappelo et al., (2006) encontraram bons resultados com a toxina Cry5B no combate ao parasita humano *Ancylostoma ceylanicum*. Lara et al. (2016), obtiveram eficácia com a utilização da proteína Cry 11Aa contra o parasita de ovinos *Haemonchus contortus*. Já as toxinas Cyt tem alvos bem mais específicos que as toxinas Cry, com ação principalmente contra a ordem *Diptera*, como moscas e mosquitos (BRAVO et al., 2007; GOEZ et al., 2007; MAAGD et al. 2003). Recentemente, foi descoberta produção de outros compostos com capacidade nematicida por *B. thuringiensis* como flavanoides, fenóis, terpenos, esteroides, taninos saponinas, alcaloides e lipopeptídeos (MAULUDIA, et al. 2020; ZHENG, 2018). Peng et al. (2016) ainda relataram a ação de metaloproteinases com ação nematicida.

## 2.6. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* é outra bactéria do gênero *Bacillus*, também comumente encontrada no solo e com grande potencial no controle biológico, especialmente por não haver relatos de patogenicidade para seres humanos e outros animais (KISHORE e MUKHERJEE; 2006; MNIF e GHRIB, 2015; NAGÓRSKA et al., 2007). Na agricultura, *B. subtilis* é vastamente utilizado por facilidade de estabelecimento na microbiota do solo. Dessa maneira, ele atinge a rizosfera de muitas plantas do mesmo ambiente e consegue proteger as plantas contra um amplo grupo de pragas, como fungos, nematoides e outras bactérias. Essa característica confere ao *B. subtilis*, o título de bactéria promotora de crescimento de plantas (KUMAR et al., 2011, MENA-VIOLANTE e OLALDE-PORTUGAL, 2007; SIVASTHI et al., 2014;).

Apesar de ser utilizado inicialmente na agronomia, já existem estudos que comprovam a eficácia de *B. subtilis* utilizados em diferentes áreas. Vaseeharan e Ramasamy (2002) obtiveram bons resultados utilizando *B. subtilis* contra *Vibrio* spp., bactéria parasita de camarão. Das e Mukherjee (2006) encontraram potencial de lipopeptídeos de *B. subtilis* contra diferentes estágios larvais do mosquito de importância médico-sanitária *Culex quinquefasciatus*. La Ragione et al. (2001) obtiveram bons resultados no tratamento de *Escherichia coli* em galinhas com uma dose oral de esporos de *B. subtilis*.

Hong et al. (2008) garantem a segurança para a ingestão oral de *Bacillus subtilis* como probióticos, devido a facilidade de colonização do intestino, associada com a não produção de enterotoxinas. Alexopoulos et al. (2004) encontraram melhor conversão alimentar, ganho de peso e qualidade de carcaça em suínos tratados com *Bacillus subtilis* regularmente. Da mesma maneira, Kritas et al. (2006) observaram menor mortalidade de cordeiros e maior produção de leite em rebanhos ovinos sob a administração de *Bacillus subtilis*.

*Bacillus subtilis* também é capaz de produzir antibióticos com diferentes estruturas e atividades (STEIN, 2005). São compostos basicamente de peptídeos de origem ribossomal e não ribossomal, de maneira que a maior parte dos antibióticos contra patógenos de plantas são não-ribossomais, principalmente lipopeptídeos cíclicos (NAGÓRSKA et al., 2007). Os lipopeptídeos cíclicos podem ser classificados em iturinas, fengicinas e surfactinas de acordo com suas características químicas (AHIMOU et al.; ONGENA et al. 2007; ROMERO et al., 2007). Todos esses compostos

preservam sua atividade em altas temperaturas e numa grande variação de pH (RITTER et al., 2018; SOUTO et al., 2004).

O grupo das iturinas engloba as iturinas A, B, C, D e E, as bacilomicinas D, F e L e as micosubtilinas e é reconhecido pelo efeito anti-fúngico, especialmente das iturinas A (BESSION et al., 1978; BESSION e MICHEL, 1987; ESHITA e ROBERTO, 1995). Essas partículas conseguem romper a membrana plasmática de células de fungos e leveduras ao formar pequenas vesículas que se agregam nas membranas e degradam os fosfolípidos (NAGÓRSKA *et al.*, 2007, THIMON et al., 1995). Kavitha et al., (2012) encontraram ação nematicida de iturinas sobre larvas de segundo estágio e redução da eclodibilidade de ovos dos fitonematoides *Meloidogyne incognita*. As iturinas possuem capacidade hemolítica, ou seja, são tóxicas para eritrócitos humanos, a partir de certas doses (ARANDA et al., 2005; BESSION e MICHEL, 1984). No entanto, Aranda et al. (2005), asseguram que as concentrações tóxicas de iturina A são menores que as necessárias para que haja destruição de micélios. Os mesmos autores sugerem ainda a adição de soluções osmóticas junto com as iturinas para combaterem a hemólise, em casos de altas doses.

As fengicinas são lipopeptídeos cíclicos que também apresentam grande potencial fungicida, além de apresentar atividade hemolítica menor que das iturina e surfactinas (DELEU et al., 2008; ONGENA et al., 2007; VANITTAKON et al.; 1986). Elas atuam a partir da ligação à membrana das células-alvo, que causa extravasamento de conteúdo e lise celular, devido à desordens na composição lipídica da membrana (Sur *et al.*, 2018).

As surfactinas são os lipopeptídeos cíclicos com características biosurfactantes, ou seja, têm a capacidade de reduzir a tensão superficial das superfícies alvo (NAGÓRSKA et al., 2007; PEYPOUX et al.; 1999). Essa característica permite ao *Bacillus subtilis* o estabelecimento e colonização de diferentes ambientes, o que favorece a formação de biofilme e maior adesão e ação das bactérias sobre fungos, vírus, nematoides e outras bactérias (AHIMOU et al., 2000; VOLLENBROICH, et al., 1997; WU et al.; 2003). Além disso, o potencial surfactante garante às surfactinas uma capacidade de permeabilização de membrana, através da abertura de canais iônicos em membranas celulares. Essa abertura provoca a perda de conteúdo interno celular e destruição da célula (CARRILO *et al.*, 2003, INÊS e DHOUHA, 2015). A surfactina também possui atividade hemolítica, mas manipulações

genéticas têm sido feitas para a produção de lipopeptídeos menos tóxicos para células humanas (SYMMANK et al., 2002).

### **2.7. *Bacillus pumilus***

*Bacillus pumilus* é mais uma bactéria do gênero *Bacillus* que se apresenta antagonista a importantes pragas da produção agrícola, onde também é considerada uma bactéria promotora de crescimento (ABD-EL-KHAIR et al., 2019; CETINTAS et al., 2018; LEE e KIM, 2016). Na medicina veterinária, *B. pumilus* é usado como probiótico, para combate de infecções bacterianas. Haldar e Gandhi (2016) obtiveram redução na contagem de coliformes fecais em ratos tratados com a cepa B9 de *B. pumilus*. Gao et al. (2017), obtiveram bons resultados ao utilizarem *B. pulmis* como probiótico em camarões infectados com bactérias do gênero *Vibrio*. Opriessnig et al. (2019) observaram não só a redução da carga bacteriana, como também reduziram a severidade das lesões intestinais em leitões infectados com *Lawsonia intracellularis*. Esses autores afirmam que *B. pumilus* tem a capacidade não só de combater o patógeno, como também de impedir a infecção dos enterócitos por *L. intracellularis*.

Essa bactéria atua no controle biológico por meio de diferentes metabólitos e enzimas que possuem ação antifúngica, antibacteriana e anti-helmíntica (ERJAHEE et al., 2020; GAO et al., 2017; SAWALE et al., 2014). No contexto da helmintologia, Oliveira et al. (2007) encontraram atividade nematicida de diferentes cepas de *B. pumilus* contra larvas de *Meloidogyne exigua*. Kumar et al. (2014) encontraram efeito nematostático de três metabólitos produzidos por *B. pumilus* contra adultos da espécie *Pheretima posthuma*. Li et al. (2018) ressaltam a ação do composto guanidina, encontrado na estirpe LYMC-3 de *B. pumilus*, contra larvas do nematoide *Bursaphelenchus xylophilus*. Lee e Kim (2016) atribuem a ação larvicida e ovicida de *B. pumilus* à produção das enzimas proteases e quitinases por essas bactérias. Não há relatos na literatura da utilização de *B. pumilus* no controle de helmintos parasitas de animais.

Kotowicz et al. (2019) estudaram a toxicidade de *B. pumilus* em seu trabalho. Os autores não encontraram ação citotóxica e observaram apenas baixa atividade hemolítica da bactéria em estudos *in vitro* e nenhuma alteração em aparência e comportamento quando essas bactérias foram fornecidas para a ingestão de camundongos. Os mesmos autores ainda ressaltam alta a capacidade de adesão em muco dessas bactérias. Tena et al. (2007) relataram três casos de infecções cutâneas

em humanos, causadas por *B. pumilus*. Todavia, segundo a EFSA (2013), casos de intoxicação por *B. pulmilus* são raros e produtos biológicos formulados a partir dessa bactéria podem ser considerados seguros para mamíferos.

### **2.8. *Bacillus amyloliquefaciens***

*Bacillus amyloliquefaciens* é outra bactéria do gênero *Bacillus* muito utilizada no controle biológico de pragas agrícolas, também considerada uma bactéria promotora de crescimento (BISHT e CHAUHAN, 2020; GAMEZ et al., 2019; SALAM et al., 2018;). Além disso, essa bactéria é considerada segura e não há relatos de infecções por *B. amyloliquefaciens* ou reações a medicamentos à base dessas bactérias em humanos e diferentes espécies animais (BOER e DIDERICHSEN, 1991; EFSA, 2017. EFSA, 2019). Segundo Alguribi et al. (2016), *B. amyloliquefaciens* possui baixos efeitos mutagênico e hemolítico.

Na medicina veterinária, *B. amyloliquefaciens* é utilizado como probiótico, para combate de infecções bacterianas. Hong et al. obtiveram maior ganho de peso e menor conversão alimentar de frangos tratados com *B. amyloliquefaciens* em relação ao grupo controle. Em seu experimento com bezerros e cães adultos, Vazquez-Mendonza et al. (2018) classificaram *B. amyloliquefaciens* um promissor probiótico, com forte ação antimicrobiana. Van der Peet-Schwering et al. (2020), em sua formulação de probiótico com *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* observaram melhor ganho de peso, conversão alimentar e menos casos de infecções no íleo de suínos em diferentes fases de produção.

A ação nematicida, também é reportada na literatura: Messa et al. (2019), em testes *in vitro*, encontraram grande potencial larvicida e ovicida de *B. amyloliquefaciens* contra o nematoide *Meloidogyne javanica*. Castaneda-Alvarez (2015), em sua avaliação de atividade tóxica de diferentes rizobactérias contra estágios juvenis e adultos do nematoide *Xiphinema index*, encontraram produção das enzimas e metabólitos quitinase, protease, lipase, colagenase e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) por *B. amyloliquefaciens*. Jamal et al. (2017) encontraram eficácia no controle do nematoide *Meloidogyne incógnita* por *B. amyloliquefaciens* e identificaram importante atividade nematicida do dipeptídeo cyclo(D-Pro-L-Leu). A alta produção de ácidos graxos voláteis pelo *B. amyloliquefaciens* é um dos fatores responsáveis pela sua atividade nematicida TADIGIRI et al., 2020). Algumas estirpes de *B. amyloliquefaciens* também produzem lipopetídeos cíclicos, como iturina A, fengicina

e surfactina (EFSA, 2017). Não há relatos na literatura da utilização de *B. amyloliquefaciens* no controle de nematoides de importância veterinária.

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A otite parasitária externa é um grande entrave para os criadores de gado zebuíno do mundo. O controle biológico tem como sua principal vantagem reduzir a carga parasitária sem deixar resíduos químicos no ambiente (BENHAMOU et al., 2013; PÉREZ-SANCHEZ, 2018). O presente estudo visa investigar a eficácia de produtos comerciais à base de diferentes espécies de *Bacillus* spp. contra *Metarhabditis* sp. e outros nematoides modelos de experimentação animal.

#### Objetivo Geral

- Avaliar a eficácia dos produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. no controle de *Metarhabditis* spp., *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans* em condições de laboratório.

#### Objetivos específicos

- Comparar a susceptibilidade de *Metarhabditis* spp. em relação a *P. redivivus* quando submetidos ao tratamento com os produtos comerciais à base de *Bacillus* spp.;
- Avaliar o tempo ótimo para a maior eficácia dos três produtos comerciais a base de *Bacillus* spp contra *Metarhabditis* spp., *P. redivivus* e *C. elegans*, em condições de laboratório.
- Encontrar a DL50 necessária dos três produtos à base de *Bacillus* spp. para os nematoides *Metarhabditis* spp., *P. redivivus* e *C. elegans*, em condições de laboratório.
- Observar se os três produtos conseguem manter a eficácia após diluídos ou autoclavados contra os os nematoides *Metarhabditis* spp., *P. redivivus* e *C. elegans*, em condições de laboratório.

### 4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, M.S. et al. Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lysinibacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 28, n. 31, p.1-6, 2018;

ABDELMONEIM, T.; MASSOUD, S. The effect of endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* (Bt.) against *Meloidogyne incognita*. **Egyptian Journal of Natural Toxins**. v. 6, n.1, p. 83–93, 2009.

ABD-ALLA; A.M.M.; MEKI, I.K.; DEMIRBAS-UZEL, G. Insect Viruses as Biocontrol Agents: Challenges and Opportunities. **Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications**. In: El-Wakeil N., Saleh M., Abu-hashim M. (eds) Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications. Springer, Cham. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-33161-0_9). Acesso: 15/09/2021.

AHIMOU, F.; JACQUES, P.; DELEU, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surfasse Hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 27, n. 10, p. 749-754, 2007.

ALEXOPOULOS, C. et al. Field Evaluation of the Effect of a Probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* Spores on the Health Status, Performance, and Carcass Quality of Grower and Finisher Pigs. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**. v. 51, n. 6, p. 306-312, 2004.

AIGURIBI, A. et al. Safety Properties and Probiotic Potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. **Advances in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 432-452, 2016.

ARANDA, F.J.; TERUEL, J.A.; ORTIZ, A. Further aspects on the hemolytic activity of the antibioticlipopeptide iturin A. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1713, n.1, p. 51-56, 2005.

ARAÚJO, J.V. et al. Recent Advances in the Control of Helminths of Domestic Animals by Helminthophagous Fungi. **Parasitologia**. v. 1, n. 168-176, 2021.

ASIF, M, Q. et al. A revision of the genus *Metarhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) with description of three known species, a key to the identification of congeners and discussion of their relationships. **Journal of Natural History**. v. 47, n. 41-42, p. 2599-2682, 2013.

AZEVÊDO, D. M. M. R.; ALVES, A.A.; SALES, R.O. Principais Ecto e Endoparasitas que Acometem Bovinos Leiteiros no Brasil: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 2, n. 4, p. 43 – 55, 2008.

BARBOSA, J.D. et al. Detecção e tratamento de otite por *Rhabditis blumi* em bovinos da região Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 36, n. 7, p. 605-610, 2016.

BEEGLE, C.C.; TAKASHI, Y. History of *Bacillus Thuringiensis* Berliner Research and Development. **The Canadian Entomologist**. v. 124, n. 4, p. 587-616.

BESSION, F. et al. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. **The Journal of Antibiotics**. v. 31, n. 4, p. 1240-1247, 1978.

BESSION, F.; MICHEL, G. Action of the antibiotics of the iturin group on artificial membranes. **The Journal of antibiotics**. v. 27, n. 6, p. 646-651, 1984.

BISHT, N.; SINGH, P. Plant Physiology and Biochemistry Comparing the growth-promoting potential of *Paenibacillus lentimorbus* and *Bacillus amyloliquefaciens* in *Oryza sativa* L. var . Sarju-52 under suboptimal nutrient conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 146, n. November 2019, p. 187–197, 2020.

BOYD, W. A., & WILLIAMS, P. L. Comparasion of the sensitivity of three nematodes species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 11, p. 2768 - 2774, 2003.

BOER, A. S. DIDERICHSEN, B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* : a review. **Applied Mltcrobiology and Biotechnology**. v. 36, n. 1, p. 1–4, 1991.

BOSSI, P.V. et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Metarhabditis blumi* (Nematoda: Rhabditida). **Veterinary Parasitology**. v. 214, n.1-2, p.184-186, 2015.

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

CAMPOS, D.M.B. et al. Um caso de parasitismo por *Rhabditis* sp em criança natural de Goiânia, Goiás, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 5, p. 519-522, 2002.

CAMPOS, S.B.S.et a. Evolução clínica, diagnóstico, tratamento e achados de necrópsia da otite parasitária por *Rhabditis* sp. em touro da raça Gir – Relato de caso. **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria**. p. 677-683, 2009.

CAPPELLO, M. et al. A purified *Bacillus thuringiensis* crystal protein with therapeutic activity against the hookworm parasite *Ancylostoma ceylanicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, n. 41, p. 15154–15159, 2006.

CARDONA, J.A.; GONZÁLEZ, M.G.; ÁLVAREZ, J. Bovine otitis by *Rhabditis bovis* in Cordoba, colombia Report of two cases. **Revista MVZ Córdoba**. v. 15, n. 3, p. 2240-2244, 2010.

CARDONA, J.A.; GONZÁLEZ, M.G.; ÁLVAREZ, J. Frequency of clinical parasitic otitis due to Rhabditiform nematodes (*Rhabditis* sp) in six Gyr breed cattle farms in Cordoba, Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. v. 25, n. 3, p. 417-421, 2012.

CARRILLO, C. et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1611, n.1-2, p. :91-7, 2003.

CASTANEDA-ALVAREZ, C. et. al. Exoenzymes and metabolites related to the nematicidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index* Thorne & Allen. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, n. 2, p. 413-424, 2015.

CETINTAS, R.; KUSEK, M.; FATEH, S. A. Effect of some plant growth-promoting rhizobacteria strains on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, on tomatoes. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 1, 2018.

CHANDRASENA, D. et al. Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F  $\delta$ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest Management Science**. v. 74, n. 3, p. 746-754. 2018.

CONAB. Página Institucional. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2634-brasil-e-responsavel-por-cerca-de-7-do-leite-produzido-no-mundo>. Acessado: 23 ago. 2019.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends in Microbiology**. v. 13, n.18, p. 347–350, 2005.

DAS, K.; MUKHERJEE, K.A. Assessment of mosquito larvicidal potency of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strains. v. 97, n. 2, p. 168-173, 2006.

DELEU, M.; PAQUOT, M.; NYLANDER, T. Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. v. 94, n. 7, p. 2667-2679, 2008.

DOUGHERTY, E.C.; CALHOUN, H.G. Experiences in culturing *Rhabditis pellio* (Schneider, 1866) Bütschli, 1873 (Nematoda: Rhabditidae), and related soil nematodes. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**. v. 15, n. 2., p. 55-68, 1948.

DU, C. et al. Genetic and biochemical characterization of a gene operon for trans-aconitic acid, a novel nematicide from *Bacillus thuringiensis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 8, p. 3517–3530, 2017.

DUARTE, E.R.; MELO, E.M.; HAMDAN, J.S. Epidemiological aspects of bovine parasitic otitis caused by *Rhabditis* spp. and/or *Raillietia* spp. in the state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 101, n. 1, 2001.

DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S. Otitis in Cattle, an Aetiological Review. **Journal of Veterinary Medicine B**. v. 51, n. 1, 2004.

DUNSTAND-GUZMÁN, E. et al. Nematicidal and ovicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the zoonotic nematode *Ancylostoma caninum*. **Experimental Parasitology**, v. 218, 2020. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419304813?via%3Dihub>. Acesso: 1, Set. 2021

EDWARD, D.L.; PAYNE, J.; SOARES, G.G. **Novel isolates of *Bacillus Thuringiensis* having activity against nematodes**. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US4948734A/en>. Acesso 13 set. 2021.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Bacillus pumilus* QST 2808. **EFSA Journal** v. 11, n. 8, p. 1–31, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Safety and efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* (NCIMB 30229) as a silage additive for all animal species. **EFSA Journal**, v. 15, n. 6, p.1-7, 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Safety and efficacy of ZM16 10 (*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 25840) as a feed additive for sows in order to have benefits in piglets, sows for reproduction, piglets (suckling and weaned), pigs for fattening and minor porcine species. **EFSA Journal**. v. 17, n. 11, p. 1-, 2019.

EMBRAPA. Anuário Leite – 2018. **Embrapa Gado de Leite**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso: 30 Ago. 2021.

ERJAE, Z. et al. Identification of Antifungal Intracellular Proteins of Endophytic *Bacillus pumilus* by LC – MS / MS Analysis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Identification-of-Antifungal-Intracellular-Proteins-Erjaee>. Acesso: 19 Ago. 2019

FERRY, F.A.; FACCINI, J.L.H.; INADA, T. The role of ear mites of the genus *Raillietia* (Acari: Raillietiidae) in otitis of domestic ruminants. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 3,1 n. 11, 2011.

FIGUEROA, J.L. Nematodo de vida libre *Panagrellus* Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. **Investigación e Ciencia** v. 45, p. 4–10, 2009.

GAMEZ, R. et al. Screening , plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv . Williams (*Musa acuminata* Colla) **Microbiological Research**, v. 220, n., p. 12–20, 2019.

GAO, X. Y. et al. Mechanism of anti-Vibrio activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017.

GARCZYNSKI, S.F.; SIEGEL, J.P. Bacteria. In. LACEY, L. A.; KAYA, H.K. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**. Springer, Dordrecht, 2007. p. 175-197.

GERBORE, J. et al. Biological Control of Plant Pathogens: Advantages and Limitations Seen Through the Case Study of *Pythium Oligandrum*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 21, n. 7, p. 4847-4860, 2014.

GÓMEZ, I. et al. Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**. v. 28, n.1, p. 169-173, 2007.

HALDAR, L.; GANDHI, D. N. Effect of oral administration of *Bacillus coagulans* B37 and *Bacillus pumilus* B9 strains on fecal coliforms, *Lactobacillus* and *Bacillus* spp. in rat animal model. **Veterinary World**, v. 9, n. 7, p. 766–772, 2016.

HALL, R. A. et al. External pH influences the transcriptional profile of the carbonic anhydrase, CAH-4b in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 161; n. 2; p. 140–149; 2008.

HONG, H.A. et al. The safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus indicus* as foodprobiotics. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, n. 2, p. 510-520, 2008.

HONG, Y. et. al. Preliminary Study on the Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* TL on Cecal Bacterial Community Structure of Broiler Chickens. **BioMed Research International**. v. 2019, n. 1, p.1-11, 2019.

INÊS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**. v. 51, p. 100-112, 2015.

JAMAL, Q. et al. Identification for the first time of cyclo(D-Pro-L-Leu) produced by bacillus amyloliquefaciens y1 as a nematocide for control of *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–16, 2017.

JÚNIOR, W.M.; *Rhabditis* (Rhabditis) *freitasi* e *Rhabditis* (Rhabditis) *costai* (nematoda rhabditidae) isolados de otite bovina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, n.1, 1985.

KAVITHA, P.G.; JONATHAN, E.L.; NAKKEERAN, S. Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. **Nematologia Mediterranea**. v. 40, n. 2, p. 203-206, 2012.

KHAIR, A. E. H. et. al. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. **Bulletin of the National Research Centre**. v. 43, n. 64, p. 1-7, 2019.

KOLENSKI, N. et al. The cultivation of the nematodes *Panagrellus*, *Turbatrix* (Anguillula) and *Rhabditis* for using in fish feeding. **Fischer Science of Ukraine**, v. 3; n. 49; p. 16-31, 2019.

