



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARJORI DOS SANTOS GOUVEIA

**ABORDAGEM METAGENÔMICA NA ANÁLISE DA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE BIOINSUMOS
PRODUZIDOS *ON FARM***

Londrina
2024

MARJORI DOS SANTOS GOUVEIA

**ABORDAGEM METAGENÔMICA NA ANÁLISE DA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE BIOINSUMOS
PRODUZIDOS *ON FARM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina- UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina
2024

G719a Gouveia, Marjori dos Santos.

Abordagem metagenômica na análise da qualidade microbiológica de bioinsumos produzidos on farm / Marjori dos Santos Gouveia. - Londrina, 2024.
124 f.

Orientador: Marco Antonio Nogueira.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Controle de Qualidade - Tese. 2. Cultivo de Microrganismos - Tese. 3. Contaminação Microbiana - Tese. 4. Isolamento Microbiano - Tese. I. Nogueira, Marco Antonio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

MARJORI DOS SANTOS GOUVEIA

**ABORDAGEM METAGENÔMICA NA ANÁLISE DA
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE BIOINSUMOS
PRODUZIDOS *ON FARM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina- UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Orientador Marco Antonio Nogueira
Embrapa - Soja

Dr. Felipe Favoretto Furlan
IDR- Parana

Dra. Milena Serenato Klepa
Embrapa - Soja

Londrina, 29 de fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar comigo em todos os momentos e me auxiliar a cumprir meus objetivos e conquistar o que almejo.

Aos meus pais Marcia e Manoel e minha irmã Tamara por toda a ajuda e incentivo em todas as etapas da minha vida, tenho carinho e orgulho por tudo o que fizeram por mim.

A toda a equipe do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja: Lígia, Eduara, Renan, Mariana, Carol, Walkyria, Alexandra, Sara, Aryane, Fernanda, Helen, Milena, Cláudia, e a todos os demais, pelos ensinamentos, que foram passados de forma gentil, pelo apoio e amizade, por toda a ajuda dentro e fora do laboratório.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira, pelas orientações, por sempre estar disponível a me ouvir e a tirar minhas dúvidas, pela paciência, e por todos os ensinamentos. À Dra. Mariangela Hungria por toda ajuda e cooperação com meu trabalho.

Ao Dr. Leonardo Araújo Terra por ter me ensinado sobre bioinformática, e me ajudar com as análises do trabalho, o que demandou tempo e paciência, mas a todo o momento ele esteve ao meu lado dando orientações.

Aos meus amigos Cesar e Felipe, por terem me incentivado a fazer o mestrado e me ajudado nesta jornada acadêmica. O Felipe, esteve comigo desde o primeiro ano da graduação me auxiliando e incentivando, por ele comecei a fazer estágio não obrigatório na UEL e consegui um estágio no IDR-PR. Já o Cesar me inspirou a seguir a área da microbiologia.

A todos os produtores e colaboradores que disponibilizaram amostras para que este trabalho fosse possível.

À UEL, Embrapa-Soja e à Capes, pelo mestrado, a concessão a bolsa e por toda a ajuda para a realização deste trabalho.

RESUMO

GOUVEIA, Marjori dos Santos. **Abordagem metagenômica na análise da qualidade microbiológica de bioinsumos produzidos *on farm***. 2024. 1220. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

O uso agrícola de bioinsumos tem aumentado no Brasil e no mundo nos últimos anos. Entretanto, alguns agricultores têm buscado cultivar estes insumos nas propriedades, denominada produção *on farm*, o que pode comprometer a qualidade do produto final. O objetivo foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de bioinsumos produzidos *on farm* com uma abordagem metagenômica e métodos microbiológicos clássicos dependentes de cultivo para caracterizar os microrganismos presentes nas amostras e genes de resistência a antimicrobianos. Um total de 22 amostras foram obtidas de propriedades rurais que fazem o uso do sistema de produção *on farm* de bioinsumos, incluindo inoculantes e agentes biológicos de controle de pragas. No laboratório, as amostras foram avaliadas quanto ao pH e condutividade elétrica e, em seguida, foram diluídas em solução salina estéril e plaqueadas em meio de cultura de acordo com o microrganismo alvo pretendido. As colônias isoladas de bactérias obtidas em cada meio de cultura foram submetidas à extração de DNA genômico e ao sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S. Para a abordagem metagenômica, o DNA total das amostras foi extraído e submetido à análise metagenômica pelo sequenciamento por *shotgun*, abordagem que dispensa o cultivo em meios de cultura, possibilitando acessar toda a diversidade microbiana presente nas amostras, e não apenas dos microrganismos cultiváveis. Todas as 22 amostras apresentaram contaminação por diferentes tipos de microrganismos, dentre os quais, alguns reconhecidamente patogênicos para humanos. Com base no método baseado em cultivo foram encontrados apenas dois gêneros de microrganismos alvos: *Bacillus* e *Pseudomonas*. O pH das amostras, em sua maioria, foi menor que 5, variando de 2,9 a 6,8 e a condutividade elétrica variou entre 152 e 10.830 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Na maioria das amostras o DNA dos microrganismos alvo foi detectado em quantidades abaixo de 1% pela abordagem metagenômica, e em apenas um caso alcançou 68,8%. A maioria das amostras apresentou genes de resistência a antimicrobianos, exceto as amostras 6, 9, 12 e 20, embora apresentassem contaminações por microrganismos potencialmente patogênicos. Mesmo a amostra 18, que não apresentou microrganismo potencialmente patogênico, apresentou genes de resistência a

antimicrobianos hospedado nos microrganismos contaminantes. O método de avaliação da qualidade microbiológica de bioinsumos baseado em cultivo é limitado e deve ser complementado por estudos mais precisos, como a metagenoma, devido à limitação ao crescimento dos microrganismos contaminantes em meio de cultivo artificial.