- KOVEDAN, K. et al. Larvicidal efficacy of *Jatropha curcas* and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against lymphatic filarial vector, *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**. v. 109, n. 5, p. 1251–1257.
- KOTOWICZ, N. et al. Safety and probiotic evaluation of two *Bacillus* strains producing antioxidant compounds. **Beneficial Microbes** v. 10, n. 7, p. 759–771, 2019.
- KOTZE, A.C. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**. v. 35, n. 9, p. 1013-1022, 2005.
- KRITAS, S.K. et al. Effect of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* Supplementation of Ewe's Feed on Sheep Milk Production and Young Lamb Mortality. **Journal of Veterinary Medicine Series A**. v. 53, n. 4, p. 170-173, 2006.
- KUMAR, A.; PRAKASHI, A.; JOHRI, B.N. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. In: MAHESWARI, D.K. **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems**. Berlin, Springer-Verlag,, p. 37-59, 2011
- LA RAGIONE, R.M. et al. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. **Veterinary Microbiology**. v. 79, n. 2, p. 133-142, 2001.
- LACADET. et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86,n. 4, p. 660–672, 1999.
- LARA, A. P. D. S. S. et al. Larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis Cry11Aa toxin against *Haemonchus contortus*. **Parasitology**. v. 143, n. 12, p. 1665–1671, 2016.
- LAWS, R.T. et al. The nematode *Panagrellus redivivus* is susceptible to killing by human pathogens at 37 °C, **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 1, p. 77–83, 2005.
- LEE, Y. S.; KIM, K. Y. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 1, p. 29–39, 2016.
- LEITE, R.C. et al. Otite parasitária por nematóides rhabditiformes: aspectos epidemiológicos e clínicos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 15, n. 2, p. 49-51, 1993.
- LEITE, R.C.; LEITE, R.C.; FACCINI, J.L.H. Diagnóstico e tratamento da otite parasitária por nematoides rhabditiformes em bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 69-70, 1994.
- LEITE, P.V.B. et al. Farmers' perception about parasitic otitis in Gyr breed from three states of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 9, p. 855-858, 2012.

LEITE, P.V.B. et al. Clinical aspects and dynamics of auricular parasitosis in Gir cattle. **Pesquisa Brasileira Veterinária**. v. 33, n. 3, p.319-325, 2013.

LI, L.; TAN, J.; CHAN, F. Genome and secretome analysis of *Pochonia chlamydosporia* provide new insight into egg-parasitic mechanisms. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1123, 2018.

LIU, Y. et al. Cry64Ba and Cry64Ca, Two ETX/MTX2-Type *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins Active against Hemipteran Pests. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 84, n. 3, 2018.

LIU, H., TIAN, L. & WANG, D. Biochemical and Biophysical Research Communications Notch receptor GLP-1 regulates toxicity of simulated microgravity stress by activating germline-intestine communication of insulin signaling in *C elegans*. **Biochemcal and Biophysichal Research Communnity**, v. 534, 248–253, 2021.

LUBIAN, C. et al. Anthelmintic activity of plant aqueous extracts against *Panagrellus redivivus* *in vitro*. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 86, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/hygdY6YDYMcTRjPj6tmwRsr/?lang=em>. Acesso: 3 Set. 2021.

MAAGD R.A. et al. Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. **Annual Review of Gennetics**, v. 37, p. 409–433, 2003.

MAULIDIA, V. et al. Secondary metabolites produced by endophytic bacteria against the root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.). **Biodiversitas**.v. 21, n. 11, p.5270–5275; 2020.

MARTINS Jr., W. *Rhabditis* (*Rhabditis*) *freitasi* sp. n. e *Rhabditis* (*Rhabditis*) *costai* sp. n. Nematoda-Rhabditidae isolados de otite bovina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 80, n.1, p. 11–16, 1985.

MEAMAR, A.R. et al. The occurrence of severe infections with *Rhabditis axei* in AIDS patients in Iran. **Journal of Helminthology**. v. 81, n. 4, p. 351-352, 2007.

MENA-VIOANTE, H.G.; OLALDE-PORTUGAL, V. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. **Scientia Horticulturae**. v. 113, n. 1, p. 103-106, 2007.

MESSA, V.; NUNES, J.; MATTEI, D. Seed Treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* for the control of *Meloidogyne javanica* “in vivo” bean culture and its direct effect on the motility, mortality and hatching of *M. javanica* “in vitro”. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 59, 2019.

MNIF, I.; GHRIBI, D. Potential of bacterial derived biopesticides in pest management. **Crop Protection** v. 77, p. 52-64, 2015.

MOTA, M.A., CAMPOS, A.K., ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 93-100, jul./set. 2003.

MSOLLA, P. et al. Treatment of bovine parasitic otitis using ivermectin. ***Tropical Animal Health and Production***, v. 17, n. 3, p. 166-168, 1985.

MSOLLA, P.; MMBUJI, W.E.O.; KASAKU, A.A. Field Control of Bovine Parasitic Otitis. ***Tropical Animal Health and Production***. v.19, p. 179-183, 1987.

MSOLLA, P. et al. Clinical Observations on Bovine parasitics in Tanzania. ***Tropical Animal Health and Production***. v. 25, n.1, p. 15-18, 1993.

NAGORSKA, K.; BIKOWISKI, M.; OBUCOWSKI, M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. ***Acta Biochimica Polonica***. v. 54, n. 3, p. 495-508, 2007.

OBATOLU, U. U., PJUKENYI, D.M., USHE, T. A retrospective epidemiological study of parasitic otitis in cattle in the south-east Lowveld of Zimbabwe. ***Zimbabwe Veterinary Journal***. v. 30, n.1, p. 19–24, 1999.

OLIVEIRA, D. F. et al. Selection of rhizobacteria able to produce metabolites active against *Meloidogyne exigua*. ***European Journal of Plant Pathology***, v. 119, n. 4, p. 477–479, 2007.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. ***Environmental Microbiology***, v. 9, n. 4, p. 1084–1090, 2007.

OPRIESSNIG, T. et al. *Bacillus pumilus* probiotic feed supplementation mitigates *Lawsonia intracellularis* shedding and lesions. ***Veterinary Research***, v. 50, n. 1, 2019.

ORTIZ, A., RATZKE, C. GORE, J. Interspecies bacterial competition regulates community assembly in the *C. elegans* intestine. ***ISME Journal***, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41396-021-00910-4>. Acesso: 1 Mai. 2021.

PANETTO, J.C.C. et al. **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro. Sumário Brasileiro de Touros. 2ª Avaliação Genômica de Touros. Resultado do Teste de Progênie**. Juiz de Fora- MG. Embrapa Gado de Leite, 2019. 22p.

PENG, D. et al. A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. ***Environment Microbiology***. v. 18, n. 3, p. 846-862, 2016.

PÉREZ-SANCHEZ, T.; MORA-SANCHEZ, B.; BALCÁZAR, J.L. Biological Approaches for Disease Control in Aquaculture: Advantages, Limitations and Challenges. ***Trends in Microbiology***. v. 26, n. 11, p. 896-903, 2018.

- PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 51, n. 5, p. 553-563, 1999.
- PINEDA, A. V. et al. Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importância veterinaria. Revisión. **Revista Mexicana de Ciência Pecuária**. v. 3, n.1, p. 77-88.
- RAE R. et al. A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. **Environment Microbiology**. v. 12, n. 11, p.3007–21, 2010.
- RAYMOND, B.; JOHNSTON, P.R.; NIELSEN LE-HOUX, C.; LERECLUS, D.; CRICKMORE, N. *Bacillus thuringiensis*: an impotente pathogen? **Trends in Microbiology**. v.18, n.5, p.189-194, 2010.
- RITCHIE, S.A.; RAPLEY, L.P.; BENJAMIN, S. *Bacillus thuringiensis* var. israelensis (Bti) Provides Residual Control of *Aedes aegypti* in Small Containers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 82, n. 6, p. 1053–1059, 2010.
- RITTER, A.C. et. al Characterization of *Bacillus subtilis* Available as Probiotics. **Biochemistry and Applied Microbiology Laboratory**. v. 8, n. 2, p. 23-32, 2018.
- ROMERO, D. et al. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. **The American Phytopathological Society**. v. 20, n. 4, p. 420-440, 2007.
- ROSENBERGER, G.; STÖBER, M. Órgãos dos sentidos. In: DIRKSEN,H.; GRÜNDER, D.; STÖBER, M. **Exame Clínico dos Bovinos**, Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Rosenberger. p.363-373, 1993.
- SALAN, M.S.A. et al. Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lysinibacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**. v. 28, n. 31, p. 1-6, 2018.
- SALAS, A; FERNANDA, M;; HERMAN, D. Nematicidal effect of an Argentine strain of *Photorhabdus laumondi laumondi* (Enterobacteriaceae) on the free-living nematode *Panagrellus redivivus* (Rhabditidae : Panagrolaimidae).
- SAWALE, A.; KANDAM, T. A.; KARALE, M.A. Original Research Article Antimicrobial Activity of Secondary Metabolites from Halophilic *Bacillus pumilus* sp. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**. v. 3, n. 6, p. 506–512, 2014.
- SANCHIS, V. BOURGUET, D. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v. 28, n. 1, p.11-20, 2008.

SANCHIS, V. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: history of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. A review. **Agronomy for Sustainable Development**. v. 31, n.1, p. 217-231, 2011.

SANAHUJA, G. et al. Review article: *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**. v. 9, n. 3, p. 283-300.

SIEGEL, J.P. The Mammalian Safety of *Bacillus thuringiensis*-Based Insecticides. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 77, n. 1, p. 13-21, 2001.

SILVA, M.V.G.B. et al. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando. Sumário de Touros. Resultado do Teste de Progênie**. Juiz de Fora – MG, 2018. 65p. v.38, n. 2, p. 116-120; 2016.

SILVA, F.M. et al. Parasitic otitis caused by *Rhabditis* (*Rhabditis freitasi*) (Nematoda: Rhabditidae) in the cattle Gir breed in the state of Acre. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 65p. v.38, n. 2, p. 116-120; 2016.

SIVASAKTHI, S.; USHARANI, G.; SARANRJ, P. Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) - *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*: A review. **African Journal of Agricultural Research**. v. 16, n. 9, p. 1265-1277.

SOBRAL, S.A. et al. *Rhabditis* spp., in the Espírito Santo, State of Brazil and evaluation of biological control. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**. v. 28, n. 2, p. 333-337. 2019.

SOUTO, G.I. et al. Genetic and functional characterization of a *Bacillus sp.* strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. **Journal of Applied Microbiology** v. 97, n.6, p. 1247–1256, 2004.

SOUZA, W.A. et al. Otite parasitária causada por nematoides rhabditiformes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Acessado em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/SXkBRrCphpOGdSJ\\_2013-6-13-15-43-8.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/SXkBRrCphpOGdSJ_2013-6-13-15-43-8.pdf).

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

STEVEN, M.; ESHITA; ROBERTO, N.H. Bacillomycin Lc, a New Antibiotic of the Iturin Group: Isolations, Structures, and Antifungal Activities of the Congeners. **Journal of Antibiotics**. v. 48, n. 11, p. 1240-1247, 1995.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, 2006. Acessado em: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_celegansintro/celegansintro.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html). Acessado em 1º de junho de 2021.

SU, S.; ROMO, T.D.; GROSSFIELD, A. **Selectivity and Mechanism of Fengycin, na Antimicrobial Lipopeptide from Molecular Dynamics.** v. 122, n. 8, p. 2219-2226, 2018.

SUDHAUS, W. Phylogenetic systematisation and catalogue of paraphyletic "Rhabditidae" (Secernentea, Nematoda). **Journal Nematode Morphology System.** v. 14, n. 2 p. 113–178, 2011.

SYMMANK, H. et al. Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. **Protein Engineering** v.15, n.11, p. 913–921, 2002.

TADIGIRI, S. et al. **Journal of Entomology and Zoology Studies.** Isolation and characterization of chemical constituents from *B. amyloliquefaciens* and their nematicidal activity. v. 8, n. 3, p. 2062-2066, 2020.

TAHSEEN, Q. et al. Description of *Metarhabditis andrassyana* gen. n., sp. n. (Nematoda: *Rhabditidae*) from India. **International Journal of Nematology.** v. 14, n. 2, p. 163–168, 2004.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology.** Oxford, Garsington Road – Fourth edition, 2016. 1006 p.

TECHSNER, M. et al. Outer Ear Canal Infection with *Rhabditis* sp. Nematodes in a Human. **American Society for Microbiology.** v. 52, n. 5, p. 1793-1795, 2014.

TENA, D. et al. Cutaneous Infection due to *Bacillus pumilus*: Report of 3 Cases. **Clinical Infectious Diseases** v. 44, p. 40–42, 2007.

THIMON, L. et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. **FEMS Microbiology Letters.** v. 128, n. 2, p. 101-106, 1995.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology,** v.61, p.197–213. 2007.

URQUHART, G. M., J. et al. **Parasitologia veterinária.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998. 273 p.

VAN DER PEET-SCHWERING, C. M. C. et al. Effects of a mixture of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* on the performance of growing- finishing pigs. **Animal Feed Science and Technology,** v. 261, 2020. Disponível em: <https://en.xmol.com/paper/article/1308201153551634432>. Acesso em: 5 Mai. 2021.

VANITTANAKON, N. et al. Fengycin--a Novel Antifungal Lipopeptide Antibiotic Produced by *Bacillus Subtilis* F-29-3. **The Journal of Antibiotics.** v. 39, n. 7, p. 888-901, 1986.

VASEEHARAN, B.; RAMASAMY, P. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 36, n. 2, p. 83-87.

VAZQUEZ-MENDOZA, P. et al. Antimicrobial and bactericidal impacts of *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 on fecal shedding of pathogenic bacteria in dairy calves and adult dogs. **Microbial Pathogenesis**, v. 114, p. 458–463, 2018.

VEROCAI, G.G. et al. Inefficacy of albendazole sulphoxide and ivermectin for the treatment of bovine parasitic otitis caused by rhabditiform nematodes. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 11, p. 910-912, 2009.

VIEIRA, M.C.M. et. al. Estudo da Prevalência de Otites Clínicas por *Rhabditis* sp. em Bovinos da Raça Gir no Estado de Goiás. **Anais das Escolas de Agronomia e Veterinária**. v. 28, n. 2, p. 19-29, 1998.

VIJAYA KUMAR, M. et. al. Evaluation of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* metabolites for anthelmintic activity. **Pharmacognosy Research**, v. 7, n. 1, p. 81–84, 2015.

VOLLENBROICH, D. et. al. **Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis***. v. 25, n. 3, p. 289-297, 1997.

VIEIRA, M.C.M. et. al. Otites parasitárias por nematóides rhabditiformes em bovinos: avaliação de tratamentos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 51-55, 2001.

XIONG, J.; et. al. Systemic nematicidal activity and biocontrol efficacy of *Bacillus firmus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **World Journal of Microbiology Biotechnology**. v. 31, n. 4, p. 661-667, 2015.

WANG, X. et al. Biocontrol of Two Bacterial Inoculant Strains and Their Effects on the Rhizosphere Microbial Community of Field-Grown Wheat. **BioMed Research International**, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/8835275>

WEY, J. et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 100; n. 5, p. 2760-2765, 2003.

WU, H. et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 111, n. 10, p. 1589-1602, 2003.

YAN, S. et. al. Growth of Four Serovar of *Bacillus thuringiensis* (Var. *Kurstaki*, *Israelensis*, *Tenebrionis*, and *Aizawa*) in Wastewater Sludge. **Practice Periodical Hazardous Toxic and Radioactive Waste Management**. v. 11, n. 2, p. 123-129, 2007.

YE, L.P.; ZU, C.G.; ZHANG, J.N. Two cases of *Rhabditis axei* infections in human digestive system. **Chinese Journal of Schistosomiasis Control**. v. 14, p.187.

YERUHAM, I.; PERL, S. *Rhabditis dermatitis* in a bull apparently caused by *Pelodera strongyloides*. **Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux**. v. 52, n. 2, p. 121-122.

ZHENG, D. et al. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. **Microbiology Research**. v. 215, p.22–28, 2018.

## CAPÍTULO 1

Avaliação da atividade nematicida de produtos comerciais à base de *Bacillus* spp. contra *Caenorhabditis elegans*.

## Resumo

Dentre as alternativas para o controle de nematoides, as bactérias do gênero *Bacillus* spp. apresentam destaque. O nematoide *Caenorhabditis elegans* é um ótimo modelo para testes de toxicidade em nematoides de importância sanitária e econômica. O objetivo de nosso trabalho foi avaliar a eficácia de três produtos à base de diferentes bactérias do gênero *Bacillus* que não tem descrição de nematotoxicidade, contra *C. elegans*. O produto A é composto pela cepa QST-713 de *B. subtilis*, o produto B pela cepa CCT 1306 de *B. thuringiensis* e o produto C por uma associação das cepas CCTB 04 de *B. subtilis*, CCTB 05 de *B. amyloliquefaciens* e CCTB 09 de *B. pumilus*. Os ensaios foram feitos em placas de microtitulação, em que foram testados sobre os nematoides os três produtos nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 5% e autoclavado na concentração máxima, além de controle positivo e controle negativo. Foram feitas ainda todas as diluições necessárias para que fosse obtida a DL50 de cada produto. As diluições e o controle negativo foram feitos com S basal, enquanto o controle positivo foi feito com solução de lugol. Foram feitas leituras a 24h e a 48h para que fosse calculado o percentual de redução em relação ao grupo controle. Os valores obtidos foram comparados pelos testes de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. O produto A foi o que necessitou de menor DL50, de 0,5 ml/L atingida em um período de 24h, seguido pelo produto B, que proporcionou DL50 de 3,1 ml/L, também dentro de 24h e pelo produto C que necessitou de maior DL50 entre os três produtos, de 169 ml/L, obtida em 48h. O produto A se manteve estatisticamente tão eficaz quanto o controle positivo até quando diluído a 5%, o produto B, se mostrou com eficácia semelhante ao controle positivo até quando diluído a 10% e o produto C só se assemelhou estatisticamente ao controle positivo em sua concentração máxima. Os três produtos apresentaram-se eficazes depois de autoclavados. Podemos observar que os três produtos apresentam potencial nematicida e devem ser testados no controle de nematoides de importância sanitária e econômica.

## 1. Introdução

A resistência anti-helmíntica é um problema cada vez mais frequente nos rebanhos de diferentes espécies de animais e em diversas partes do mundo (DAUPARAITÉ et al., 2021; MICKIEWICZ et al., 2021; MPHABLELE et al., 2021). Alternativas para uso de anti-helmínticos tem sido pesquisadas para reduzir a pressão de seleção sobre os

fármacos sintéticos, como por exemplo, o controle biológico, fitoterápicos e sistemas de manejo integrado de pragas (HOAI, 2020; PALOMERO et al., 2021; AMORIM et al., 2021). Bactérias do gênero *Bacillus* e os metabólitos produzidos por elas se destacam há vários anos no controle parasitário, inclusive de helmintos (HU et al., 2018; LI et al., 2021; PINTO et al., 2017).

Dentre as bactérias do gênero *Bacillus*, *B. thuringiensis* talvez seja a mais explorada, tanto no âmbito da medicina humana, quanto na veterinária e agronomia (RAMALAKSHMI et al., 2020; SANDERS et al., 2020; URBAN et al., 2021). Esta bactéria age contra nematoides por meio de cristais parasporais e proteínas Cry, que degradam as células intestinais do helminto (CRICKMORE, 2005; TIAN; YANG; ZHANG, 2007; VERDUZCO-ROSAS et al., 2021). *Bacillus subtilis* também é uma bactéria muito estudada para controle biológico de diversos nematoides (DAS; WADUD; RAHMAN, 2021; MIGUNOVA, 2021; YANG et al., 2020). Sua facilidade de formação de biofilme e estabelecimento em diferentes ambientes lhe torna uma importante bactéria promotora de crescimento de plantas na agronomia (BLAKE; CHRISTENSEN; KOV, 2021; FOUUDA et al., 2021; JABBOROVA et al., 2021) e um eficiente probiótico na medicina veterinária (BASTOS et al., 2020; MARDANOVA et al., 2020; SMOCK et al., 2020). *Bacillus subtilis* pode produzir uma gama de peptídeos de origem ribossomal e não ribossomal com propriedades antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (NAGÓRSKA; BIKOWSKI; OBUCHOWSKI, 2007). *Bacillus pumilus* e *B. amyloliquefaciens* também já foram utilizados como probióticos em animais, no entanto sua utilização foi restrita apenas a avaliação do potencial antibacteriano (BILAL et al., 2021; DU et al., 2018; OPRIESSNIG et al., 2019; YOHANNES et al., 2020). Porém, no contexto agrícola, estas bactérias tem ação comprovada contra diferentes nematoides, por meio da ação de uma variedade de toxinas, ácidos e enzimas (JAMAL et al., 2017; LEE; KIM, 2016; LI; TAN; CHEN, 2018; MESSA; NUNES; MATTEI, 2019).

*Caenorhabditis elegans* é um nematoide muito utilizado para estudo de diversos processos celulares, metabólicos, bioquímicos e infecciosos (CHAVES et al., 2021; LIU; TIAN; WANG, 2021; ORTIZ; RATZKE; GORE, 2021; SHPILKA et al., 2021). Este nematoide é encontrado naturalmente em troncos, frutas e vegetais podres e alguns invertebrados, onde se alimenta de bactérias ali presentes (BUBRIG; SUTTON; FIERST, 2020; FÉLIX; DUVEAU, 2012; SCHULENBURG; FÉLIX, 2017). No entanto,

a cepa N2 já é considerada um animal de laboratório, pois se reproduz em placas de Petri por inúmeras gerações, e se alimenta exclusivamente da bactéria *Escherichia coli* (FRÉZAL; FÉLIX, 2015; STERKEN et al., 2015). Seu rápido ciclo, anatomia, fisiologia e biologia celular conhecidas e mapeamento genético completo, tornam-no um excelente modelo para pesquisas (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; HILLIER et al., 2005; FRANKS, et al., 2006; PINTARD; BOWERMAN, 2019). No contexto da avaliação de toxicidade de compostos químicos contra nematoides, a ação de toxinas pode ser avaliada em *C. elegans* por meio de diferentes parâmetros, como redução de motilidade, fertilidade, crescimento, funcionamento de bomba de faringeal e degeneração celular (KHO et al., 2011; RAE et al., 2010; SCHULENBURG; MÜLLER, 2004; WAN et al., 2019).

É importante buscar novas alternativas para controle de nematoides, para assegurar a presença de tratamentos eficientes, principalmente com o avanço dos casos de resistência aos antiparasitários. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial nematicida de três produtos comerciais à base de *Bacillus* sp. que originalmente não são destinados ao controle de nematoides, através de ensaios *in vitro*, contra o nematoide *C. elegans*.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Cultivo de *C. elegans***

As colônias de *C. elegans* estirpe N2 foram cultivadas em meio NGM a 20°C e alimentadas com *Escherichia coli* cepa OP50, crescidas em meio BHI por uma noite, conforme descrito em Rae et al., (2010). Essas larvas foram sincronizadas para o estágio L4, feito de acordo com a metodologia descrita por Stiernagle (2006). Resumidamente, os hermafroditas adultos foram depositados no NGM à 20°C e reitrados 12h após, assim que completarem a oviposição. Os ovos foram mantidos nas placas por aproximadamente 52h.

### **2.2 Produtos utilizados**

O produto A é composto por *Bacillus subtilis*, cepa QST-713, na concentração de  $1,3 \times 10^7$  UFC/ml, originalmente classificado como fungicida e bactericida. O produto B é composto por *B. thuringiensis*, subespécie kurstaki, cepa CCT 1306, na concentração  $5 \times 10^{10}$  esporos viáveis/ml e é direcionado para o controle de insetos da ordem Lepidoptera. O produto C é composto por uma associação entre *B. subtilis*, cepa

CCTB 04, *B. pumilus* cepa CCT B05 e *B. amyloliquefaciens*, cepa CCTB 09, todos na concentração de  $1 \times 10^8$  endósporos/ml e é utilizado como inoculante do solo.

### 2.3 Testes de ação dos produtos

Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, placas em que *C. elegans* eram mantidos foram lavadas com 10 ml do meio líquido S basal [5.85g de NaCl, 1g de  $K_2HPO_4$ , de 6 g  $KH_2PO_4$ , 1 ml de colesterol (5 mg/ml em etanol), 1 litro de água destilada]. Este volume foi transferido para um béquer de 50 ml, para homogeneização da solução com nematoides. Com o auxílio de uma pipeta semiautomática, foram retiradas cinco alíquotas de 50  $\mu$ l da solução de nematoides obtida. As alíquotas foram lidas em microscópio óptico para mensurar a média de *C. elegans* por alíquota. Foram inoculados em média 50 *C. elegans* em estágio L4, em duas em placas de microtitulação de 96 poços. Além da alíquota, foi adicionada uma solução de 5  $\mu$ l de *E. coli* OP50 e 2  $\mu$ l de oxitetraciclina (25  $\mu$ g/ml) e 2  $\mu$ l cloranfenicol (25  $\mu$ g/ml), para evitar proliferação excessiva de bactérias. Os tratamentos testados foram os produtos, cada um nas diluições de 100%, 50%, 25%, 10%, 5% e produto autoclavado, a 121°C por 20 minutos, em concentração máxima. Todas as diluições foram feitas em meio S basal. Além disso, ainda havia um controle negativo, com S basal e um controle positivo, com solução de lugol (1 ml de Iodo cristalizado; 5 ml de Iodeto de Potássio; 100 ml de água destilada). Todos os tratamentos foram adicionados na proporção solução de nematoides/tratamento de 2:1 (40 $\mu$ l de solução de nematoides, para 20  $\mu$ l de tratamento) e em 12 réplicas. Todo o processo, de inoculação de nematoides e tratamentos foi feito dentro da capela com a câmara de fluxo ligada. As placas de microtitulação foram embaladas em sacos plásticos para evitar perda excessiva de umidade, antes de serem incubadas em incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD). Uma placa foi escolhida aleatoriamente para ser lida a 24h e outra a 48h. No momento das leituras, todo conteúdo em cada poço era pipetado e lido com lâmina e lamínula. Todo o ensaio foi repetido três vezes. O mesmo procedimento foi igualmente adotado para os produtos A, B e C. A contagem obtida foi transformada em percentual de redução para que seja calculada a DL50. Esse percentual de redução foi calculado de acordo com o método de Abdel-Salam et al. (2018): (%) Redução =  $(C1 - C2) / C1 \times 100$ , onde C1 é a média de nematoides vivos no grupo controle e C2 é o número de nematoides vivos no grupo tratado. O valor de cada réplica foi transformado em média de cada tratamento em cada tempo. Para o cálculo de DL50, no caso dos produtos A

e B, foi necessário outro ensaio em triplicata, em que novas placas foram lavadas e os nematoides e tratamentos foram novamente pipetados da mesma maneira que foi realizado o primeiro experimento. Entretanto, dessa vez as concentrações avaliadas foram de 1%, 0,5% e 0,1%.

#### 2.4. Análises estatísticas

A análise estatística das variáveis estudadas e da dose necessária para matar 50% dos nematoides, DL50, foi realizada com software R versão 4.1.0 (R Development Core Team, 2021). A DL50 foi calculada por meio do pacote (drc). A análise de variância (ANOVA) adotada foi a análise não-paramétrica. Para comparações múltiplas, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn. O valor de  $p = 0,05$ , foi considerado significativo estatisticamente.

### 3. Resultados

O produto que se mostrou tóxico para *C. elegans* em menor concentração foi o produto A, seguido pelos produtos B e C, respectivamente. A DL50 do produto A, corresponde a menos de 17% da DL50 necessária para o produto B. Este, por sua vez apresentou uma DL50 correspondente a menos de 2% da DL50 necessária para o produto C. Os valores da DL50 necessária de cada produto e o tempo em que esta foi atingida podem ser conferidos na tabela 1:

Tabela 1: DL50 necessária e tempo de ação adequado para os produtos A, B e C

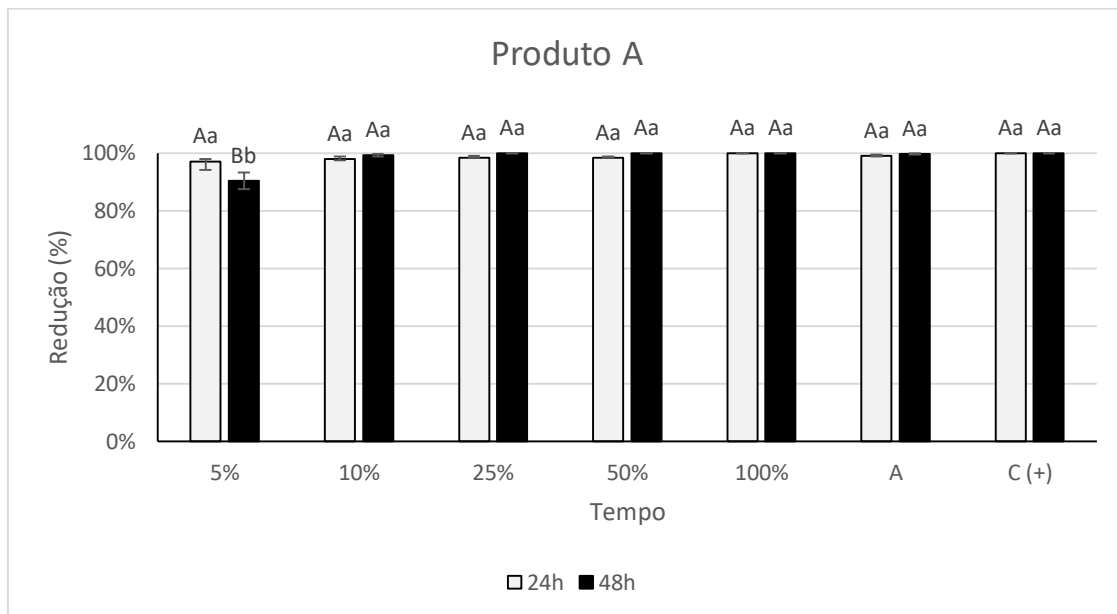
Produto	DL50
A	0,5 ml/L – 24h
B	3,1 ml/L – 24h
C	169 ml/L – 48h

Fonte: Arquivo pessoal

Com relação à eficácia de cada produto em diferentes concentrações, o percentual de redução apresentado pelo produto A foi semelhante ao do controle positivo mesmo após diluído na menor concentração testada, de 50 ml/L (5% em S Basal), em apenas 24h, sem apresentar diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) para as demais concentrações. No entanto, a 48h, essa concentração mostrou-se um pouco menos efetiva que as demais. A queda de eficácia no segundo dia não foi observada nos demais

tratamentos. O produto A, apresentou a mesma eficácia autoclavado e não autoclavado na concentração máxima. Esses resultados podem ser vistos na figura 1:

Figura 1: Percentual de redução de *C. elegans* em relação ao grupo controle nos tempos de 24h e 48h, quando colocado em contato com o produto A. Os tratamentos representados foram as concentrações dos produtos após diluídos em S Basal (5%, 10%, 25%, 50% e 100%) e o produto autoclavado em concentração máxima, representado pela letra A. O controle positivo está representado no gráfico por C (+). Colunas representadas por mesma letra maiúscula são tratamentos que não diferiram estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ) em função do tempo. A coluna com letra maiúscula diferente, indica diferença estatística dentro do mesmo tratamento em função do tempo. Colunas representadas com mesma letra minúscula representam tratamentos que não diferiram estatisticamente no mesmo período de tempo ( $p < 0,05$ ). Colunas representadas com letras minúsculas diferentes indicam tratamentos que diferiram entre eles no mesmo período de tempo. As barras de erros representam o erro-padrão.



Fonte: Arquivo Pessoal.

A média de nematoides vivos por poço em cada tratamento com o produto A, inclusive no controle negativo C (-), é apresentada na tabela 2:

Tabela 2: Média de nematoides vivos em cada tratamento do ensaio feito com o produto A.

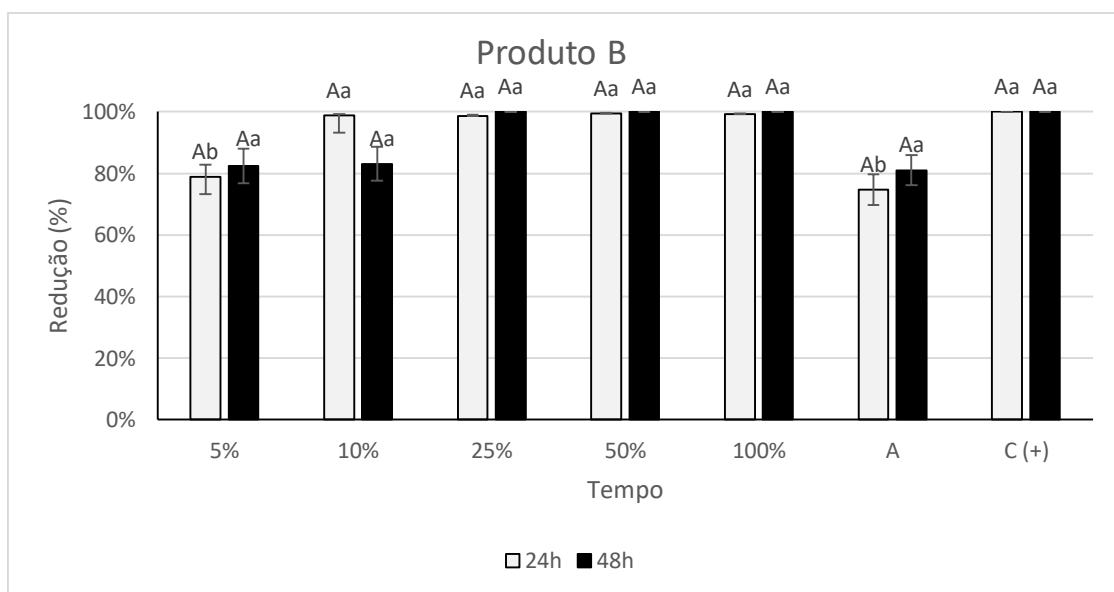
Produto A	C (-)	5%	10%	25%	50%	100%	A	C (+)
-----------	-------	----	-----	-----	-----	------	---	-------

24h	35,3	1	0,7	0,6	0,6	0	0,3	0
48h	22,1	2,1	0,2	0	0	0	0,1	0

Fonte: Arquivo pessoal

O produto B alcançou percentual de redução próximo a 100%, quando diluído a 10% em S Basal, ou seja, a partir da concentração de 100 ml/L, em 24h e permaneceu com a mesma eficácia nas concentrações superiores e no controle positivo, sem diferenças estatísticas entre estes ( $p < 0,05$ ). Quando submetido a autoclave, o produto B teve sua eficácia reduzida, e necessitou de 48h para atingir eficácia similar à do controle positivo, bem como quando o produto foi diluído a 5%. Estes resultados podem ser representados na figura 2:

Figura 2: Percentual de redução de *C. elegans* em relação ao grupo controle nos tempos de 24h e 48h, quando colocado em contato com o produto B. Os tratamentos representados foram as concentrações dos produtos após diluídos em S Basal (5%, 10%, 25%, 50% e 100%) e o produto autoclavado em concentração máxima, representado pela letra A. O controle positivo está representado no gráfico por C (+). Colunas representadas por mesma letra maiúscula são tratamentos que não diferiram estatisticamente entre si em função do tempo ( $p < 0,05$ ). Colunas representadas com mesma letra minúscula representam tratamentos que não diferiram estatisticamente no mesmo período de tempo ( $p < 0,05$ ). Colunas representadas por letras minúscula diferentes indicam tratamentos que apresentaram diferenças estatísticas entre eles no mesmo período de tempo. As barras de erros representam o erro-padrão.



Fonte: Arquivo pessoal.

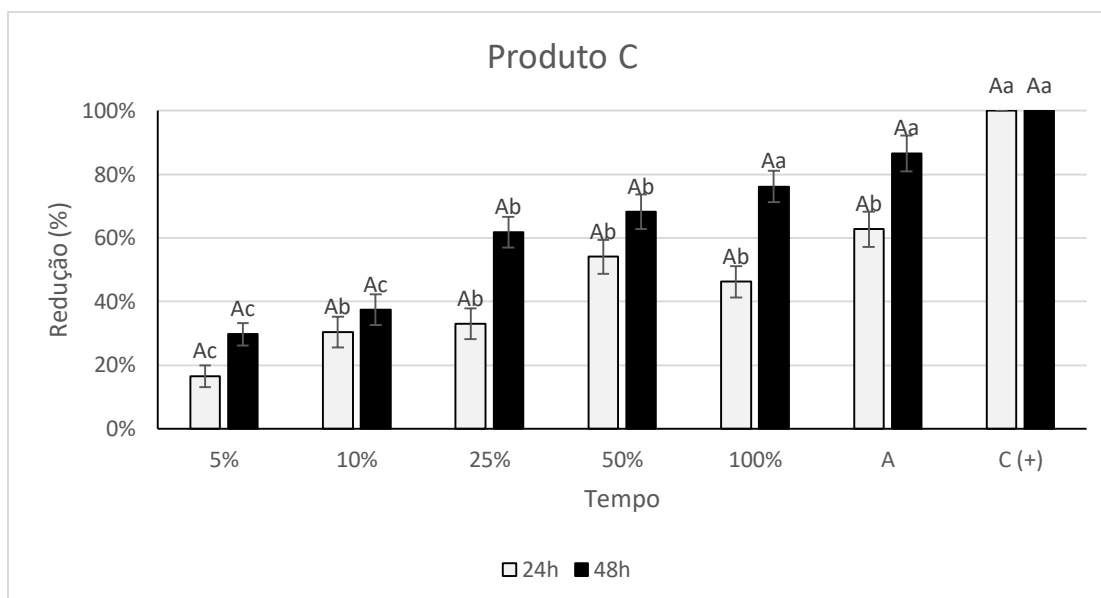
A média de nematoides vivos por poço em cada tratamento com o produto B, inclusive no controle negativo C (-) está apresentada na tabela 3:

Produto B	C (-)	5%	10%	25%	50%	100%	A	C (+)
24h	42,5	9	0,5	0	0	0,4	11	0
48h	12,9	3	0,1	0	0	0	3,1	0

Tabela 3: Média de nematoides vivos em cada tratamento do ensaio feito com o produto B.

Quanto ao produto C, apresentou maior percentual de redução em sua concentração máxima em 48h, que foi o único tratamento não autoclavado que não apresentou diferenças estatísticas com o controle positivo ( $p < 0,05$ ). O produto manteve a mesma eficácia após submetido à autoclave. Estes resultados podem ser observados na figura 3:

Figura 3: Percentual de redução de *C. elegans* em relação ao grupo controle nos tempos de 24h e 48h, quando colocado em contato com o produto C. Os tratamentos representados foram as concentrações dos produtos após diluídos em S Basal (5%, 10%, 25%, 50% e 100%) e o produto autoclavado em concentração máxima, representado pela letra A. O controle está representado no gráfico por C (+). Colunas representadas por mesma letra maiúscula são tratamentos que não diferiram estatisticamente entre si em função do tempo ( $p < 0,05$ ) em função do tempo. Colunas representadas com mesma letra minúscula representam tratamentos que não diferiram estatisticamente no mesmo período de tempo ( $p < 0,05$ ). Colunas representadas com letra minúscula diferente indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos no mesmo período de tempo. As barras de erros representam o erro-padrão.



Fonte: Arquivo pessoal

A média de nematoides vivos por poço em cada tratamento com o produto C e dos controles, está apresentada na tabela 4:

Tabela 4: Média de nematoides vivos em cada tratamento do ensaio feito com o produto C.

Produto C	C (-)	5%	10%	25%	50%	100%	A	C (+)
24h	85,7	79,3	72,7	61,2	49,2	46,2	46,9	0
48h	47,4	40,5	34	22	18,7	11,9	6,4	0

Fonte: Arquivo pessoal

#### 4. Discussão

O produto A apresentou a menor DL50, seguido pelo produto B. Ambos os produtos obtiveram efeito máximo nas primeiras 24h. Já o produto C, precisou de 48h para atingir sua maior eficácia e apresentou DL50 bem superior as demais. Apesar do estudo de Leyns et al. (1995), afirmar que maior concentração de partículas/ml está relacionada a uma maior toxicidade para *C. elegans*, em nosso trabalho o produto que apresentou menor DL50 foi aquele que tem menor concentração de partículas/ml dentre os três produtos testados. A variação na susceptibilidade de uma mesma espécie de nematoide quando exposta a diferentes espécies de *Bacillus* é comumente retratada na literatura (ABD-EL-KHAIR et al., 2019; EL-NAGDI e ABD-EL-KHAIR, 2019; XIANG et al., 2017). No caso do nematoide *C. elegans*, a bactéria dentre as

testadas que apresentou maior toxicidade foi a cepa QST-713 de *B. subtilis*, presente no produto A.

O produto A, apresentou uma eficácia média de 97% em apenas 24h, mesmo quando diluído a 5%, ou seja, numa concentração de  $6,5 \times 10^5$  UFC/ml de *Bacillus subtilis* QST-713. Este resultado foi considerado inesperado, visto que não se encontram na literatura relatos de *Bacillus subtilis* eficazes contra nematoides em concentrações abaixo de  $1 \times 10^7$  partículas/ml (ABD-EL-KHAIR et al., 2019; ABDEL-SALAM et al., 2018; GAMEZ et al., 2019). Portanto, podemos inferir a cepa QST-713, que compõe o produto A, possui grande potencial nematicida. Cepas de *B. subtilis* que possuem potencial antifúngico, como é o caso da cepa QST-713, tem grande possibilidade de serem tóxicas para nematoides, já que as iturinas e surfactinas, lipopetídeos cíclicos produzidos pelos *Bacillus* tem aptidão fungicida e nematicida (KOURMENTZA et al., 2021; LI et al., 2019; MIGUNOVA, 2021; RAMYABHARATHI et al., 2018).

Já o produto B, apresentou eficácia de 82% em 48h, mesmo diluído em 5% de sua concentração máxima, ou seja,  $2,5 \times 10^8$  esporos viáveis/ml de *Bacillus thuringiensis* kurstaki CCT 1306. O percentual de redução de *C. elegans* encontrado no presente estudo foi maior que o encontrado em vários trabalhos que utilizaram outras cepas de *B. thuringiensis* contra *C. elegans* (BORGONIE et al., 1996; LEYNS et al., 1995; MONTALVÃO et al., 2018). Portanto, podemos afirmar que a cepa CCT 1306, que compõe o produto B, apesar de ser destinada ao controle de lepidópteros, possui grande potencial nematicida. Outros trabalhos também encontraram cepas de *B. thuringiensis* que possuem ação nematicida e inseticida (ANANY et al., 2010; OSMAN; SALEM; GHATTAS, 1988). Essa toxicidade cruzada pode ocorrer devido a algumas toxinas produzidas por *B. thuringiensis*, apresentarem ação contra nematoides e insetos, como já foi identificado no trabalho de Peng et al. (2016). Ainda podemos levantar a hipótese da produção de diferentes toxinas com diferentes alvos pela mesma cepa de *B. thuringiensis*.

Enquanto isso, o produto C precisou de 48h para manifestar sua máxima eficácia, de 76%, ou seja, na concentração de  $1 \times 10^8$  endósporos/ml sem passar por tratamento térmico. Das três espécies de *Bacillus* que compõe o produto C, apenas *B. amyloliquefaciens* foi utilizado contra *C. elegans*, no trabalho de Liu, Budiharjo e Wang (2013), que matou pouco mais de 50% dos nematoides em 48h. Contudo, os autores não especificaram a concentração bacteriana utilizada. Todavia, neste estudo, a outra

cepa de *B. subtilis*, presente no produto A, foi testada contra *C. elegans* separadamente e em menor concentração e causou mortalidade muito mais alta dos nematoides que a associação encontrada no produto C. Estes resultados mostram que a cepa de *Bacillus* utilizada é um fator mais determinante de nematotoxicidade que a espécie *Bacillus* propriamente dita.

As três espécies utilizadas no presente trabalho já foram testadas contra o nematoide *M. incognita* e apresentaram eficácias mais altas que as encontradas contra *C. elegans* em nosso estudo (BORRAJO; MONDINO; MARONICHE, 2021; LOBNA; ZAWAM, 2010; XIANG, 2017). Apesar de outros trabalhos (EL-NAGDI; ABD-EL-KHAIR, 2019; OSMAN et al., 2020; ZHENG et al., 2016) relatarem uma potencialização de efeitos quando há associação de espécies de *Bacillus*, este acontecimento não foi observado no presente estudo, em que o único dos produtos que se trata de uma associação entre espécies, foi o que obteve menor eficácia dentre os três produtos testados. É pouco provável a inibição de crescimento de uma bactéria por outra, uma vez que este produto já é produzido comercialmente, portanto, testes de antagonismo de bactérias já deveriam ter sido feitos antes que seja lançado o produto. Os possíveis fatores que podem ter contribuído para a menor eficácia do produto C em relação aos demais são, podem estar relacionados à maior resistência de *C. elegans* às toxinas dessas espécies de *Bacillus*, quando comparado ao *M. incognita*. Porém esta hipótese não pode ser comprovada pela falta de trabalhos que relacionam a susceptibilidade entre as duas espécies de nematoides contra *B. pumilus*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Outra hipótese pode estar relacionada a variações entre a toxicidade de cepas de uma mesma espécie de *Bacillus* spp., já descritas em outros trabalhos (DUNSTAND-GUZMÁN et al., 2020; MONTALVÃO et al., 2018; GAZIEA et al., 2017). Uma menor toxicidade das cepas presentes no produto C seria aceitável, uma vez que este é o único dos três produtos que não é utilizado para controle de pragas. Essas diferenças, por si só já poderiam explicar a menor eficácia do produto C. Em terceiro lugar, existem trabalhos (AYALA et al., 2017; DONATO et al. 2017) que relatam que algumas cepas de *B. subtilis*, tem a capacidade não só de colonizar o intestino de *C. elegans*, como também de aumentar sua resistência em situações de estresse, devido produção de óxido nítrico e do peptídeo CSF. Existe a possibilidade dessa cepa de *B. subtilis* presente no produto C, conseguir colonizar o intestino de *C. elegans* e fazer com que sua resistência torne-se

aumentada contra a possível ação das outras duas espécies presentes no produto. KISSOYAN et al. (2019), observaram efeito parecido com a colonização de *Pseudomonas fluorescens* no intestino de *C. elegans*, que aumentava a resistência do nematoide contra infecções por *B. thuringiensis*. RIPERT et al. (2016) ainda encontraram a capacidade de *Bacillus* spp. probióticos de produzirem proteases e destruírem as toxinas de *B. cereus*, o que levanta a hipótese de alguma das cepas de bactérias do produto C ter ação negativa sobre as toxinas das outras duas cepas. Mesmo assim podemos considerar que a associação entre as cepas CCTB 04, CCTB 05 e CCTB 09, presentes no produto C, tem potencial nematicida.

Variações de pH dos tratamentos em relação ao controle, não podem ser consideradas como causadoras de toxicidade do produto, uma vez que o tratamento com todos os três produtos apresentou diferenças estatísticas do controle negativo, quando diluído a 10% em PBS, ou seja, ao representarem menos de 3% do volume total da solução produto-nematoide. Uma fração tão pequena da solução dificilmente causaria mudanças tão drásticas no PH a ponto de provocar mortalidade dos nematoides, especialmente ao se tratar de *C. elegans*, que apresenta uma alta tolerância à variações de PH (HALL et al., 2008).

Depois de submetidos à autoclave, os produtos A e C, permaneceram com mesmo efeito tóxico para os nematoides que quando na mesma concentração sem autoclavar, o produto B teve uma leve queda. Mesmo assim, podemos considerar que todos os três produtos apresentaram-se efetivos quando autoclavados. É possível encontrar na literatura, desde estudos em que a ação nematicida de *Bacillus* spp. se manteve a mesma (MOZGOVAYA et al., 2002; XIA et al., 2011), quanto estudos em que ela caiu drasticamente (LEYNS et al., 1995; KOTZE et al., 2005; MARROQUIN et al., 2000). Aparentemente, essa diferença entre resultados obtidos por pesquisadores é explicada pela variação de estabilidade térmica dos compostos produzidos. Entretanto, é sabido que existem formas de aumentar a resistência de esporos e toxinas ao serem submetidos a altas temperaturas. Esporos e toxinas de *Bacillus* mantidos em meios oleosos, toleram aquecimento a maiores temperaturas (NAKAGAWA; SHIGEMOTO; TSUCHIDO, 1998; RAJKOVIC et al., 2008; SENHAJI; LONCIN, 1977). Atualmente, existem ainda estratégias de cunho molecular para aumentar a estabilidade de toxinas, que apresentaram resultados positivos em outros trabalhos (GAO et al., 2014; WANG et al., 2016). Contudo, não tivemos acesso sobre

informações mais aprofundadas com relação à produção e composição dos produtos, para entender se o produto foi propositalmente produzido para ser termoestável ou se existem toxinas produzidas por essas espécies de *Bacillus* que são estáveis em altas temperaturas. Com relação ao produto C, a possibilidade de colonização intestinal pela cepa CCTB 04 em *C. elegans*, pode ter sido responsável pelo aumento da resistência dos nematoides ao produto, como já discutido anteriormente. Portanto, a inativação das bactérias benéficas para o nematoide após o processo de autoclavagem faria o produto tornar-se mais tóxico para *C. elegans*. Este acontecimento não foi observado, visto que os produtos autoclavados e sem autocavar apresentaram eficácias semelhantes. A perda dos benefícios da colonização pode ter sido compensada pela inativação de toxinas que poderiam ter ação nematicida, após superaquecimento. Desta forma, haveria uma compensação entre os efeitos do tratamento térmico que explicaria a manutenção da eficácia do produto.

O período de tempo de 48h utilizado em nosso estudo pode ser considerado suficiente para avaliar a presença de efeito dos produtos sobre *C. elegans*. *Ceanorhabditis elegans* quando tratados com *B. thuringiensis* ou suas toxinas, já apresentam grande deterioração das células intestinais e morte dentro de 24h (BORGONIE et al., 1996; LEYNS et al., 1995; SCHULENBURG; MÜLLER, 2004) e no presente estudo, quando testamos o produto B, à base de *B. thuringiensis*, observamos ação máxima no mesmo período de tempo. Embora não existam trabalhos na literatura que avaliem a ação de *B. subtilis* contra *C. elegans*, diferentes trabalhos mostraram ação nematicida significativa dessa bactéria e de suas toxinas em períodos de tempo de 48h (HUSSAIN et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2014; SOLIMAN; AMEEN; ABDEL-AZIZ, 2019). Em nosso trabalho, no entanto, o percentual de redução máximo em relação ao controle foi alcançada em apenas 24h, com o produto A, também a base de *B. subtilis*. Estes resultados podem se justificar pela mortalidade mais imediata de *C. elegans* em relação a outros nematoides quando expostos à ação de *Bacillus*, já relatada na literatura em outros trabalhos (DEVIDAS; REHIBERGER, 1992; RAE et al., 2010; WEI et al., 2003). Outras cepas de *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* já haviam apresentado considerável atividade nematicida dentro de até 48h contra *C. elegans* e outros nematoides (ENGELBRECHT et al., 2020; LEE; KIM, 2016; LIU; BUDIHARJO; WANG, 2013; PRODAN; ROSALES; ABALLAY, 2015). No caso dos ensaios com o produto A, a queda no percentual de redução do segundo dia na menor

diluição pode ser decorrente de um início de reprodução das populações de *C. elegans* uma vez que os nematoides ficam 12h em estágio de L4 e começam a produzir ovos 12h após mudarem de L4 para fase adulta (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Levando em consideração que os ovos eclodem cerca de 7h após liberados (MUSCHIOL; SCHROEDER; TRAUNSPURGER, 2009), o período de 48h é tempo suficiente para que comecem a aparecer os primeiros estágios da nova geração de nematoides. Este fenômeno só ocorreu na diluição a 5%, possivelmente devido a uma predação das bactérias pelos *C. elegans* resistentes à ação inicial do produto A. Com redução no número de bactérias na solução nematoide/produto no segundo dia de leitura, a produção de toxinas também seria menor, o que dificultou a morte de mais nematoides no segundo dia e permitiu e permitiu sobrevivência da prole. Tal acontecimento não foi observado nas demais concentrações, possivelmente porque a quantidade de *C. elegans* presente nos poços não foi capaz de causar redução significativa em concentrações maiores de bactérias. Com concentrações de bactérias ainda altas no segundo dia, a toxicidade do produto permaneceria a mesma.

Aparentemente, nenhum dos três produtos interferiram na reprodução, contudo, este estudo não avaliou o período total de reprodução de *C. elegans* hemafroditas, já que o período de produção de progênie, após iniciado, dura entre dois e três dias (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Em nosso trabalho houve uma alta mortalidade dos nematoides logo no segundo dia, o que impossibilitou que o experimento se delongasse por mais tempo. A redução no número de vermes vivos do grupo controle no segundo dia, se deu provavelmente porque o meio utilizado, S basal, não é ideal para manter *C. elegans* por muitos dias. O meio líquido mais indicado para ensaios que demandam maior período de tempo é o meio S completo (GUERRERO-RUBIO et al., 2021; HIBSHMAN; WEBSTER; BAUGH, 2021; QIAN et al., 2021). Futuros experimentos podem ser feitos com L4 em um período em torno de 120 horas, para abranger todo o tempo de oviposição dos nematoides. Esta metodologia é interessante para avaliar não só a toxicidade dos *Bacillus* contra *C. elegans*, como também avaliar sua ação na reprodução dos nematoides, que foi observada em trabalhos que utilizaram outras cepas de *Bacillus* (ABD-EL-KHAIR et al., 2019; DUNSTAND-GUZMÁN et al., 2020). Esta redução na quantidade de prole pode ocorrer pela ação ovicida através da produção de enzimas e toxinas produzidas por algumas cepas de *Bacillus* (LEE; KIM, 2016; MESSA; NUNES; MATTEI, 2019;

RAMALAKSHMI et al., 2020; SOLIMAN; AMEEN; ABDEL-AZIZ, 2019). Marroquin *et al.* (2000), ainda afirmam que quando *C. elegans* é atacado por *B. thuringiensis*, o estresse sofrido pelos nematoides sobreviventes reflete em menor tamanho da ninhada e desenvolvimento mais lento da progênie.

## Conclusão

O nematoide *C. elegans* pode funcionar como um bom modelo para testes *in vitro* de toxicidade à bactérias do gênero *Bacillus*. Os produtos A e B podem ser considerados controladores de nematoides e se mostraram eficazes mesmo em altas diluições e após superaquecimento. O produto C também apresenta toxicidade contra nematoides, mesmo quando superaquecido, mas perde eficácia se diluído. Os três produtos devem ser testados na avaliação de eficácia contra nematoides de importância agrícola, humana e veterinária.

## 5. Referências

A ABABOUC, L.; BUSTA, F. F.; Effect of thermal treatments in oils on bacterial spore survival. **Journal of Applied Bacteriology**. p. 491–502, v. 62, n. 2, 1987.

ABD-EL-KHAIR, H. et al. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s42269-019-0108-8>. Acessado: 24 Mai. 2021.

ABD-EL-SALAM, M.S. et al. Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lysinibacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 31, 2018. Disponível em: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-018-0034-3>. Acessado 1 jun. 2021.

AMORIM, L.S. et al. Anthelmintic activity of the ethanol extract of the *Uncaria guianensis* (*Rubiaceae*) on eggs and larvae of gastrointestinal nematodes of sheep in the Western Amazon Region. **Acta Veterinaria Brasilica** v. 15, p. 66–74, 2021.

ANANY A.E. et al. Effects of some insecticides and nematicides on penetration, infectivity and reproduction of the entomopathogenic nematodes. **Journal of Plant Protection and Pathology** v. 1, n. 4, p. 219–230, 2010.

ANTIL, S. et al. On the potential of *Bacillus aryabhattai* KMT-4 against *Meloidogyne javanica*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 67, 2021. Disponível: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-021-00417-2>. Acessado: 7 Mai. 2021.

ARNAOUTELI, S. et al. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 600-614, 2021.

AYALA, F. R. et al. Microbial flora , probiotics , *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity. **Microbial Cell**. v. 4, n. 4, p. 133–136, 2017.

BIAIAK, B. H. B.; LEHNEN, C. R.; ROCHA, R. A. DA. Anthelmintic resistance of injectable macrocyclic lactones in cattle: A systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 28, n. 1, p. 59–67, 2019.

BASAIID, K. et al. Biological activities of essential oils and lipopeptides applied to control plant pests and diseases: a review. **International Journal of Pest Management**, v. 67, n. 2, p. 155–177, 2020.

BASTOS, T. S. et al. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. **BMC Veterinary Research**. v. 16, n. 116, 2020. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02321-7>. Acessado: 7 Jun. 2021.

BEYDOUN, S. et al. An alternative food source for metabolism and longevity studies in *Caenorhabditis elegans*. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2021.

BHAT, A. H. et al. Morphological, morphometrical, and molecular characterization of *Metarhabditis amsactae* (Ali, Pervez, Andrabi, Sharma and Verma, 2011) Sudhaus, 2011 (Rhabditida, Rhabditidae) from India and proposal of *Metarhabditis longicaudata* as a junior synonym of *M. amstacae* . **Journal of Nematology**, v. 52, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33829202/>. Acessado: 19 jul. 2021.

BILAL, M. et al. Effects of novel probiotic strains of *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* on production, gut health, and immunity of broiler chickens raised under suboptimal conditions. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579120309007>. Acessado 20 jun. 2021

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOV, T. Molecular Aspects of Plant Growth Promotion and Protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. v. 34, n. 1, p. 15–25, 2021.

BORGONIE, G. et al. Effect of nematicidal *Bacillus thuringiensis* strains on free-living nematodes. 1. light microscopic observations, species and biological stage specificity and identification of resistant mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, n. 4, p. 391–398, 1996.

BORRAJO, M. P.; MONDINO, E. A.; MARONICHE, G. A. Potential of rhizobacteria native to Argentina for the control of *Meloidogyne javanica*. **Revista Argentina de Microbiología** 2021. Acessado em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754121000456>.

BUBRIG, L. T.; SUTTON, J. M.; FIERST, J. L. *Caenorhabditis elegans* dauers vary recovery in response to bacteria from natural habitat. **Ecology and Evolution**, v. 10, n. 18, p. 9886–9895, 2020.

CHARUCHAIBOVORN, S. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry5B is Active against *Strongyloides stercoralis* in vitro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 5, p. 1177–1182, 2019.

CHAVES, D. A. et al. Article The RNA phosphatase PIR-1 regulates endogenous small RNA pathways in *C. elegans* || Article The RNA phosphatase PIR-1 regulates endogenous small RNA pathways in *C. elegans*. **Molecular Cell**, v. 81, n. 3, p. 546–557, 2021.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent window into biology : A primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. p. 387-407, v. 200, n. 2, p. 1–31, 2015.

CRICKMORE, N. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. **Trends in Microbiology**. v. 13, n. 8, p. 347–350, 2005.

DAS, S.; ABDUL WADUD, M.; ATIQR RAHMAN KHOKON, M. Functional evaluation of culture filtrates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on the mortality and hatching of *Meloidogyne javanica*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1318–1323, 2021.

DAS, S.; WADUD, A.; RAHMAN, A. Saudi Journal of Biological Sciences Functional evaluation of culture filtrates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on the mortality and hatching of *Meloidogyne javanica*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1318–1323, 2021.

DAUPARAITĖ, E. et al. Anthelmintic resistance of horse strongyle nematodes to ivermectin and pyrantel in Lithuania. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 63, n. 1, 2021. Disponível em:  
<https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13028-021-00569-z>.  
 Acesso: 3 de setembro de 2021.

DICHUSA, C. A. et al. Survey and identification of entomopathogenic nematodes in the province of Cotabato, Philippines, for biocontrol potential against the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 60, 2021. Disponível em:  
<https://link.springer.com/article/10.1186/s41938-021-00390-w#citeas>. Acessado: 19 Jun. 2021.

DU, R. et al. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the gut microbiota of growth-retarded beef calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 2006, 2018. Disponível em:  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02006/full>. Acessado: 4 jun. 2021.

DUNSTAND-GUZMÁN, E. et al. Nematicidal and ovicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the zoonotic nematode *Ancylostoma caninum*. **Experimental**

**Parasitology**, v. 218, 2020. Disponível em:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419304813?via%3Dihub>. Acessado: 11 jun. 2021.

EL-NAGDI, W. M. A.; ABD-EL-KHAIR, H. Application of *Bacillus* species for controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in eggplant. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019. Disponível em:  
<https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0187-6>. Acesso: 11 jun. 2021.

ENGELBRECHT, G. et al. In vitro bioassays to determine the effect of *Bacillus soli* filtrates on the paralysis of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Nematology**, v. 22, n. 2, p. 239–243, 2020.

FÉLIX, M. A.; DUVEAU, F. Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*. **BMC Biology**, v. 10, n. 1, 2012. Disponível em: <https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-10-59>. Acessado: 24 jun. 2021.

FOUDA, A. et al. Inhabiting the Leaves of *Pulicaria incisa* ( Lam .) DC Inherent to Arid Regions. **Plants** , v. 10, n. 1, 2021. Acessado em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/1/76>.

FRÉZAL, L.; FÉLIX, M. A. *C. elegans* outside the Petri dish. **eLife**, v. 4, 2015. Acessado em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373675/>.

GAMEZ, R. et al. Screening , plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria ( *Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 ) on banana cv . Williams ( *Musa acuminata Colla* ). **Microbiological Research**, v. 220, p. 12–20, 2019.

GAO, X. et al. Enhanced thermal stability and hydrolytic ability of *Bacillus subtilis* aminopeptidase by removing the thermal sensitive domain in the non-catalytic region. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014. Disponível em:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092357>.  
Acessado: 22 jun. 2021.

GARCÍA-MONTELONGO, M. et al. Use of RNAi as a preliminary tool for screening putative receptors of nematocidal toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1649–1656, 2021.

GENG, C. et al. Dissimilar Crystal Proteins Cry5Ca1 and Cry5Da1 Synergistically Act against *Meloidogyne incognita* and Delay Cry5Ba-Based Nematode Resistance. **Applied Environmental Microbiology**. v. 83, n. 18, 2017. Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583498/>. Acessado: 29 Jun. 2021.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematocidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2567–2575, 2007.

GUERRERO-RUBIO, M. A. et al. Flavonoids' effects on *Caenorhabditis elegans* longevity, fat accumulation, stress resistance and gene modulation involve mTOR, SKN-1 and DAF-16. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2021.

HALL, R. A. et al. External pH influences the transcriptional profile of the carbonic anhydrase, CAH-4b in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 161, n. 2, p. 140–149, 2008.

HIBSHMAN, J. D.; WEBSTER, A. K.; BAUGH, L. R. Liquid-culture protocols for synchronous starvation, growth, dauer formation, and dietary restriction of *Caenorhabditis elegans*. **STAR Protocols**, v. 2, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S266616672030263X?via%3Dihub>. Acessado: 19 Jun. 2021.

HILLIER, L. W. et al. Genomics in *C. elegans*: So many genes, such a little worm. **Genome Research**. n. 15, v. 12, p. 1651–1660, 2005.

HOAI, T. D. Reproductive strategies of parasitic flatworms (Platyhelminthes, Monogenea): the impact on parasite management in aquaculture. **Aquaculture International**. v. 28, p. 421–447, 2020.

FRANKS, C. J. et al. Anatomy, physiology and pharmacology of *Caenorhabditis elegans* pharynx: a model to define gene function in a simple neural system. **Invertebrate Neuroscience**. v. 6, n. 3, p. 105–122, 2006.

GAZIEA, M. et al. Effect of Treatment Time on Biocontrol Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lysinibacillus sphaericus* and their Fusants against Root knot Nematode *Meloidogyne incognita* Infecting Tomato Plants. **Middle East Journal of Agriculture Research**. v. 6, n. 2, p. 369–375, 2017.

HU, Y. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry5B protein as a new pan-hookworm cure. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance** v. 8, n. 2, p. 287–294, 2018.

HUANG, T. et al. Nematicidal Activity of Cry1Ea11 from *Bacillus thuringiensis* BRC-XQ12 Against the Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Phytopathology**. v. 21, n.1, p. 44–51, 2018.

HUSSAIN, T. et al. Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of Root Gallings caused by *Meloidogyne incognita*. **Vegetos**, v. 33, n. 2, p. 229–238, 2020.

JABBOROVA, D. et al. Plant growth promoting bacteria *Bacillus subtilis* promote growth and physiological parameters of Zingiber officinale Roscoe. **Plant Science Today** v. 8, n. 1, p. 66–71, 2021.

JAMAL, Q. et al. Identification for the first time of cyclo(D-Pro-L-Leu) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* y1 as a nematocide for control of *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v. 22, n. 11, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6150376/>. Acessado: 21 Jun. 2021.

- KHO, M. F. et al. The Pore-Forming Protein Cry5B Elicits the Pathogenicity of *Bacillus* sp . against *Caenorhabditis elegans*. **Plos one**. v. 6, n. 12, 2011. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0029122>. Acessado: 26. jun. 2021.
- KISSOYAN, K. A. B. et al. Natural *C. elegans* Microbiota Protects against Infection via Production of a Cyclic Lipopeptide of the Viscosin Group Report Natural *C. elegans* Microbiota Protects against Infection via Production of a Cyclic Lipopeptide of the Viscosin Group. **Current Biology**, v. 29, n. 6, p. 1030- 1037, 2019.
- KOTZE, A. C. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology** v. 35, n. 9, p. 1013–1022, 2005.
- KOURMENTZA, K. et al. Antimicrobial Activity of Lipopeptide Biosurfactants Against Foodborne Pathogen and Food Spoilage Microorganisms and Their Cytotoxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.561060/full>. Acessado: 18 Jun. 2021.
- LALTHANPUII, P. B.; LALCHHANDAMA, K. Phytochemical analysis and *in vitro* anthelmintic activity of *Imperata cylindrica* underground parts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
- LEE, Y. S.; KIM, K. Y. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 1, p. 29–39, 2016.
- LEYNS, F. et al. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Fundamental Applied Nematology**. v. 18, n. 3, p. 211–218, 1995.
- LI, H. et al. Recombinant Paraprobiotics as a New Paradigm for Treating. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 65, n. 3, p. 1–15, 2021.
- LI, L.; TAN, J.; CHEN, F. *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 shows nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus* via the production of a guanidine compound. **Biocontrol Science and Technology**, v. 28, n. 12, p. 1128–1139, 2018.
- LI, Y. et al. Surfactin and fengycin contribute to the protection of a *Bacillus subtilis* strain against grape downy mildew by both direct effect and defence stimulation. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 8, p. 1037–1050, 2019.
- LIU, H.; TIAN, L.; WANG, D. Biochemical and Biophysical Research Communications Notch receptor GLP-1 regulates toxicity of simulated microgravity stress by activating germline-intestine communication of insulin signaling in *C. elegans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 534, p. 248–253, 2021.
- LIU, Z.; BUDIHARJO, A.; WANG, P. The highly modified microcin peptide

plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10081–10090, 2013.

LOBNA, M.; ZAWAM, H. Efficacy of some Biocontrol Agents on Reproduction and Development of *Meloidogyne incognita* Infecting Tomato. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 495–509, 2010.

LUO, H. et al. The effects of *Bacillus thuringiensis* Cry6A on the survival, growth, reproduction, locomotion, and behavioral response of *Caenorhabditis elegans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10135–10142, 2013.

MAQBOOL, I. et al. Integrated parasite management with special reference to gastro-intestinal nematodes. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2017.

MARDANOVA, A. et al. Effect of probiotic strains of *Bacillus subtilis* on the growth parameters of broiler chickens and caecal microbiota. **E3S Web of Conferences**, v.22, n. 2054, 2020. Disponível em: [https://www.e3sconferences.org/articles/e3sconf/abs/2020/82/e3sconf\\_daic2020\\_02054/e3sconf\\_daic2020\\_02054.html](https://www.e3sconferences.org/articles/e3sconf/abs/2020/82/e3sconf_daic2020_02054/e3sconf_daic2020_02054.html). Acessado: 24 jun. 2021.

MONTALVÃO, L.C.S. et al. *Caenorhabditis elegans* as an indicator of toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains to *Meloidogyne incognita* race 3. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 7, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/LsvStmkHcGJbbPnpFxfdzVC/abstract/?lang=en>. Acessado 29 jun. 2021.

MARROQUIN, L. D. et al. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 155, n. 4, p. 1693–1699, 2000.

MESSA, V.; NUNES, J.; MATTEI, D. Seed Treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* for the control of *Meloidogyne javanica* “in vivo” bean culture and its direct effect on the motility, mortality and hatching of *M. javanica* “in vitro”. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 59, 2019. Disponível em: <https://www.mecenaspublishing.com/journals/index.php/asbjournal/article/view/87>. Acessado: 16 jun. 2021.

MICKIEWICZ, M. et al. Prevalence of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in Polish goat herds assessed by the larval development test. **BMC Veterinary Research** v. 17, n. 19, 2021. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02721-9>. Acessado: 19 jun. 2021.

MIGUNOVA, V. D.; SASANELLI, N. Bacteria as Biocontrol Tool against Phytoparasitic Nematodes. **Plants**, v. 10, n. 2, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/2/389>. Acessado: 30 jun. 2021.

MOZGOVAYA, I. N. et al. Nematicidal effects of the entomopathogenic bacteria

*Bacillus thuringiensis* in soil. **Pedobiologia**, v. 46, n. 6, p. 558–572, 2002.

MPHAHLELE, M. et al. Anthelmintic resistance and prevalence of gastrointestinal nematodes infecting sheep in Limpopo Province, South Africa. **Veterinary World** v. 14, p. 302–313, 2021.

MUSCHIOL, D.; SCHROEDER, F.; TRAUNSPURGER, W. Life cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method. **BMC Ecology**, v. 9, n. 14, 2009. Disponível em: <https://bmcecol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6785-9-14>. Acessado: 5 jun. 2021.

NAGÓRSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKI, M. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 3, p. 495–508, 2007.

NAKAGAWA, K.; SHIGEMOTO, M.; TSUCHIDO, Y. Increased Heat Resistance of *Bacillus subtilis* Spores in Oil. **Biocontrol Science**. v. 3, n. 2, p. 87–92, 1998.

OLIVEIRA, D. F. et al. Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 525–538, 2014.

OPRIESSNIG, T. et al. *Bacillus pumilus* probiotic feed supplementation mitigates *Lawsonia intracellularis* shedding and lesions. **Veterinary Research**, v. 50, n. 85, 2019. Disponível em: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-019-0696-1>. Acessado: 25 jun. 2021.

ORTIZ, A.; RATZKE, C.; GORE, J. Interspecies bacterial competition regulates community assembly in the *C. elegans* intestine. **The ISME Journal**, v. 15, n. 7, p. 2131–2145, 2021.

OSMAN, G. Y.; SALEM, F. M.; GHATTAS, A. Bio-efficacy of two bacterial insecticide strains of *Bacillus thuringiensis* as a biological control agent in comparison with a nematicide, nemacur, on certain parasitic nematoda. **Anzeiger für Schädlingkunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v. 61, n. 2, p. 35–37, 1988.

OSMAN, H. A. et al. Efficacy of integrated microorganisms in controlling root-knot nematode *Meloidogyne javanica* infecting peanut plants under field conditions. **Bulletin of the National Research Centre**. v. 44, n. 134, 2020.

PALOMERO, A. M. et al. Formulating fungal spores to prevent infection by trichostrongylids in a zoological park : Practical approaches to a persisting problem. **Biological Control** v. 152, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964420306939?via%3Dihub>. Acessado 19 jun. 2021.

PEÑA-ESPINOZA, M. Drug resistance in parasitic helminths of veterinary importance in Chile: Status review and research needs. **Austral journal of veterinary sciences**, v. 50, n. 2, p. 65–76, 2018.

PENG, D. et al. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry6Aa and Cry55Aa toxins against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 794–798, 2011.

PENG, D. et al. A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 846–862, 2016.

PINTARD, L.; BOWERMAN, B. *Mitotic Cell Division in Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. v. 211, n. 1, p. 35 - 73, 2019.

PINTO, N. B. et al. Controlling gastrointestinal nematodes in cattle by *Bacillus* species. **Veterinary Parasitology**, v. 245, n. 15, p. 1–4, 2017.

PRODAN, S.; ROSALES, I. M.; ABALLAY, E. Exoenzymes and metabolites related to the nematicidal effect of rhizobacteria on *Xiphinema index* Thorne & Allen. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, n. 2, p. 413 - 424, 2016.

QIAN, K. Y. et al. Male pheromones modulate synaptic transmission at the *C. elegans* neuromuscular junction in a sexually dimorphic manner. **eLife**, v. 10, 2021. Acessado em: <https://elifesciences.org/articles/67170>.

RAE, R. et al. A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 3007–3021, 2010.

RAJKOVIC, A. et al. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. **Letters in Applied Microbiology** v. 46, p. 536–541, 2008.

RAMALAKSHMI, A. et al. Nematicidal activity of native *Bacillus thuringiensis* against the root knot nematode , *Meloidogyne incognita* ( Kofoid and White ). **Egyptian Journal of Biological Pest Control** v. 30, n. 90, 2020. Disponível em: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-020-00293-2#citeas>. Acessado: 27 jun. 2021.

RAMYABHARATHI, S. A. et al. Biocontrol of wilt-nematode complex infecting gerbera by *Bacillus subtilis* under protected cultivation. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 21 , 2018. Disponível em: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-018-0027-2#citeas>. Acessado 14 jun. 2021.

RIPERT, G. et al. Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins. **Antimicrobial Agents and Ahemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3445–3454, 2016.

RODRI, F. *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through

downregulation. **Nature Communications**. v. 8, n. 14332, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms14332>. Acessado 9 jun. 2021.

SALEHI JOUZANI, G. et al. Molecular detection of nematicidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 812–822, 2008.

SANDERS, J. et al. International Journal for Parasitology : Drugs and Drug Resistance A new paraprobiotic-based treatment for control of *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 230–236, 2020.

SCHULENBURG, H.; FÉLIX, M. A. The natural biotic environment of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 206, n. 1, p. 55–86, 2017.

SCHULENBURG, H.; MÜLLER, S. Natural variation in the response of *Caenorhabditis elegans* towards *Bacillus thuringiensis*. **Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 433–443, 2004.

SENHAJI, A. F.; LONCIN, M. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (I). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 12, n. 3, p. 203–216, 1977.

SHPIILKA, T. et al. UPRmt scales mitochondrial network expansion with protein synthesis via mitochondrial import in *Caenorhabditis elegans*. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 2021.  
Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33473112/>. Acessado: 9 jun. 2021.

SMOCK, T. M. et al. Effects of *Bacillus subtilis* PB6 and / or chromium propionate supplementation on clinical health , growth performance , and carcass traits of high-risk cattle during the feedlot receiving and finishing periods. **Translational Animal Science**. v. 4, n. 3, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7584392/>. Acessado 8 jun. 2021.

SOLIMAN, G. M.; AMEEN, H. H.; ABDEL-AZIZ, S. M. *In vitro* evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*. **Bulletin of the National Research Centre**. v. 43, n. 171, 2019. Disponível em: <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0200-0>. Acessado: 6 Jun. 2021.

STERKEN, M. G. et al. The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 5, p. 224–231, 2015.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, 2006. Disponível em: [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_strainmaintain/strainmaintain.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html). Acessado: 8 jun. 2021.

TIAN, B.; YANG, J.; ZHANG, K. Bacteria used in the biological control of plant-

parasitic nematodes : populations , mechanisms of action , and future prospects. **FEMS Microbiology Ecology** 2007. v. 61, n. 2, p. 197-213, 2007.

URBAN, J. F. et al. An inactivated bacterium (paraprobiotic) expressing *Bacillus thuringiensis* Cry5B as a therapeutic for *Ascaris* and *Parascaris* spp . infections in large animals. **One Health**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771421000318>. Acessado: 16 jun. 2021.

VERDUZCO-ROSAS, L. A. et al. Selection and characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains showing nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 5, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/368/8/fnab044/6244240>. Acessado: 28 jun. 2021.

WAN, L. et al. *Bacillus thuringiensis* targets the host intestinal epithelial junctions for successful infection of *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Microbiology**. v. 21, p. 1086–1098, 2019.

WANG, B. et al. A Proteomic Analysis Provides Novel Insights into the Stress Responses of *Caenorhabditis elegans* towards Nematicidal Cry6A Toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

WANG, J. et al. Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 79, 2016. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0490-5#citeas>. Acessado: 10 jun. 2021.

WEI, J. Z. et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2760–2765, 2003.

XIA, Y. et al. The purL gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS Microbiology Letters**. v. 322, n. 2, p. 99-107 2011.

XIANG, N. et al. Biological Control of *Meloidogyne incognita* by Spore-forming Plant Growth-promoting Rhizobacteria on Cotton. **Plant Disease**. v. 101, n. 5, p. 774–784, 2017.

XIANG, N. *In vitro* screening of biological control agents on *Meloidogyne incognita* . **Conference: 2014 Beltwide Cotton Conference**. v. 1, p. 258-260, 2014.

YANG, D. M. et al. Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). **Acta Horticulturae**, v. 712, n. 2, p. 735–739, 2006.

YANG, Y. et al. Recombinant HcGAPDH Protein Expressed on Probiotic *Bacillus subtilis* Spores Protects Sheep from *Haemonchus contortus* Infection by Inducing both Humoral and Cell Mediated Responses. **American Society Microbiology**. v. 5,

n. 3, 2020. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/mSystems.00239-20>. Acessado: 5 jun. 2021.

YOHANNES, K. W. et al. Prebiotic, Probiotic, Antimicrobial, and Functional Food Applications of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 50, p. 14709–14727, 2020.

ZHAO, D. et al. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. **Biological Control**, v. 119, p. 12–19, 2018.

ZHENG, D. et al. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. **Microbiological Research**, v. 215, p. 22–28, 2018.

ZHENG, Z. et al. Nematicidal spore-forming Bacilli share similar virulence factors and mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, n.1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990965/pdf/srep31341.pdf>. Acessado: 2 jun. 2021.

## CAPÍTULO 2

Avaliação de eficácia de formulações comerciais à base de *Bacillus* spp. contra os nematoides *Panagrellus redivivus* e *Metarhabditis* spp.

## Resumo

A resistência anti-helmíntica é um dos mais sérios problemas enfrentados no contexto da produção animal. Dentre as alternativas estudadas para controle de nematoides, muitas bactérias do gênero *Bacillus* merecem destaque. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro*, a eficácia das formulações comerciais A, B e C, originalmente não-nematicidas, no controle de *Panagrellus redivivus*, modelo experimental, e *Metarhabditis* spp, causador de otite parasitária externa em bovinos. O produto A é constituído por *B. subtilis* QST-713, o produto B por *B. thuringiensis* CCT 1306 e o produto C por uma associação entre *B. subtilis* CCTB04, *B. pumilus* CCTB05 e *B. amyloliquefaciens* CCTB09. Os testes foram feitos em placas de microtitulação, onde os produtos foram avaliados a cada 24h por um período total de 120h nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 5% além do produto autoclavado na concentração máxima. Os ensaios também contaram com um controle positivo e um controle negativo. Foram feitas ainda as diluições necessárias para que seja alcançada a DL50 de cada produto. Os resultados obtidos das contagens foram transformados em percentual de redução pela fórmula: Percentual de redução =  $[(C1 - C2) / C1] \times 100$ , onde C1 é a média de nematoides vivos no grupo controle e C2 é o número de nematoides vivos em cada repetição do grupo tratado. Para as análises estatísticas foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas, além do cálculo de DL50 para cada produto. Contra *Metarhabditis* spp., a DL50 foi de 5 ml/L atingida logo em 24h para o produto A e 2 ml/L também em 24h para o produto B. Para *P. redivivus*, a DL50 mínima para o produto A foi de 47 ml/L atingida em 96h e para o produto B de 165 ml/L, obtida em 120h. O produto C não obteve percentual de redução mínimo de 50% em testes com nenhum dos nematoides. Os produtos A e B também apresentaram altos percentuais de redução mesmo após diluídos. O produto A apresentou-se tão eficaz quanto o controle positivo contra *P. redivivus* a partir da diluição a 25% em 120h e em todas as concentrações testadas contra *Metarhabditis* spp., em apenas 24h. O produto B apresentou eficácia semelhante a do controle positivo contra *P. redivivus* a partir da diluição de 50% em 96h e em todas as concentrações testadas contra *Metarhabditis* spp., em apenas 24h. Os produtos A e B também mantiveram eficácia após tratamento com autoclave, quando testados contra os dois nematoides. As populações de nematoides tratadas com o produto C em todas as concentrações e no tratamento

autoclavado cresceram em relação ao grupo controle. Nossos resultados revelam que os produtos A e B possuem alto potencial nematicida, mesmo diluídos ou superaquecidos, e podem ser explorados como anti-helmínticos em estudos futuros. O produto C, no entanto não se mostrou eficaz contra nematoides e ainda provou ser útil para a proliferação de *P. redivivus*.

## 1. Introdução

Um grande problema recorrente na área de produção animal é a resistência anti-helmíntica, que já pode ser observada nas diferentes bases de fármacos utilizados atualmente (BAIAK; LEHNEN; ROCHA, 2019; KELLEHER et al., 2020; PEÑA-ESPINOZA, 2018). Para contornar este problema, buscam-se novas alternativas para o controle de nematoides, como a utilização de extratos botânicos, óleos essenciais, implantação de manejo integrado de pastagens e do controle biológico (LALTHANPUII; LALCHHANDAMA, 2020; MAQBOOL et al., 2017; PALOMERO et al., 2021; PENSEL et al., 2014). Dentre as alternativas de controle parasitário existentes, a utilização de bactérias do gênero *Bacillus* spp. se destaca como importante forma de combate de helmintos parasitas de plantas, animais e humanos (ANTIL et al., 2021; CHARUCHAIBOVORN et al., 2019; DUNSTAND-GUZMÁN et al., 2020).

Uma das espécies do gênero *Bacillus* mais estudadas à respeito de controle de pragas é *B. thuringiensis*. A ação anti-helmíntica produzida por esta bactéria é causada principalmente pela ação de toxinas produzidas denominadas proteínas Cry (GARCÍA-MONTELONGO et al., 2021; SHI et al., 2020; VERDUZCO-ROSAS et al., 2021). Também amplamente estudada, a bactéria *B. subtilis* se destaca no controle anti-helmíntico pela produção de lipopetídeos cíclicos com ação nematicida (ANTIL et al., 2021; MIGUNOVA, 2021; RAMYABHARATHI et al., 2018). Sua facilidade de formação de biofilme e de estabelecimento em superfícies, faz com que *B. subtilis* seja comumente utilizada como probiótico para animais (ARNAOUTELI et al., 2021; HELAL et al., 2021; NAUMOVA et al., 2021). Existem ainda várias outras espécies de *Bacillus* que produzem diferentes e alguns até ainda desconhecidos compostos secundários com ação tóxica para nematoides, como é o caso de *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus* (ABD-EL-KHAIR et al., 2019; ENGELBRECHT et al., 2020; GAZIEA, et al. 2017; TADIGIRI et al., 2020).

*Panagrellus redivivus* é um nematoide de vida livre, comumente utilizado em testes para a avaliação de ação nematicida de diferentes compostos, químicos ou naturais (KISS et al. 2021; LUBIAN et al. 2019; SALAS, ACHINELLY, SAUKA., 2021). Este nematoide é encontrado naturalmente em solos úmidos e ricos em matéria orgânica e alimenta-se de bactérias presentes no ambiente (SALAS, ACHINELLY, SAUKA, 2021; STOCK; NADLER, 2006). Seu ciclo de vida dura entre 20 e 25 dias e começa a se reproduzir a partir do terceiro dia de vida, totalizando em torno de 300 descendentes. Em um período entre 24h e 36h são produzidos de 10 a 40 ovos dentro do útero da fêmea (FIGUEROA, 2009; KOLENSKI et al., 2019). A alta taxa de proliferação, sobrevivência em diferentes meios de cultura, resistência ao congelamento e genoma sequenciado do *P. redivivus*, tornam-no um importante modelo para pesquisas com nematoides (HAYASHI; WHARTON, 2011; IMRAN et al., 2019; SOUSA et al., 2018; SRINIVASAN et al., 2013).

Nematoides gênero *Metarhabditis* são encontrados normalmente em solos úmidos e matéria orgânica em decomposição, e apresentam comportamento bacteriófago (BHAT et al., 2021; DICHUSA et al., 2021; MEHMOOD, 2019). As espécies desse gênero que tem importância veterinária no Brasil são *M. blumi*, *M. costai* e *M. freitasi* (BARBOSA et al., 2016; MONTEIRO E SILVA et al., 2016; MARTINS, 1985) . Todas essas espécies inicialmente foram classificadas como *Rhabditis*, mas transferidas para o gênero *Metarhabditis* por Sudhaus *et al.* (2011), com a justificativa de presença de corpo delgado e ventralmente curvado, com estriações transversais e longitudinais na cutícula. Estes parasitos causam otite parasitária externa principalmente em animais da raça Gir, doença que implica em grandes perdas econômicas, por reduzir consumo de alimento pelos animais, ganho de peso, produção de leite e eficiência reprodutiva do rebanho (CARDONA; GONZÁLEZ; ÁLVAREZ, 2010; LEITE et al., 2013; LUIS; RIBEIRO, 2018). Não existem trabalhos na literatura que avaliaram susceptibilidade de *Metarhabditis* spp. à ação de bactérias do gênero *Bacillus*.

Ainda existem muitas cepas de *Bacillus* spp. com grande potencial nematicida que não foram exploradas contra muitos nematoides de importância veterinária. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de três produtos comerciais originalmente não-nematicidas, constituídos à base de *Bacillus* (designados como A, B e C; que são utilizados originalmente, no controle pragas agrícolas e estimulante de fertilidade do

solo) no controle dos nematoides *Panagrellus redivivus* e *Metarhabditis* em condições de laboratório.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Comitê de Ética no Uso de Animais**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, CEUA/UFV, e corresponde ao processo nº 34/2021.

### **2.2. Origem dos nematoides**

*Metarhabditis* spp. e *P. redivivus* foram provenientes do Laboratório de Parasitologia Veterinária, localizado no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG. Os *Metarhabditis* spp. eram mantidos em culturas de ágar-sangue em temperatura ambiente e repicados semanalmente. As culturas de *P. redivivus* eram mantidas em meios de água e aveia, também em temperatura ambiente e repicados a cada três semanas.

### **2.3. Produtos utilizados**

O produto A é composto por *Bacillus subtilis*, cepa QST-713, na concentração de  $1,3 \times 10^7$  UFC/ml, originalmente classificado como fungicida e bactericida. O produto B é composto por *B. thuringiensis*, subespécie kurstaki, cepa CCT 1306, na concentração  $5 \times 10^{10}$  esporos viáveis/ml e é direcionado para o controle de insetos da ordem Lepidoptera. O produto C é composto por uma associação entre *B. subtilis*, cepa CCTB04, *B. pumilus* cepa CCTB05 e *B. amyloliquefaciens*, cepa CCTB09, todos na concentração de  $1 \times 10^{11}$  endósporos/l e é utilizado como inoculante do solo.

### **2.4. Teste de eficácia dos produtos contra *Panagrellus redivivus*.**

*Panagrellus redivivus* foram filtrados do seu meio de aveia e água em lenço Mili® para um béquer de 50 ml. Depois da homogeneização da solução resultante, cinco alíquotas de 50 µL foram retiradas com o auxílio de um pipeta semiautomática e lidas em microscópio óptico, para que seja mensurado o número de nematoides por alíquota. A partir dos resultados obtidos das leituras, foi calculado o volume necessário para que sejam inoculados 50 nematoides em cada poço de placas de microtitulação estéreis de 96 poços. Os tratamentos testados foram os produtos A, B e C diluídos a 100%, 50%, 25%, 10% e 5% e autoclavado à 121°C por 20 minutos, em concentração

máxima. Todas as diluições foram feitas em PBS (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1L de água destilada e PH ajustado para 7,4). No experimento, houve um controle positivo, com solução de lugol (1 ml de Iodo cristalizado; 5ml de Iodeto de Potássio; 100 ml de água destilada) e um controle negativo com solução de PBS tamponada (PH = 7,4). Todos os controles e os tratamentos foram adicionados na proporção nematoides/tratamento 2:1 (40 µl de solução de nematoides e 20 µl de tratamento) em 12 réplicas. O mesmo procedimento foi repetido em cinco placas de microtitulação de 96 poços. Todo o processo de inoculação dos tratamentos na solução de nematoides foi feito dentro da capela, com fluxo de ar ligado. As placas foram embaladas em sacos plásticos, para evitar evaporação excessiva do conteúdo. Em seguida, foram armazenadas em incubadora Biochemical Oxygen Demand (BOD), por cinco dias a 25°C. A cada 24h, todo o conteúdo presente em cada poço de uma das cinco placas, escolhida aleatoriamente, era pipetado depositado em lâmina, coberto com lamínula e lido sobre microscópio óptico, até o quinto dia de contagem, ou seja, dentro de um período de 120h. Todo o ensaio foi repetido três vezes, nos mesmos padrões. Para o cálculo de DL50, no caso dos produtos A e B, foi necessário outro ensaio em triplicata, em que novas placas foram lavadas e os nematoides e tratamentos foram novamente pipetados da mesma maneira que foi realizado o primeiro experimento. Entretanto, dessa vez as concentrações avaliadas foram de 1%, 0,5% e 0,1%.

#### 2.5. Testes de eficácia dos produtos contra *Metarhabditis* spp.

Sete dias após o repique, placas de Petri onde eram mantidos os *Metarhabditis* spp. foram lavadas com 10 ml de PBS (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1L de água destilada e PH ajustado para 7,4). O volume obtido foi transferido para um béquer de 50 ml, com o auxílio de pipeta de Pasteur, para homogeneização da solução com nematoides. Com o auxílio de uma pipeta semiautomática, foram retiradas cinco alíquotas de 50 µl e lidas em microscópio óptico, para mensurar a média de *Metarhabditis* spp. por alíquota. Foram inoculados 50 *Metarhabditis* spp. em placas de microtitulação estéreis de 96 poços. Os tratamentos testados foram os produtos A, B e C, cada um nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 5% e autoclavado à 121°C por 20 minutos, em concentração máxima. As diluições foram feitas em PBS. O controle positivo foi feito com solução de lugol (1 ml de Iodo cristalizado; 5ml de Iodeto de Potássio; 100 ml de água destilada)

e o controle negativo com solução de PBS tamponada (PH = 7,4). Todos os tratamentos e os controles foram adicionados na proporção nematoide/tratamentos de 2:1 (40 µl de solução de nematoides e 20 µl de tratamento) e em 12 réplicas. O mesmo procedimento foi repetido em cinco placas de microtitulação. Todo o processo de inoculação dos tratamentos na solução de nematoides, foi realizado dentro da capela, com fluxo de ar ligado. As placas foram embaladas em sacos plásticos, para evitar evaporação excessiva do conteúdo, e incubadas em BOD, por cinco dias. A cada 24h, todo o conteúdo presente em cada poço de uma das cinco placas, escolhida aleatoriamente, era pipetado, depositado em lâmina, coberto com lamínula e lido em microscópio óptico, até o quinto dia de contagem, ou seja, no período de 120h. Todo o ensaio foi repetido três vezes, nos mesmos padrões. Para o cálculo de DL50, no caso dos produtos A e B, foi necessário outro ensaio em triplicata, em que novas placas foram lavadas e os nematoides e tratamentos foram novamente pipetados da mesma maneira que foi realizado o primeiro experimento. Entretanto, dessa vez as concentrações avaliadas foram de 1%, 0,5% e 0,1%.

## 2.6. Análises estatísticas

O percentual de redução foi calculado para cada repetição de acordo com a fórmula de Abdel-Salam (2018): Percentual de redução =  $[C1 - C2 / C1] \times 100$ , onde C1 é o número da média de nematoides vivos no grupo controle e C2 é o número de nematoides vivos em cada repetição do grupo tratado. Após os resultados do percentual de redução em cada repetição, foi feita uma média, para chegar no percentual de redução geral de cada produto testado.

A análise estatística das variáveis estudadas e da concentração necessária para matar 50% dos nematoides, DL50, foi realizada utilizando-se software R versão 4.1.0 (R Development Core Team, 2021). A DL50 foi calculada através do pacote (drc). A análise de variância (ANOVA) adotada foi a análise não-paramétrica. Para análise de comparações múltiplas foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn. O valor de  $p = 0,05$  foi considerado significativo estatisticamente.

## 3. Resultados

Quando os *Metarhabditis* spp. foram submetidos ao tratamento com os produtos A e B houve percentual de redução máximo logo no primeiro dia de leitura. Dessa maneira, a DL50 para esse nematoide foi calculada já nas primeiras 24h. Quando os

*Panagrellus redivivus* foram submetidos ao tratamento com os produtos A e B, o percentual de redução cresceu ao longo dos dias, o que fez com que a DL50 mínima fosse encontrada nos últimos dias de tratamento. Mesmo assim a DL50 dos dois produtos quando testados em *P. redivivus* foi superior à necessária para *Metarhabditis* spp. No caso do produto A, a DL50 necessária para *Metarhabditis* spp. representou 10,6% da DL50 mínima encontrada para *P. redivivus*. No caso do produto B, a DL50 necessária para *Metarhabditis* spp. representou apenas 1,2% da DL50 mínima encontrada para *P. redivivus*. Não foi possível calcular a DL50 para o produto C, uma vez que o percentual de redução não alcançou os 50% de nenhum dos dois nematoides, nem mesmo quando o produto foi testado em concentração máxima. Esses resultados estão representados na tabela 1:

Tabela 1: DL50 necessária para cada produto e tempo em que foi alcançada.

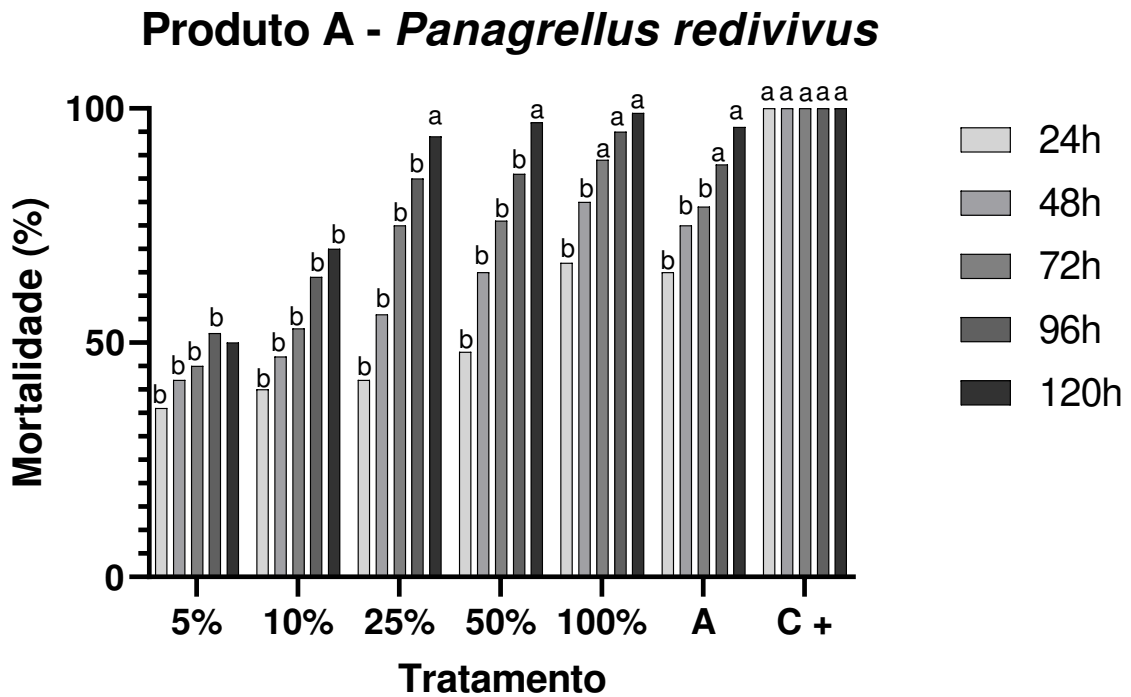
Produto	<i>Metarhabditis</i> spp.	<i>Panagrellus redivivus</i>
A	5 ml/L – 24h	47 ml/L – 96h
B	2 ml/L – 24h	165 ml/L – 120h
C	-	-

Fonte: Arquivo pessoal

Contra o nematoide *P. redivivus*, o produto A não apresentou diferenças estatísticas do percentual de redução encontrado no controle positivo ( $p < 0,05$ ) a partir da diluição de 25% em PBS, ou seja numa concentração de 250 ml/L, em 120h. Diluído em 50%, ou seja, na concentração de 500 ml/L ele precisou de apenas 96h para atingir percentual de redução semelhante ao controle positivo e manteve este resultado até à 120h. O tratamento autoclavado também precisou de 96h para equipar seu percentual de redução ao do controle positivo, tempo maior que o tratamento sem autoclavar também em concentração máxima, que apresentou percentual máximo de redução a partir de 72h. Esses resultados podem ser representados na figura 1

Figura 1: Percentual de redução de *P. redivivus* quando submetido ao produto A em diferentes concentrações. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. O controle positivo foi representado por C +. Letras iguais presentes nas colunas indicam que o percentual de redução de cada tratamento não apresentou diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre

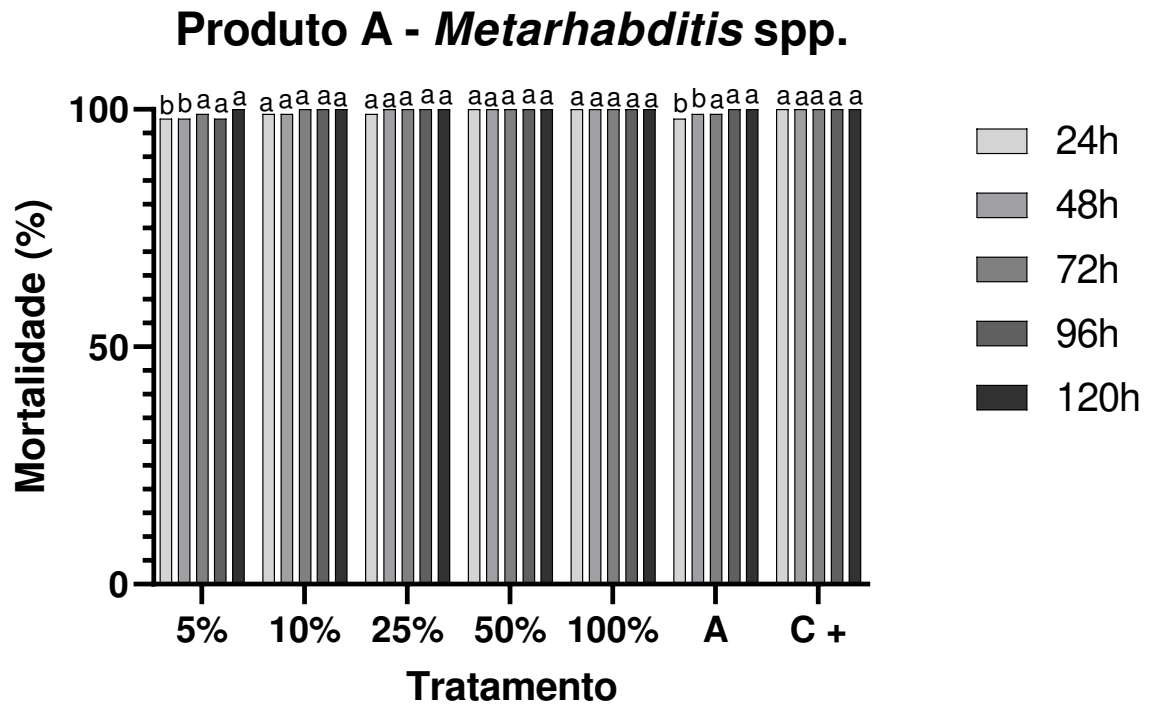
si, enquanto letras diferentes apontam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.



Fonte: Arquivo pessoal.

Já no caso de *Metarhabditis* spp., o produto alcançou percentual de redução tão alto quanto o do controle positivo logo em 24h em todas as concentrações, com exceção da diluição a 5%, ou seja, na concentração de 50ml/L, que precisou de 72h para expressar sua eficácia máxima. Depois de ser autoclavado, o produto, mesmo em concentração máxima precisou de 96h para apresentar percentual de redução estatisticamente igual ao do controle positivo. Os resultados podem ser vistos na figura 2:

Figura 2: Percentual de redução de *Metarhabditis* spp. quando submetido ao produto A em diferentes concentrações. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. O controle positivo foi representado por C+. Colunas marcadas com letras iguais indicam que os percentuais de redução de cada tratamento não obtiveram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre si. Colunas marcadas com letras diferentes indicam diferenças significativas entre os percentuais de redução dos tratamentos.



Fonte: Arquivo pessoal

A média de *P. redivivus* e *Metarhabditis* spp. vivos por poço em todos os tratamentos feitos nos ensaios com o produto A, inclusive nos controles, estão apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente:

Tabela 2: Média de *P. redivivus* vivos encontrados nos poços dos ensaios com as diluições do produto A, além dos controles negativo (C -) e positivo (C +).

<i>P. redivivus</i>	24h	48h	72h	96h	120h
C -	113,4	122,8	136,6	187,6	259,9
5%	94,4	86,2	85,5	105,5	132,7
10%	84,3	79,7	76,3	66,8	79,3
25%	75,1	56,8	34	27,2	14,8
50%	64,7	43	32,2	25,8	7
100%	39,9	24,3	14,6	9,5	3,2
A	50,3	38,7	29,5	22,7	9,5
C +	0	0	0	0	0

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3: Média de *Metarhabditis* spp. vivos encontrados nos poços dos ensaios com as diluições do produto A, além dos controles negativo (C -) e positivo (C +).

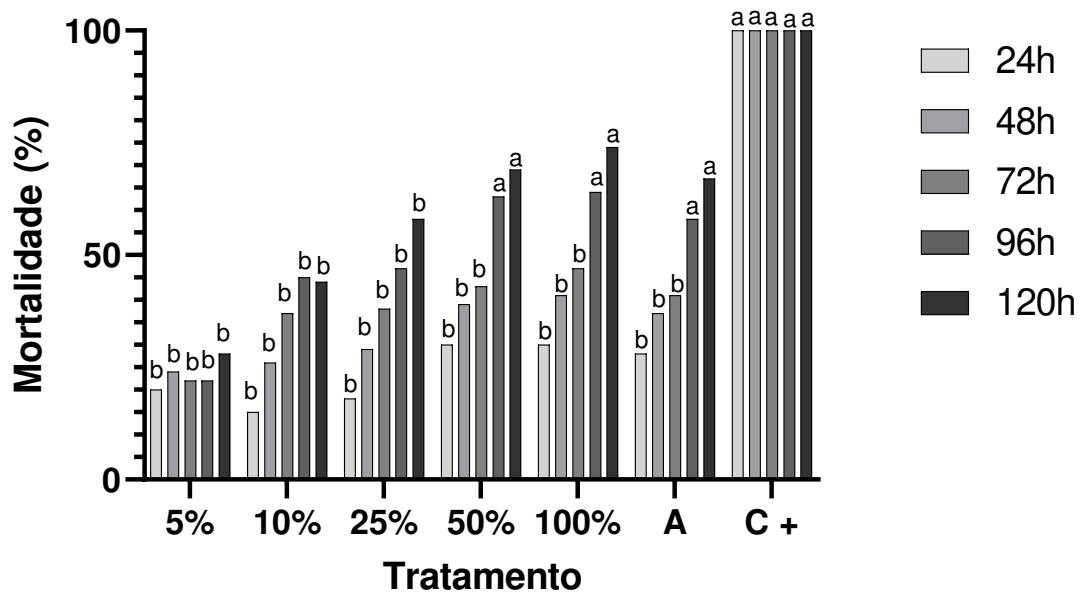
<i>Metarhabditis</i> spp.	24h	48h	72h	96h	120h
C -	73,5	73	115,3	112,8	71,2
5%	1,7	1,2	1,2	2,4	0
10%	0,9	0,4	0,3	0,2	0
25%	0,6	0	0	0	0
50%	0,4	0,1	0	0	0
100%	0,1	0	0,1	0	0
A	1,6	0,8	0,8	0,3	0
C +	0	0	0	0	0

Fonte: Arquivo pessoal

No caso do produto B, quando testado contra o nematoide *P. redivivus*, apresentou os maiores percentuais de redução de 96h em diante, a partir da diluição a 50%, ou 500ml/L, quando não diferiu estatisticamente do controle positivo ( $p < 0,05$ ). O produto autoclavado apresentou a mesma eficácia do não autoclavado em concentração máxima, e também se equiparou estatisticamente ao controle positivo em 96h, como pode ser visto na figura 3

Figura 3: Percentual de redução de *P. redivivus* quando submetido ao produto B em diferentes concentrações. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. O controle positivo foi representado por C +. Colunas marcadas com letras iguais indicam que os percentuais de redução de cada tratamento não obtiveram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre si. Colunas marcadas com letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

## Produto B - *Panagrellus redivivus*

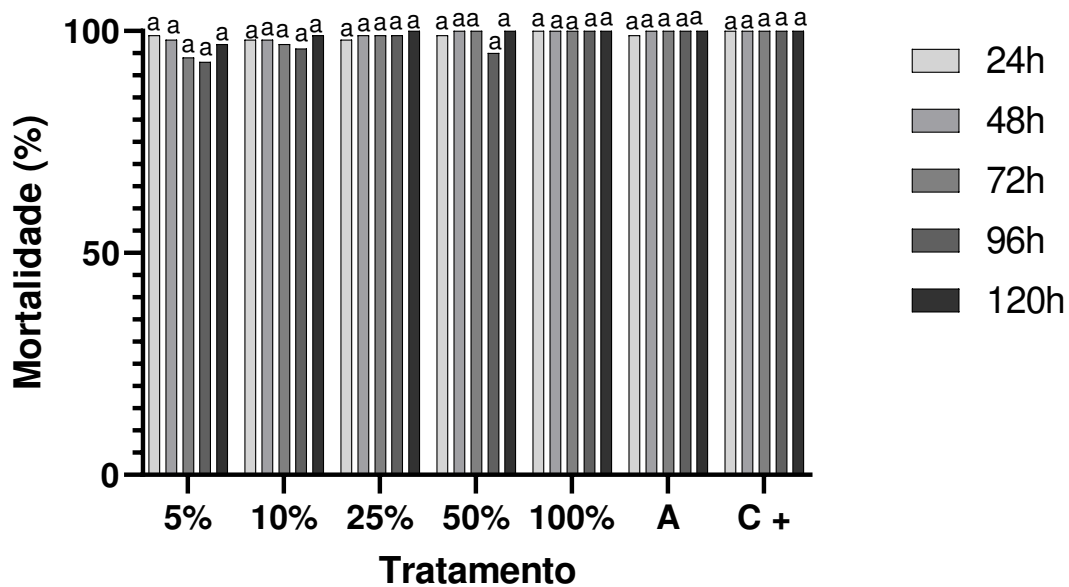


Fonte: Arquivo pessoal

Já nos ensaios contra *Metarhabditis* spp., o produto A assemelhou seu percentual de redução ao do controle positivo já a partir de 24h em todos os tratamentos, inclusive com o produto autoclavado. Esses resultados podem ser vistos na figura 4:

Figura 4: Percentual de redução de *Metarhabditis* spp. quando submetido ao produto B em diferentes concentrações. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. O controle positivo foi representado por C+. Colunas marcadas com letras iguais indicam que os percentuais de redução de cada tratamento não obtiveram diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre si. Colunas marcadas com letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas.

### Produto B - *Metarhabditis* spp.



Fonte: Arquivo pessoal

As médias de *P. redivivus* e *Metarhabditis* spp. vivos por poço em todos os tratamentos, nos ensaios com o produto B, inclusive no controle negativo C (-), são apresentadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente:

Tabela 4: Média de *P. redivivus* vivos encontrados nos poços dos ensaios com as diluições do produto B além dos controles negativo (C-) e positivo (C+).

<i>P. redivivus</i>	24h	48h	72h	96h	120h
C -	54,6	59	60	72,8	86,3
5%	47,2	49,3	52,5	72,3	84,6
10%	46,3	46,8	40,8	41,1	55,6
25%	46	43,4	40	38,6	37,5
50%	42,7	40,1	38,9	27,1	27
100%	39,8	36,8	36	26,1	22,4
A	41,7	38,1	37,5	30,3	28,7
C +	0	0	0	0	0

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5: Média de *Metarhabditis* spp. vivos encontrados encontrados nos poços dos ensaios com o produto B.

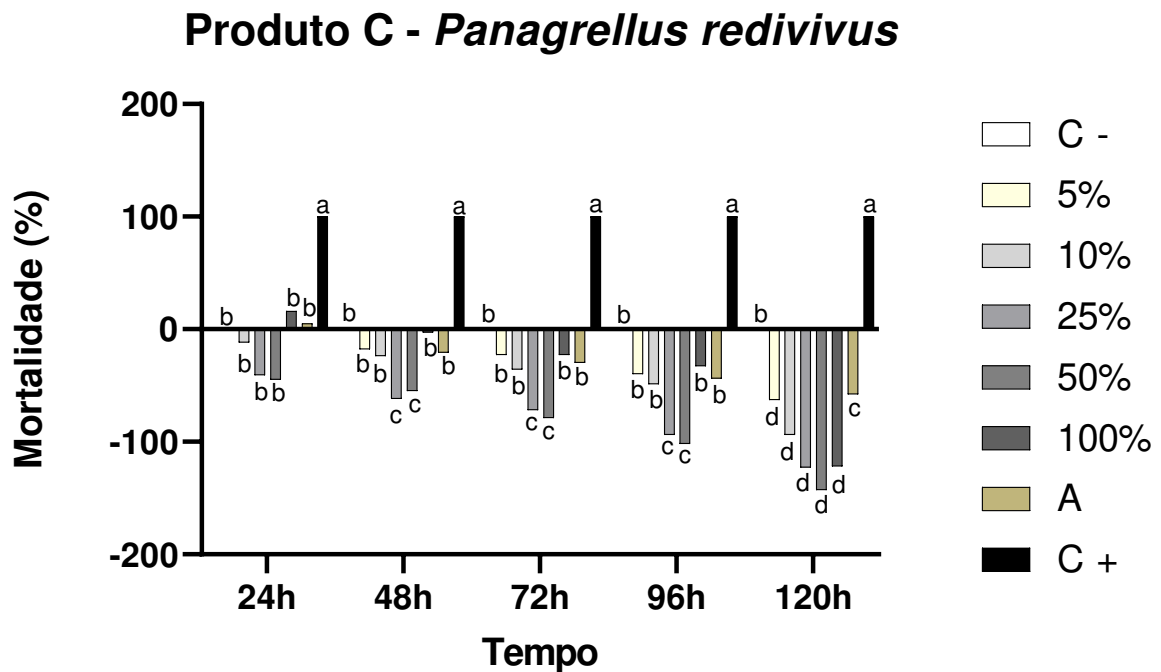
<i>Metarhabditis</i> spp.	24h	48h	72h	96h	120h
C -	88	85,7	80,8	59,4	43,5

5%	4,1	5,1	6,4	5,7	6,1
10%	1,7	1,4	2,7	2,6	2,5
25%	1,4	0,6	0,6	0,6	0,4
50%	0,9	0,1	0,1	3	0,1
100%	0	0	0	0	0
A	0,6	0,3	0,2	0,2	0,2
C +	0	0	0	0	0

Fonte: Arquivo pessoal

Quanto ao produto C, este não se mostrou tóxico para *P. redivivus* e *Metarhabditis* spp. em nenhum tempo, concentração ou após passar por tratamentos térmico. No caso de *P. redivivus*, além de também não apresentar toxicidade, foi observado um aumento no número de nematoides vivos em relação ao controle negativo em todas as concentrações. O percentual de redução apresentou diferenças estatísticas do controle negativo ( $p \geq 0,05$ ) em menor tempo nas concentrações de 25% e 50%, nas quais necessitou de apenas 48h. Nas demais concentrações foram necessárias 120h para que essa diferença seja encontrada. O produto autoclavado em concentração máxima, também precisou de 120h para que seja encontrada diferença estatística significativa do controle negativo, porém, este tratamento manteve-se significativamente menos efetivo que todos os outros que não passaram por tratamento térmico. Estes resultados podem ser observados na figura 5. No entanto, o crescimento das populações dentro de um mesmo tratamento com o passar dos dias apresentou diferenças estatísticas significativas ( $p \geq 0,05$ ) apenas nas concentrações de 50% e 100% do produto C, não submetido à autoclave, como pode ser visto na figura 6:

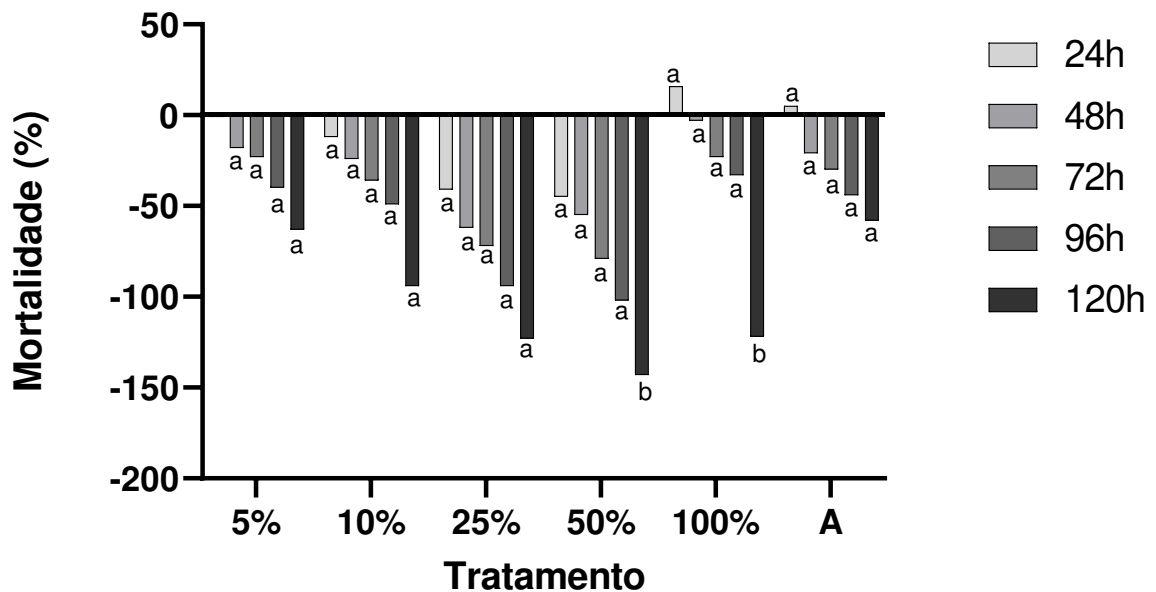
Figura 5: Comportamento das populações de *P. redivivus* em relação ao grupo controle, quando submetido a diferentes tratamentos com o produto C. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. O controle negativo foi representado por C - enquanto o controle positivo foi representado por C +. Colunas marcadas com mesmas letras indicam que o percentual de redução de cada tratamento não obteve diferenças estatísticas significativas entre si ( $p < 0,05$ ). Colunas marcadas com letras diferentes indicam que os percentuais de redução dos tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 6: Comportamento das populações de *P. redivivus* ao longo do tempo, em relação ao grupo controle, quando submetidas a diferentes tratamentos com o produto C. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. Colunas marcadas com mesmas letras indicam que o percentual de redução em cada tempo não obteve diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre si. Colunas marcadas com letras diferentes indicam que os percentuais de redução apresentaram diferenças estatísticas significativas, em diferentes tempos.

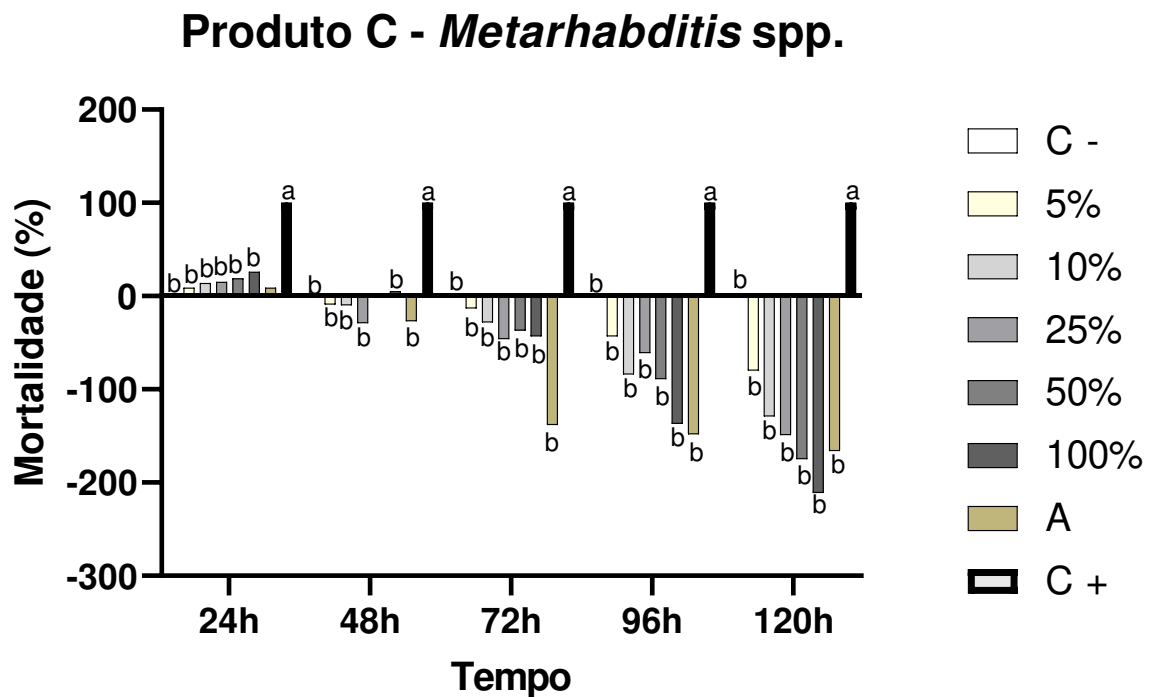
### Produto C - *Panagrellus redivivus*



Fonte: Arquivo pessoal

Quando utilizado em *Metarhabditis* spp., o produto C não apresentou percentual de redução estatisticamente diferente do controle negativo em nenhum tempo ou tratamento testado, como pode ser visto na figura 7. No entanto, diferenças estatísticas entre os tratamentos ao longo dos dias foram observadas à partir de 72h quando o produto foi utilizado em sua concentração máxima, submetido ou não à autoclave, como pode ser observado na figura 8:

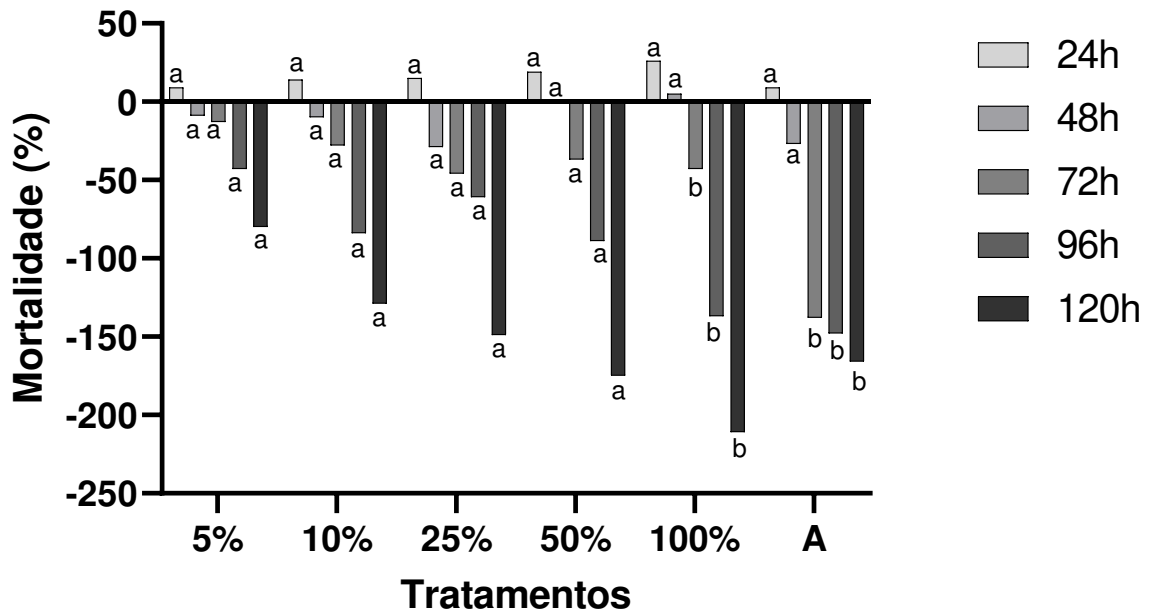
Figura 7: Comportamento das populações de *Metarhabditis* spp. em relação ao grupo controle, quando submetido ao produto C em diferentes tratamentos. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. O controle negativo foi representado por C -, enquanto o controle positivo foi representado por C +. Colunas marcadas com mesma letra indicam que o tratamento não obteve diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamentos, enquanto colunas marcadas com letras diferentes apontam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8: Comportamento das populações de *Metarhabditis* spp. ao longo do tempo, em relação ao grupo controle, quando submetidas a diferentes tratamentos com o produto C. Os tratamentos representados são o produto em diferentes concentrações (5%, 10%, 25%, 50% e 100%), além do produto autoclavado em sua concentração máxima, representado pela letra A. As colunas marcadas com mesma letra indicam que o tratamento não obteve diferenças significativas estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre tempos, enquanto colunas marcadas com letras diferentes apontam diferenças estatísticas significativas entre os tempos.

### Produto C - *Metarhabditis* spp.



Fonte: Arquivo pessoal

A média de *P. redivivus* vivos encontrada em cada poço aumentou ao passar dos dias em todos os tratamentos, exceto no controle positivo. O número total de nematoides foi proporcional à concentração do produto C oferecida no tratamento. Estes resultados podem ser vistos na tabela 6:

Tabela 6: Média de *P. redivivus* vivos encontrados nos poços dos ensaios com as diluições do produto C, bem como os controles negativo (C -) e positivo (C+).

<i>P. redivivus</i>	24h	48h	72h	96h	120h
C -	85,6	102,4	126,6	128	135,9
5%	85,4	120,7	156,5	175,3	214,5
10%	96,6	127,8	172,2	192,2	261,5
25%	119,2	165,4	217,7	248,5	295,9
50%	120,9	157,1	227,8	264,6	324,7
100%	80,5	119,7	174,6	190,6	292,9
A	82,6	121,8	165,1	183,8	192,9
C +	0	0	0	0	0

Fonte: Arquivo pessoal

A média de *Metarhabditis* spp. por poço caiu com o passar dos dias no controle positivo e em todos os tratamentos com o produto C, exceto quanto este se encontrava na concentração de 100%, até o período de 96h. Após esse período

também houve queda no número de *Metarhabditis* vivos neste tratamento. Estes resultados podem ser vistos na tabela 7:

Tabela 7: Média de *Metarhabditis* spp. vivos encontrados encontrados nos poços dos ensaios com o produto C.

<i>Metarhabditis</i> spp.	24h	48h	72h	96h	120h
C -	125,6	101,8	65,5	49,3	30
5%	114,4	111,1	78,5	69,3	57,6
10%	108,7	111,2	99,9	86,8	61,5
25%	107,4	129,5	100,9	83	63,9
50%	114,4	106,7	84,7	87,2	63,9
100%	92,6	99,9	102,4	116,5	98,8
A	118,4	131,7	109,2	105,4	81,9
C +	0	0	0	0	0

Fonte: Arquivo pessoal

#### 4. Discussão

Quando testado para *Metarhabditis* spp. o produto A, apresentou uma eficácia média de 97% em apenas 24h, mesmo quando diluído a 5% em PBS, ou seja, numa concentração de  $6,5 \times 10^5$  UFC/ml de *B. subtilis* QST-713. No caso do *P. redivivus*, apesar de apresentar ação mais demorada, o Produto A matou 94% dos nematoides em 120h, mesmo quando diluído a 25%, ou seja, em uma concentração de  $3,15 \times 10^6$  UFC/ml. Estes resultados foram considerados surpreendentes, visto que os trabalhos encontrados na literatura que avaliam eficácia de *B. subtilis* contra nematoides não utilizam concentrações abaixo de  $1 \times 10^7$  partículas/ml (BORRAJO; MONDINO; MARONICHE, 2021; GAMEZ et al., 2019; MAZZUCHELLI; MAZZUCHELLI; DE ARAUJO, 2020). Portanto, podemos considerar que o produto A é eficaz contra *Metarhabditis* spp. e *P. redivivus* e esses nematoides são muito sensíveis à ação da cepa QST-713 de *B. subtilis*. Diferentes trabalhos, já encontraram ação dos lipopeptídeos cíclicos produzidos por *B. subtilis*, iturinas e surfactinas, tanto contra fungos e bactérias, quanto contra nematoides (BASAIID et al., 2020; KAI, 2020; MIGUNOVA, 2021; SHAHID et al., 2021), o que pode justificar a grande ação nematicida mostrada no produto A, originalmente indicado contra fungos e bactérias.

Já o produto B, apresentou eficácia de 95% em 24h, mesmo diluído em 5% de sua concentração máxima, ou seja,  $2,5 \times 10^8$  esporos/ml de *B. thuringiensis* contra

*Metarhabditis* spp. No caso de *P. redivivus*, o produto demorou mais tempo para agir e obteve um percentual de redução encontrado máximo de 72%, em 120h, quando utilizado a 100% de sua concentração, ou seja, em  $5 \times 10^{10}$  esporos/ml. Não existem trabalhos na literatura que avaliam eficácia de *B. thuringiensis* contra os nematoides *P. redivivus* e *Metarhabditis* spp. Contudo, a eficácia da cepa CCT 1306, presente no produto B contra *Metarhabditis* spp., mostra-se próxima ao que já foi relatado por outros trabalhos com nematoides diferentes. Por outro lado, quando comparados com os mesmos trabalhos, as concentrações e tempo necessários para matar *P. redivivus* são considerados mais altos que o usual para outras espécies de nematoides (MAULIDIA et al., 2020; SALEHI JOUZANI et al., 2008). A partir desses resultados, podemos considerar que o produto B é eficaz contra *P. redivivus* e *Metarhabditis* spp., mas este nematoide é mais susceptível à cepa de *B. thuringiensis* kurstaki CCT 1306 que aquele. Osman, Salem e Ghatas (1988), já haviam encontrado ação contra nematoides por um produto inseticida à base de *B. thuringiensis*. Toxinas produzidas por algumas cepas de *B. thuringiensis*, já apresentaram ação contra nematoides e insetos no trabalho de Peng et al. (2016), o que pode explicar a atividade contra helmintos da cepa originalmente inseticida CCT 1306. Outra hipótese que não pode ser descartada é a produção de toxinas diferentes com diferentes alvos pela mesma cepa de *B. thuringiensis*.

Existe ainda a possibilidade do produto B ter interferido ainda na reprodução de *P. redivivus*, o que teria contribuído para a ausência de crescimento da média de nematoides por poço quando os *P. redivivus* foram tratados em concentrações acima de 25% do produto. Diferentes trabalhos já mostraram que as toxinas de *B. thuringiensis* podem também reduzir a fertilidade dos nematoides sobreviventes à ação imediata (KARURI et al. 2013; HUANG et al., 2018; LUO et al., 2013). Marroquin et al. (2000) apontam que os fatores que causam perda na capacidade reprodutiva nos nematoides de vida livre *C. elegans* estão relacionados com lesões nas células intestinais dos nematoides e, conseqüentemente, menor aporte nutricional à células germinativas. Mais recentemente, Dunstand-Guzmán et al. (2020) ainda relataram lesões no útero de *Ancylostoma caninum*, que podem contribuir também para essa disfunção reprodutiva. Como a produção de ovos por ninhada de *P. redivivus* dura entre 24h e 36h (FIGUEROA, 2009), nosso experimento ofereceu tempo suficiente para apresentar diferenças na proliferação de *P. redivivus* entre os grupos controle e

tratado. No caso dos *Metarhabditis* spp., como a mortalidade de quase todos os nematoides foi obtida logo no primeiro dia, o efeito na reprodução do nematoide não foi tão importante, principalmente porque quando os nematoides foram submetidos a tratamentos com concentrações abaixo de 5%, foi observado um crescimento das populações de *Metarhabditis* spp. após o primeiro dia de tratamento (dados não publicados).

A partir de nossos resultados, observamos diferentes susceptibilidades dos nematoides em relação a cada espécie de *Bacillus* em que foram testados. O produto que causou maior percentual de redução de *P. redivivus* foi o produto A, enquanto o que causou maior percentual de redução de *Metarhabditis* spp. foi o produto B. Mesmo assim, a DL50 necessária para produtos A e B foi menor para o nematoide *Metarhabditis* spp, o que indica uma maior sensibilidade deste nematoide em relação as cepas de *Bacillus* spp. presentes nos dois produtos. Embora outros trabalhos feitos com *Bacillus* spp. demonstrem que o potencial nematicida aumenta de acordo com a concentração de bactérias (DAS; ABDUL WADUD; ATIQR RAHMAN KHOKON, 2021; MESSA; NUNES; MATTEI, 2019; RAO et al., 2017), nosso trabalho confirma este achado apenas no caso de *Metarhabditis* spp, que foram mais susceptíveis ao produto B, com a maior concentração de partículas/ml, dentre os três produtos. No caso do *P. redivivus*, o maior percentual de redução foi o observado quando os nematoides foram submetidos ao produto A, que curiosamente foi o que apresentou a menor concentração de partículas/ml dentre os três produtos. Este resultado sugere uma grande afinidade de *Bacillus subtilis* QST-713, que compõe o produto A, à *P. redivivus*, em relação as demais cepas utilizadas no presente estudo.

Variações de susceptibilidade de nematoides diferentes, quando submetidos à exposição de uma mesma cepa de *Bacillus* já foram observadas em outros trabalhos (GU et al., 2007; RAE et al., 2010). O mecanismo de especificidade de muitas espécies de *Bacillus* a determinados nematoides segue desconhecido, no entanto possivelmente está atrelado à particularidades anatômicas e fisiológicas de cada nematoide. O tipo de colágeno presente na cutícula pode interferir na permeabilidade de toxinas para o interior do nematoide (SANDHU et al., 2021). Possíveis variações na composição da cutícula entre as duas espécies podem ter contribuído para as diferenças no percentual do redução encontrado nos ensaios. Também é importante lembrar que existe uma série de mecanismos fisiológicos indentificados no nematoide

*Caenorhabditis elegans* que são ativados quando estão em contato com toxinas, como aumento da produção de energia, ativação de sinalização de canais receptores de insulina, ativação da glectina LEC-6, além da ativação do gene DIM – 1, que mitiga o efeito negativo na locomoção do nematoide (WANG et al., 2017). A possibilidade de variação de mecanismos e de intensidade dessas respostas entre nematoides, também pode justificar a diferença de susceptibilidade entre *Metarhabditis* spp. e *P. redivivus* contra os produtos A e B.

Wei et al. (2003), testaram, em seu estudo, seis tipos de toxinas Cry, produzidas por *B. thuringiensis*, contra cinco espécies de nematoides de vida livre, por um período de apenas uma noite. Curiosamente, *P. redivivus* apresentaram-se entre os mais susceptíveis a todas as toxinas. Estes resultados vão de encontro com o que foi constatado no presente estudo, em que *P. redivivus* foram mais resistentes ao produto B, à base de *B. thuringiensis*, quando comparados com *Metarhabditis* spp. Como a mesma cepa de *Bacillus* se mostrou muito eficiente quando testada contra *Metarhabditis* spp., não se pode afirmar que a produção de toxinas Cry pela cepa CCT 1306 de *B. thuringiensis* kurstaki foi insuficiente para apresentar ação nematicida. Possivelmente, a cepa CCT 1306 produz outras toxinas Cry diferentes de Cry6A, Cry14A, Cry6B, Cry21A e Cry5B, que foram as que apresentaram eficácia contra *P. redivivus* no estudo de Wei et al. (2003). Outras toxinas Cry já foram descritas na literatura com ação nematicida, como as toxinas Cry55A, Cry 21Fa1, Cry21Ha1, Cry1Ea11, Cry5Ca1 e CryDa1 (GENG et al., 2017; HUANG et al., 2018; IATSENKO; BOICHENKO; SOMMER, 2014; PENG et al., 2011). Diferenças de susceptibilidade de uma mesma espécie de nematoide, como é o caso do *P. redivivus*, a diferentes toxinas produzidas por *B. thuringiensis* podem existir devido à grande especificidade dos sítios de ligação de cada toxina presente no intestino dos nematoides (GARCÍA-MONTELONGO et al., 2021; PENG et al., 2018; SHI et al., 2020). Existe ainda a possibilidade da ação de outros compostos nematicidas produzidos pela cepa CCTB 1306, como enzimas, lipopeptídeos e saponinas, recentemente encontrados na literatura (MAULIDIA et al., 2020; ZHENG et al., 2018, 2016), que podem apresentar maior toxicidade ao nematoide *Metarhabditis* spp. que ao *P. redivivus*. Gomes et al. (2019), por exemplo, encontraram maior resistência à proteases por *P. redivivus*, em relação a *M. incognita*.

Por último, pode ter havido um possível viés em nosso estudo, que pode ter influenciado a maior susceptibilidade de *Metarhabditis* spp. ao produto B, em relação à *P. redivivus* a depender de possíveis características comportamentais das duas espécies de nematoide. Em nosso trabalho, os dois nematoides tiveram como fonte de alimento durante todo o período de experimento, o substrato proveniente do meio de onde vieram, que estava contido na solução de nematoides. Este conteúdo se mostrou suficiente para a quantidade de *P. redivivus* utilizada nos ensaios, uma vez que a média de nematoides vivos em cada poço do controle negativo cresceu ao longo dos dias. Contudo, nos testes com *Metarhabditis* spp., a partir de 72h, começou a haver uma queda mais acentuada no número de nematoides vivos no controle negativo. Esta mortalidade de nematoides pode ser justificada por situação de inanição à que os nematoides foram submetidos, o que sugere que o método de lavagem das placas de ágar-sangue empregado na recuperação de *Metarhabditis* spp. não possibilita um aporte suficiente de nutrientes para ensaios de duração mais prolongada.

A princípio, a mortalidade advinda do ciclo dos nematoides ou em situações de inanição não afetaria os resultados, já que essas mortes ocorreriam tanto no grupo controle quanto no grupo tratado e o percentual de redução foi calculado com relação à quantidade de nematoides vivos no controle. Este método descarta as mortes que ocorreram por outra forma, que não pela ação dos produtos, uma vez que todos os tratamentos, em tese, estariam susceptíveis o mesmo tanto a mortes de nematoides decorrentes de outras causas, que não sejam a ação dos produtos. Contudo, uma das estratégias para se defender do ataque de *B. thuringiensis* utilizada por *Caenorhabditis elegans* é a adoção de um consumo seletivo de bactérias, isto é, consumir apenas as bactérias não-tóxicas, uma vez que a ação de *B. thuringiensis* se dá principalmente nas células intestinais dos nematoides (LUO et al., 2013; SCHULENBURG; MÜLLER, 2004). Caso este comportamento também seja típico de *Metarhabditis* spp., ele seria mitigado e os nematoides podem ter sido forçados a se alimentar de *B. thuringiensis*, já que a quantidade de alimento disponível para *Metarhabditis* spp. na solução de nematoides, aparentemente não foi suficiente para a alimentação dos mesmos por cinco dias. Da mesma forma, como aparentemente *P. redivivus* não sofreram com falta de alimento em seus tratamentos, estes nematoides poderiam ter amenizado o efeito do produto B, caso também sejam capazes de

realizar consumo seletivo de bactérias. Uma alternativa que pode ser testada para futuros estudos de mesma duração pode ser a inoculação de bactérias não tóxicas nos poços junto com os nematoides, para servirem de fontes de alimento, como é feito nos experimentos com *Caenorhabditis elegans* (BEYDOUN et al., 2021; MCINTYRE et al., 2021; STUHR; CURRAN, 2020).

Quando submetido ao autoclave, apesar do atraso no alcance do máximo percentual de redução das duas espécies de nematoides quando tratadas com o produto A, podemos considerar que os produtos A e B permaneceram eficazes. Estes resultados vão de encontro aos encontrados por diferentes autores, que constataram perda de potencial nematicida após autoclave tanto das populações de *Bacillus* como de suas toxinas (KOTZE et al., 2005; LEYNS et al., 1995; YANG et al., 2006). Contudo, apesar de menos frequentes, existem trabalhos que relatam resistência ao autoclave, inclusive pelas mesmas espécies de *Bacillus* que compõem os produtos A e B (MOZGOVAYA et al., 2002; XIA et al., 2011). A alta efetividade dos produtos autoclavados observada em nosso trabalho pode ser simplesmente devido à presença de toxinas termoestáveis. No entanto, é de conhecimento que atualmente existem outras estratégias usadas para aumentar a resistência de esporos e toxinas à altas temperaturas. Uma delas, é manter os esporos e toxinas de *Bacillus* em meios oleosos (ABABOUC, BUSTA, 1987; NAKAGAWA; SHIGEMOTO; TSUCHIDO, 1998; RAJKOVIC et al., 2008). Esta estratégia aparentemente foi empregada, uma vez que ambos os produtos possuíam consistência oleosa. A outra estratégia, descoberta mais recentemente, se trata de modificações moleculares, a fim de aumentar a estabilidade de toxinas (GAO et al., 2014; WANG et al., 2016). Contudo, não tivemos acesso sobre informações mais aprofundadas com relação à produção e composição dos produtos, para entender se o produto foi desenvolvido para ser estável, ou se as próprias cepas de *Bacillus* spp. já produzem toxinas termorresistentes.

Variações de PH dos tratamentos em relação ao controle, não podem ser consideradas como causadoras de mortalidade do produto, uma vez que tanto o produto A quanto o produto B apresentaram altas mortalidades na menor diluição dos produtos, ou seja, à 5%. Como os tratamentos representavam apenas 33% do conteúdo total da solução, o tratamento a 5%, corresponde à apenas 1,65% de todo o volume da solução. Uma parcela tão pequena de produto não poderia provocar uma queda drástica de PH à ponto de matar a maior partes dos nematoides.

Já o produto C, não apresentou ação nematicida contra nenhum dos dois nematoides. Este não era o resultado esperado, uma vez que outros autores comprovam maiores mortalidades de nematoides, quando submetidos à associações de espécies de *Bacillus* em relação aos mesmos nematoides submetidos às mesmas espécies em separado (EL-NAGDI; ABD-EL-KHAIR, 2019; ZHENG et al., 2016). Nossos resultados também vão de encontro a diferentes trabalhos que observaram potencial nematicida nas três espécies de *Bacillus* que compõe o produto C, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. pumilus*, quando utilizados individualmente (ENGELBRECHT et al., 2020; SOLIMAN; AMEEN; ABDEL-AZIZ, 2019; GAZIEA et al., 2017). É comum encontrar na literatura, relatos de cepas de *Bacillus* spp. isoladas no solo que possuem pouca ou nenhuma atividade nematicida (JAMILY; TOYOTA; KOYAMA, 2018; SOLIMAN; AMEEN; ABDEL-AZIZ, 2019; ZHAO et al., 2018). Como o produto C é destinado originalmente para melhorar a fertilidade do solo, uma menor eficácia deste produto no controle de nematoides era, em partes, esperada. Curiosamente a média de nematoides vivos nos poços foi maior que a do controle negativo ao final do experimento para as duas espécies de nematoides e o percentual de redução foi estatisticamente menor que o do controle negativo em todos os tratamentos com o produto C, no caso de *P. redivivus*.

O percentual de redução negativo observado nos tratamentos com o produto C em relação ao controle pode ser explicado pelo comportamento bacteriófago comum aos dois nematoides. Portanto, os nematoides dos grupos tratados, na presença de bactérias inofensivas em seu meio, ainda que nas menores concentrações ou no tratamento autoclavado, tiveram mais alimento que os do controle negativo, que estavam imersos apenas em PBS e os resquícios de seus respectivos meios originais de cultivo. O percentual de redução foi mais negativo para *P. redivivus*, provavelmente porque estes nematoides tiveram mais fontes de alimento disponíveis, conforme discutido anteriormente, portanto mais condições para reprodução.

Além disso, estudos recentes mostram que algumas cepas de *B. subtilis* tem a capacidade de colonizar o intestino de *C. elegans* e aumentar a longevidade e resistência dos nematoides ao estresse, devido a produção de óxido nítrico e do peptídeo CSF (AYALA et al., 2017; RODRI, 2017). Caso a cepa CCTB04 de *B. subtilis*, presente no produto C tenha conseguido colonizar o intestino dos nematoides utilizados no presente estudo, mesmo que a cepa CCTB 09 de *B. amyloliquefaciens*

ou CCTB 05 de *B. pumilus* tivessem apresentado alguma toxicidade, a colonização por *B. subtilis* teria tornado os nematoides mais resistentes à ação de toxinas liberadas por outras espécies. Kissoyan *et al.* (2019) encontraram efeito parecido, ao observarem resistência de *C. elegans* à ação de *B. thuringiensis*, quando os nematoides tiveram colonização intestinal por *Pseudomonas fluorescens*.

Existe ainda a possibilidade de alguma das cepas terem destruído as toxinas produzidas pelas outras, e dessa forma, inibido a ação do produto. Ripert *et al.* (2016), observaram efeito parecido da bactéria *B. clausii*, que foi capaz de inativar as toxinas de *B. cereus*. A possibilidade de alguma das três bactérias apresentar efeito nematotóxico é reforçada pelo fato das populações de *P. redivivus* apresentarem um crescimento mais rápido em relação ao controle negativo nas concentrações de 25% e 50% do que no produto concentrado 100%. Possivelmente, *B. pumilus* ou *B. amyloliquefaciens* apresentaram uma leve toxicidade inicial na concentração máxima do produto, o que retardou o efeito altamente negativo no percentual de redução. As concentrações de produto C de 50% e 25% não foram suficientes para apresentar toxicidade a *P. redivivus*, o que favoreceu um crescimento mais imediato das populações deste nematoide.

Quando comparado dentro do mesmo tratamento, o percentual de redução de *P. redivivus* apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tempos de ensaio apenas à 120h, e nas concentrações de 50% e 100% (não autoclavado) do produto C. Provavelmente, estas diferenças só foram observadas nas concentrações mais altas devido à uma maior disponibilidade de bactérias em maiores concentrações produto C. Dessa maneira, *P. redivivus* teriam mais fonte de alimento, e substrato suficiente para alta taxa de proliferação até o último dia de ensaio. O produto quando autoclavado não apresentou um resultado tão positivo no crescimento das populações de *P. redivivus*, quando comparado com os tratamentos não autoclavados em todas as diluições, em nosso estudo. Provavelmente a inativação das bactérias pelo autoclave impediu os benefícios da colonização intestinal pelas mesmas como também foi constatado no estudo de Kissoyan *et al.* (2019).

Nos ensaios com *Metarhabditis* spp. houve ligeiro aumento do número de nematoides vivos do primeiro para o último dia de ensaio apenas nos poços inoculados com o produto concentrado a 100%. Se analisarmos, no entanto, a média de nematoides vivos ao longo dos cinco dias, observamos que mesmo em concentração máxima, o

número de nematoides vivos começou a cair depois de 96h. Nas outras diluições e no produto autoclavado, as quedas foram mais acentuadas e ocorreram mais precocemente. Como foi pipetado em cada poço 20 $\mu$ l de produto C e a concentração deste produto era de  $1 \times 10^{11}$  bactérias/l, podemos mensurar que  $2 \times 10^7$  bactérias/ml foram inoculadas em cada poço. Dividindo este valor pela média de 50 *Metarhabditis* spp. que foi a média depositada em cada poço, podemos inferir que é necessário uma concentração maior que de  $4 \times 10^5$  bactérias/nematoide da associação de *B. subtilis* CCTB 04, *B. pumilus* CCTB05 e *B. amyloliquefaciens* para a sobrevivência e reprodução de *Metarhabditis* spp. por um período de tempo de 120h. Apesar do percentual de redução de nenhum tratamento com o produto C contra *Metarhabditis* spp. ter diferido significativamente do controle negativo, houve diferença estatística entre os tempos, à partir de 72h, em relação aos tempos de 24h e 48h, dentro do mesmo tratamento com o produto concentrado a 100%. Neste caso, esta diferença seria explicada por uma queda menos acentuada na mortalidade destes tratamentos em relação ao controle observada à partir do terceiro dia de leitura, que tornou o percentual de redução ainda mais negativo. A inanição foi abrandada para os nematoides tratados com o produto C concentrado a 100%, provavelmente pela maior oferta de alimento, como já mencionado anteriormente. Se compararmos com o efeito apresentado em *P. redivivus*, podemos inferir que caso a solução de origem de *Metarhabditis* spp. disponibilizasse fonte de alimento suficiente para a manutenção destes nematoides, haveria um crescimento populacional dos mesmos suficiente para apresentar diferenças estatísticas do controle negativo.

Diferente dos ensaios com *P. redivivus*, quando *Metarhabditis* spp. foram tratados com o produto C autoclavado, ocorreu o mesmo efeito de queda do percentual de mortalidade que quando foram tratados com o produto em mesma concentração sem ser submetido à autoclave. Diferentes hipóteses podem ser levantadas para explicar esta diferença de efeito de tratamento com produto autoclavado para os dois nematoides, como diferença na termoestabilidade de toxinas específicas que agem em *Metarhabditis* spp. e *P. redivivus* ou intensidade da simbiose nos casos de colonização da cepa CCTB 04 de *B. subtilis* no intestino de cada nematoide. Futuros estudos devem ser feitos para investigar a ação das bactérias em separado em cada nematoide, bem como se a cepa CCTB 04 consegue colonizar com a mesma eficiência *P. redivivus* e *Metarhabditis* spp.

Em nosso trabalho, os nematoides não tiveram outras fontes de alimento de forma proposital, a fim de avaliar a possível utilização das bactérias presentes no próprio produto como substrato para desenvolvimento e reprodução dos nematoides, como aconteceu no produto C. Esta condição, pode não apresentar grandes implicações para parasitas gastrintestinais adultos, que se alimentam basicamente de sangue ou de restos de alimentos presentes no trato gastrointestinal dos animais (TAYLOR, COOP, WALL, 2016; URQUHART et al., 1998). No entanto há importantes implicações na biologia de *Metarhabditis* spp. causadores de otite parasitária externa, que precisam de bactérias para se manterem no pavilhão auricular de animais (VEROCAI et al., 2007). Aplicar um produto que serve de substrato para o crescimento da população de *Metarhabditis* spp., pode agravar a infecção na orelha externa do animal, em vez de contê-la.

## Conclusão

Os produtos A e B se mostraram potentes nematicidas e apresentaram alta eficácia mesmo após diluídos ou superaquecidos, no entanto a dose e tempo de ação necessária depende do nematoide que será alvo da ação destes produtos. O produto C não apresentou ação nematicida e contribuiu positivamente para a proliferação do nematoide *P. redivivus*. Os produtos A e B apresentam capacidade para serem testados como anti-helmínticos em animais em futuros estudos.

## 5. Referências

ABABOUC, L.; BUSTA, F. F. v. 62, n. 6. Effect of thermal treatments in oils on bacterial spore survival. **Journal of Applied Bacteriology**. V. 62, n. 2, p. 491–502, 1987.

ABD-EL-KHAIR, H. et al. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019.

ABD-EL-SALAM, M.S. et al. Improving the nematicidal potential of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lysinibacillus sphaericus* against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* using protoplast fusion technique. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 31, 2018.

ANTIL, S. et al. On the potential of *Bacillus aryabhatai* KMT-4 against *Meloidogyne javanica*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 67, 2021.  
Disponível em: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-021-00417-2>. Acesso em 2 jun. 2021.

ARNAOUTELI, S. et al. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 600-614, 2021.

AYALA, F. R. et al. Microbial flora, probiotics, *Bacillus subtilis* and the search for a long and healthy human longevity. **Microbial Cell**. v. 4, n. 4, p. 133–136, 2017.

BAIAK, B. H. B.; LEHNEN, C. R.; ROCHA, R. A. DA. Anthelmintic resistance of injectable macrocyclic lactones in cattle: A systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 59–67, 2019.

BARBOSA, J. D. et al. Detecção e tratamento de otite por *Rhabditis blumi* em bovinos da região Norte do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 605–610, 2016.

BASALID, K. et al. Biological activities of essential oils and lipopeptides applied to control plant pests and diseases: a review. **International Journal of Pest Management**, v. 67, n. 2, p. 155–177, 2020.

BASTOS, T. S. et al. *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* reduce faecal protein catabolites concentration and odour in dogs. **BMC Veterinary Research**. v. 16, n. 116, 2020. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-020-02321-7>. Acesso: 25 jun. 2021.

BEYDOUN, S. et al. An alternative food source for metabolism and longevity studies in *Caenorhabditis elegans*. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2021.

BHAT, A. H. et al. Morphological, morphometrical, and molecular characterization of *Metarhabditis amsactae* (Ali, Pervez, Andrabi, Sharma and Verma, 2011) Sudhaus, 2011 (Rhabditida, Rhabditidae) from India and proposal of *Metarhabditis longicaudata* as a junior synonym of *M. amstacae*. **Journal of Nematology**, v. 52, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33829202/>. Acesso: 11 jun. 2021.

BORGONIE, G. et al. Effect of nematicidal *Bacillus thuringiensis* strains on free-living nematodes. 1. light microscopic observations, species and biological stage specificity and identification of resistant mutants of *Caenorhabditis elegans*. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 19, n. 4, p. 391–398, 1996.

BORRAJO, M. P.; MONDINO, E. A.; MARONICHE, G. A. Potential of rhizobacteria native to Argentina for the control of *Meloidogyne javanica*. **Revista Argentina de Microbiología** 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754121000456>. Acesso: 3 de jun. 2021.

CARDONA, Á. J.; GONZÁLEZ, T. M.; ÁLVAREZ, P. J. Otitis bovina por *Rhabditis bovis* en Córdoba, Colombia. Reporte de dos casos. **Revista MVZ Córdoba**, v. 15, n. 3, p. 2240–2244, 2010.

CHARUCHAIBOVORN, S. et al. *Bacillus thuringiensis* Cry5B is Active against *Strongyloides stercoralis* in vitro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 5, p. 1177–1182, 2019.

DAS, S.; WADUD, M.A.; KHOKON, M. A. R. Functional evaluation of culture filtrates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on the mortality and hatching of *Meloidogyne javanica*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 1318–1323, 2021.

DICHUSA, C. A. et al. Survey and identification of entomopathogenic nematodes in the province of Cotabato, Philippines, for biocontrol potential against the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s41938-021-00390-w#citeas>. Acesso: 10 jun. 2021.

DUNSTAND-GUZMÁN, E. et al. Nematicidal and ovicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the zoonotic nematode *Ancylostoma caninum*. **Experimental Parasitology**, v. 218, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014489419304813?via%3Dihub>. Acesso: 19 jun. 2021.

EL-NAGDI, W. M. A.; ABD-EL-KHAIR, H. Application of *Bacillus* species for controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in eggplant. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 43, n. 1, 2019. Disponível em: <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0187-6>. Acesso: 11 jun. 2021.

ENGELBRECHT, G. et al. *In vitro* bioassays to determine the effect of *Bacillus soli* filtrates on the paralysis of *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles. **Nematology**, v. 22, n. 2, p. 239–243, 2020.

FIGUEROA, J. L. Nematodo de vida libre *Panagrellus* Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. **Investigación y Ciencia**. n. 45, p. 4–10, 2009.

GAMEZ, R. et al. Screening , plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv . Williams (*Musa acuminata* Colla). **Microbiological Research**, v. 220, p. 12–20, 2019.

GAO, X. et al. Enhanced thermal stability and hydrolytic ability of *Bacillus subtilis* aminopeptidase by removing the thermal sensitive domain in the non-catalytic region. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0092357>. Acesso: 17 jun. 2021.

GARCÍA-MONTELONGO, M. et al. Use of RNAi as a preliminary tool for screening putative receptors of nematicidal toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1649–1656, 2021.

GENG, C. et al. Dissimilar Crystal Proteins Cry5Ca1 and Cry5Da1 Synergistically Act against *Meloidogyne incognita* and Delay Cry5Ba-Based Nematode Resistance. **Applied Environmental Microbiology**. v. 83, n. 18, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583498/>. Acesso: 18 jun. 2021.

GOMES, A, E. H. et al. Role of synadenium grantii latex proteases in nematocidal activity on meloidogyne incognita and *Panagrellus redivivus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 665–668, 2019.

GU, Y. Q. et al. Evaluation and identification of potential organic nematocidal volatiles from soil bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 2567–2575, 2007.

GUERRERO-RUBIO, M. A. et al. Flavonoids' effects on *Caenorhabditis elegans*' longevity, fat accumulation, stress resistance and gene modulation involve mTOR, SKN-1 and DAF-16. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 1–17, 2021.

HAYASHI, M.; WHARTON, D. A. The oatmeal nematode *Panagrellus redivivus* survives moderately low temperatures by freezing tolerance and cryoprotective dehydration. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 3, p. 335–342, 2011.

HELAL, F. et al. Probiotics role of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis* in improving the health status of rabbits' gastrointestinal tract. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 45, n. 1, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s42269-021-00522-0>. Acesso: 18 jun. 2021.

HUANG, T. et al. Nematicidal Activity of Cry1Ea11 from *Bacillus thuringiensis* BRC-XQ12 Against the Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). **Phytopathology**. v. 21, n.1, p. 44–51, 2018.

HUSSAIN, T. et al. Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of Root Gallings caused by *Meloidogyne incognita*. **Vegetos**, v. 33, n. 2, p. 229–238, 2020.

IATSENKO, I.; BOICHENKO, I.; SOMMER, J. *Bacillus thuringiensis* DB27 produces two novel protoxins, Cry21Fa1 and Cry21Ha1, which act synergistically against nematodes. **Applied Environmental Microbiology** v. 80, n. 10, p. 3266–3275, 2014.

IMRAN, A. et al. Growth and survival of enriched free-living nematode , *Panagrellus redivivus* as exogenous feeding for larvae of blue swimming crab , *Portunus pelagicus*. **Aquaculture Reports**. v. 15, p. 6–11, 2019.

JAMILY, A. S.; TOYOTA, K.; KOYAMA, Y. Isolation of local *Bacillus* spp . from Afghanistan soils and their potential in suppressing the root-knot nematodes on tomato Isolation of local *Bacillus* spp . from Afghanistan soils and their potential in suppressing the root-knot nematodes on tomato. **Soil Microorganisms**. v. 72, n. 1, p. 39-49, 2018.

- KAI, M. Diversity and Distribution of Volatile Secondary Metabolites Throughout *Bacillus subtilis* Isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7156558/>. Acesso: 224 mai. 2021.
- KELLEHER, A. C. et al. Anthelmintic resistance among gastrointestinal nematodes of cattle on dairy calf to beef farms in Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 73, n. 1, 2020. Disponível em: <https://irishvetjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13620-020-00167-x>. Acesso 12 jun. 2021.
- KISS, L. V. Toxicity mitigation by N -acetylcysteine and synergistic toxic effect of nano and bulk ZnO to *Panagrellus redivivus*. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 28, n. 26, p. 34436-34449, 2021.
- KISSOYAN, K. A. B. et al. Natural *C. elegans* Microbiota Protects against Infection via Production of a Cyclic Lipopeptide of the Viscosin Group. **Current Biology**, v. 29, n. 6, p. 1030- 1037., 2019.
- KOTZE, A. C. et al. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology** v. 35, n. 9, p. 1013–1022, 2005.
- LALTHANPUII, P. B.; LALCHHANDAMA, K. Phytochemical analysis and *in vitro* anthelmintic activity of Imperata cylindrica underground parts. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
- LEE, Y. S.; KIM, K. Y. Antagonistic Potential of *Bacillus pumilus* L1 Against Root-Knot Nematode, *Meloidogyne arenaria*. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 1, p. 29–39, 2016.
- LEYNS, F. et al. Nematicidal activity of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Fundamental and Applied Nematology**, v. 18, n. 3, p. 211–218, 1995.
- SOBRAL, S.A. et al. Infestações por *Rhabditis* spp.: Uma Revisão. **Veterinária e Zootecnia I**. v. 25, n. 2, p. 1–8, 2018.
- LUBIAN, C. et al. Anthelmintic activity of plant aqueous extracts against *Panagrellus redivivus* *in vitro*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 86, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/hygdY6YDYMCTRjPj6tmwRsr/?lang=en>. Acesso 4 jun. 2021.
- LUO, H. et al. The effects of *Bacillus thuringiensis* Cry6A on the survival, growth, reproduction, locomotion, and behavioral response of *Caenorhabditis elegans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 10135–10142, 2013.
- MAQBOOL, I. et al. Integrated parasite management with special reference to gastro-intestinal nematodes. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2017.
- MARROQUIN, L. D. et al. *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 155, n. 4, p. 1693–1699, 2000.

MARTINS Jr., W. *Rhabditis* (*Rhabditis*) *freitasi* sp. n. e *Rhabditis* (*Rhabditis*) *costai* sp. n. Nematoda-Rhabditidae isolados de otite bovina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n.1, p. 11–16, 1985.

MAULIDIA, V. et al. Secondary metabolites produced by endophytic bacteria against the root-knot nematode (*Meloidogyne* sp.). **Biodiversitas**, v. 21, n. 11, p. 5270–5275, 2020.

MAZZUCHELLI, R. DE C. L.; MAZZUCHELLI, E. H. L.; DE ARAUJO, F. F. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane. **Biological Control**, v. 143, n. June 2019, p. 104185, 2020.

MCINTYRE, G. et al. Effects of FUdR on gene expression in the *C. elegans* bacterial diet OP50. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 1, p. 1–7, 2021.

MEHMOOD, T. A. K. S. J. N. Description of New Species of *Metarhabditis Longicaudatus* (Nematoda: Rhabditidae) With Three New Records From Sindh, Pakistan. **Plant Protection**, v. 3, n. 3, p. 131–139, 2019.

MESSA, V.; NUNES, J.; MATTEI, D. Seed Treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* for the control of *Meloidogyne javanica* “in vivo” bean culture and its direct effect on the motility, mortality and hatching of *M. javanica* “in vitro”. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 59, 2019.

MIGUNOVA, V. D.; SASANELLI, N. Bacteria as Biocontrol Tool against Phytoparasitic Nematodes. **Plants**, v. 10, n. 2, 2021. Acessado em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/10/2/389>.

MONTEIRO E SILVA, F. et al. Parasitic otitis caused by *Rhabditis* (*Rhabditis*) *freitasi* (Nematoda: Rhabditidae) in the cattle Gir breed in the State of Acre. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 2, p. 116–120, 2016.

MOZGOVAYA, I. N. et al. Nematicidal effects of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* in soil. **Pedobiologia**, v. 46, n. 6, p. 558–572, 2002.

NAKAGAWA, K.; SHIGEMOTO, M.; TSUCHIDO, Y. Increased Heat Resistance of *Bacillus subtilis* Spores in Oil. **Biocontrol Science**, v. 3, n. 2, p. 87–92, 1998.

NAUMOVA, N. B. et al. *Bacillus* -Based Probiotic Treatment Modified Bacteriobiome Diversity in Duck Feces. **Agriculture**, v. 11, n. 406, 2021. Acessado em: <https://www.mdpi.com/2077-0472/11/5/406>.

OLIVEIRA, D. F. et al. Purification and identification of metabolites produced by *Bacillus cereus* and *B. subtilis* active against *Meloidogyne exigua*, and their in silico interaction with a putative phosphoribosyltransferase from *M. incognita*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 525–538, 2014.

OSMAN, G. Y.; SALEM, F. M.; GHATTAS, A. Bio-efficacy of two bacterial insecticide strains of *Bacillus thuringiensis* as a biological control agent in comparison with a

nematicide, nematicur, on certain parasitic nematoda. **Anzeiger für Schädlingkunde Pflanzenschutz Umweltschutz**, v. 61, n. 2, p. 35–37, 1988.

PALOMERO, A. M. et al. Formulating fungal spores to prevent infection by trichostrongylids in a zoological park : Practical approaches to a persisting problem. **Biological Control** v. 152., 2021. Acessado em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964420306939?via%3Dihub>.

PEÑA-ESPINOZA, M. Drug resistance in parasitic helminths of veterinary importance in Chile: Status review and research needs. **Austral journal of veterinary sciences**, v. 50, n. 2, p. 65–76, 2018.

PENG, D. et al. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry6Aa and Cry55Aa toxins against *Meloidogyne incognita*. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 794–798, 2011.

PENG, D. et al. A novel metalloproteinase virulence factor is involved in *Bacillus thuringiensis* pathogenesis in nematodes and insects. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 846–862, 2016.

PENG, D. et al. Nematode-specific cadherin CDH-8 acts as a receptor for Cry5B toxin in *Caenorhabditis elegans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 102, n. 8, p. 3663–3673, 2018.

PENSEL, P. E. et al. Efficacy of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on *Echinococcus granulosus*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014 n. 2, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2014/693289/>. Acesso 13 jun.2021.

RAE, R. et al. A subset of naturally isolated *Bacillus* strains show extreme virulence to the free-living nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Pristionchus pacificus*. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 11, p. 3007–3021, 2010.

RAJKOVIC, A. et al. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. **Letters in Applied Microbiology** v. 46, p. 536–541, 2008.

RAMYABHARATHI, S. A. et al. Biocontrol of wilt-nematode complex infecting gerbera by *Bacillus subtilis* under protected cultivation. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 28, n. 21 , 2018. Disponível em: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-018-0027-2#citeas>. Acesso: 17 jun. 2021.

RAO, M. S. et al. *Bacillus subtilis* IHR BS-2 enriched vermicompost controls root knot nematode and soft rot disease complex in carrot. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 56–62, 2017.

RIPERT, G. et al. Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3445–3454, 2016.

RODRI, F. *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation. **Nature Communications**, v. 8, n. 14332, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms14332>. Acesso: 17 jun. 2021.

SALEHI JOUZANI, G. et al. Molecular detection of nematocidal crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains of Iran and evaluation of their toxicity on free-living and plant-parasitic nematodes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 10, p. 812–822, 2008.

SALAS, A.; ACHINELLY, M.F.; SAUKA, D.H. Nematicidal effect of an Argentine strain of *Photorhabdus laumondi laumondi* (Enterobacteriaceae) on the free-living nematode *Panagrellus redivivus* (Rhabditidae : Panagrolaimidae). **Revista Argentina de Microbiología**, v. 53, n. 1, p. 84–85, 2021.

SANDERS, J. et al. International Journal for Parasitology : Drugs and Drug Resistance A new paraprotic-based treatment for control of *Haemonchus contortus* in sheep. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 14, p. 230–236, 2020.

SANDHU, A. et al. Specific collagens maintain the cuticle permeability barrier in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 217, n. 3, 2021. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/348889319\\_Specific\\_collagens\\_maintain\\_the\\_cuticle\\_permeability\\_barrier\\_in\\_Caenorhabditis\\_elegans](https://www.researchgate.net/publication/348889319_Specific_collagens_maintain_the_cuticle_permeability_barrier_in_Caenorhabditis_elegans). Acesso: 16 jun. 2021.

SCHULENBURG, H.; MÜLLER, S. Natural variation in the response of *Caenorhabditis elegans* towards *Bacillus thuringiensis*. **Parasitology**, v. 128, n. 4, p. 433–443, 2004.

SENHAJI, A. F.; LONCIN, M. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria (I). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 12, n. 3, p. 203–216, 1977.

SHAHID, I. et al. Profiling of Metabolites of *Bacillus* spp. and Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, n. February, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/7f8b9479-74e3-3346-8813-b55b62e9ba6b/>. Acesso: 28 jun. 2021.

SHI, J. et al. The *Caenorhabditis elegans* CUB-like-domain containing protein RBT-1 functions as a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry6Aa toxin. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 5, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008501>. Acesso: 20 jun. 2021.

KOLENSKI, N. et al. The cultivation of the nematodes *Panagrellus*, *Turbatrix* (Anguillula) and *Rhabditis* for using in fish feeding. **Fischer Science of Ukraine**, v. 3; n. 49; p. 16-31, 2019.

SOLIMAN, G. M.; AMEEN, H. H.; ABDEL-AZIZ, S. M. *In vitro* evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*.

**Bulletin of the National Research Centre.** v. 43, n. 171, 2019. Disponível em: <https://bnrc.springeropen.com/articles/10.1186/s42269-019-0200-0>. Acesso: 30. mai. 2021.

SOLIMAN, M.; AMEEN, H. H.; EL, U. S. Effect of Treatment Time on Biocontrol Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lysinibacillus sphaericus* and their Fusants against Root knot Nematode *Meloidogyne incognita* Infecting Tomato Plants. **Middle East Journal of Agriculture Research.** v. 6, n. 2, p. 369–375, 2017.

SOUSA, C. et al. Effects of live feed containing *Panagrellus redivivus* and water depth on growth of *Betta splendens* larvae. **Aquaculture Research.** v. 49, n. 8, 2018. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/325420783\\_Effects\\_of\\_live\\_feed\\_containin\\_g\\_Panagrellus\\_redivivus\\_and\\_water\\_depth\\_on\\_growth\\_of\\_Betta\\_splendens\\_larvae](https://www.researchgate.net/publication/325420783_Effects_of_live_feed_containin_g_Panagrellus_redivivus_and_water_depth_on_growth_of_Betta_splendens_larvae). Acesso: 22 jun. 2021.

SRINIVASAN, J. et al. The draft genome and transcriptome of *Panagrellus redivivus* are shaped by the harsh demands of a free-living lifestyle. **Genetics.** v. 193, n. 4, p. 1279-1295, 2013.

STERKEN, M. G. et al. The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Genetics,** v. 31, n. 5, p. 224–231, 2015.

STOCK, S. P.; NADLER, S. A. Morphological and molecular characterisation of *Panagrellus* spp. (Cephalobina: Panagrolaimidae): Taxonomic status and phylogenetic relationships. **Nematology,** v. 8, n. 6, p. 921–938, 2006.

STUHR, N. L.; CURRAN, S. P. Bacterial diets differentially alter lifespan and healthspan trajectories in *C. elegans*. **Communications biology,** v. 3, n. 1, p. 653, 2020.

TADIGIRI, S. et al. **Journal of Entomology and Zoology Studies.** Isolation and characterization of chemical constituents from *B. amyloliquefaciens* and their nematicidal activity. v. 8, n. 3, p. 2062-2066, 2020.

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. **Veterinary Parasitology.** Oxford, Garsington Road – Fourth edition, 2016. 1006 p.

URQUHART, G. M., J. et al. **Parasitologia veterinária.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998. 273 p.

VERDUZCO-ROSAS, L. A. et al. Selection and characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains showing nematicidal activity against *Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita*. **FEMS Microbiology Letters,** v. 368, n. 5, 2021.

VEROCAI, G. G. et al. Otite parasitária bovina por nematóides rhabditiformes em vacas Gir no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology : Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária,** v. 16, n. 2, p. 105–107, 2007.

- WANG, B. et al. A Proteomic Analysis Provides Novel Insights into the Stress Responses of *Caenorhabditis elegans* towards Nematicidal Cry6A Toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-14428-3>. Acesso: 23 mai. 2021.
- WANG, J. et al. Enhanced thermal stability of lichenase from *Bacillus subtilis* 168 by SpyTag/SpyCatcher-mediated spontaneous cyclization. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 79, 2016. Disponível em: <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-016-0490-5#citeas>. Acesso: 26 mai. 2021.
- WEI, J. Z. et al. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 5, p. 2760–2765, 2003.
- XIA, Y. et al. The purL gene of *Bacillus subtilis* is associated with nematicidal activity. **FEMS Microbiology Letters**. v. 322, n. 2, p. 99-107 2011.
- YANG, D. M. et al. Biological control of postharvest diseases with *Bacillus subtilis* (B1 strain) on muskmelons (*Cucumis melo* L. cv. Yindi). **Acta Horticulturae**, v. 712 II, p. 735–739, 2006.
- ZHAO, D. et al. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease. **Biological Control**, v. 119, p. 12–19, 2018.
- ZHENG, D. et al. *Bacillus thuringiensis* produces the lipopeptide thumolycin to antagonize microbes and nematodes. **Microbiological Research**, v. 215, p. 22–28, 2018.
- ZHENG, Z. et al. Nematicidal spore-forming Bacilli share similar virulence factors and mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6, n.1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4990965/pdf/srep31341.pdf>. Acesso: 21 mai. 2021.

### **Conclusões gerais**

Os produtos A, B e C apresentam potencial nematicida. Os modelos *Panagrellus redivivus* e *Caenorhabditis elegans* são úteis como indicadores de nematotoxicidade de produtos à base de *Bacillus* spp., embora existam variações de susceptibilidade entre os nematoides. Os produtos A e B são os mais indicados para estudos à campo para a confirmação da eficácia *in vivo* como anti-helmínticos. O produto C não tem ação contra os nematoides *Metarhabditis* spp. e *P. redivivus* e pode ser benéfico para a reprodução deste último.