Palavras-chave: Controle de Qualidade, Cultivo de Microrganismos, Contaminação Microbiana, Isolamento Microbiano, Resistência a Antimicrobianos.

ABSTRACT

GOUVEIA, Marjori dos Santos. **Metagenomics approach in the analysis of microbiological quality of inoculants produced on farm**. 2024. 122. Dissertation (Master in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

The agricultural use of bioinputs has increased in Brazil and worldwide in recent years. However, some farmers have sought to cultivate these inputs on their properties, known as “on-farm” production, which can compromise the quality of the final product. The objective was to evaluate the microbiological quality of samples of bioinputs produced on-farm using a metagenomic approach and classical microbiological methods dependent on cultivation to characterize the microorganisms present in the samples and the presence of genes of resistance to antibiotics. A total of 22 samples were obtained from rural properties that have used the on-farm production system of bioinputs, including inoculants and biological pest control agents. In the laboratory, the samples were evaluated for pH and electrical conductivity and were then diluted in sterile saline solution and plated on culture medium according to the intended target microorganism. The isolated bacterial colonies obtained in each culture medium were subjected to genomic DNA extraction and partial sequencing of the 16S ribosomal gene. For the metagenomic approach, the total DNA of the samples was extracted and subjected to metagenomic analysis by shotgun sequencing, an approach that does not require cultivation in culture media, allowing access to all the microbial diversity present in the samples, and not only the cultivable microorganisms. All 22 samples showed contamination by different types of microorganisms, some of which are known to be pathogenic to humans. Based on the cultivation-based method, only two genera of target microorganisms were found: *Bacillus* and *Pseudomonas*. The pH of the samples was mostly lower than 5, ranging from 2.9 to 6.8, and the electrical conductivity ranged from 152 to 10,830 $\mu\text{S}/\text{cm}$. In most samples, the DNA of the target microorganisms was detected in quantities below 1% by the metagenomic approach, and in only one case it reached 68.8%. Most samples presented antimicrobial resistance genes, except for samples 6, 9, 12 and 20, although they presented contamination by potentially pathogenic microorganisms. Even the sample 18, which did not present potentially pathogenic microorganisms, presented antimicrobial resistance genes hosted in the contaminating microorganisms. The method for assessing the microbiological quality of bioinputs based on cultivation is limited and should be

complemented by more precise studies, such as metagenome, due to the limitation on the growth of contaminating microorganisms in artificial culture medium.

Keywords: Quality Control, Cultivation of Microorganisms, Microbial Contamination, Microbial Isolation, Antimicrobial Resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Aspecto geral do kit de coleta das amostras de bioinsumos produzidos *on farm* para análise da qualidade microbiológica..... 36
- Figura 2** – Imagem ilustrativa de uma diluição seriada e plaqueamento a partir da amostra do bioinsumo produzido *on farm*, até a diluição de 10^{-7} em solução salina a 0,85% estéril 40
- Figura 3** – Aspecto visual de placas de Petri contendo meios de cultivo específicos, de acordo com o microrganismo alvo. O número na imagem representa a amostra, na diluição 10^{-5} , exceto amostra 3 na diluição 10^{-3} e as amostras 5, 6 e 14 sem diluição 46
- Figura 4** – Frequência relativa de sequências do DNA genômico de microrganismos presentes nas amostras de bioinsumos obtidas de produção *on farm* e a amostra controle, apresentada por espécie. Os respectivos grupos funcionais como geralmente são reconhecidos os microrganismos são representados por cores 49
- Figura 5** – Análise da presença de genes de resistência adquirida a antibióticos em 22 amostras de bioinsumos produzidos *on farm*..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Microrganismos(s) alvo(s) da produção <i>on farm</i> , conforme declarado no formulário de envio e estado de origem	38
Tabela 2 – pH e condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de amostras de bioinsumos produzidos <i>on farm</i> , provenientes de diferentes regiões do Brasil	44
Tabela 3 - Morfotipos de colônias que apresentaram crescimento nos respectivos meios de cultura em placas de Petri, selecionados para o sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S para indicação do gênero, com base na comparação com o banco de dados de genes ribossomais do NCBI e a respectiva concentração na amostra	47
Tabela 4 – Resultados da análise metagenômica pelo MetaPhlAn com a abundância relativa de DNA dos microrganismos alvo encontrados no controle positivo (C) e nas amostras provenientes de produções de bioinsumos <i>on farm</i> (1 a 22).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
YMA	Yeast Manitol Agar
TSA	Agar Triptona de Soja (Tryptic Soy Agar)
RC	Rojo Congo
SEMIA	Seção de Microbiologia Agrícola
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FEPAGRO	Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação Biológica do Nitrogênio
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
OMS	Organização Mundial da Saúde
GRAs	Genes de Resistência a Antibióticos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Breve Histórico do uso de Bioinsumos na agricultura brasileira.....	17
2.2	Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	19
2.2.1	<i>Bacillus</i>	19
2.2.2	<i>Pseudomonas</i>	21
2.2.3	<i>Bradyrhizobium</i>	22
2.2.4	<i>Azospirillum</i>	24
2.2.5	Coinoculação de <i>Bradyrhizobium</i> e <i>Azospirillum</i> em soja.....	25
2.3	Microrganismos para Controle Biológico.....	26
2.3.1	<i>Bacillus</i>	26
2.3.2	<i>Trichoderma</i>	27
2.3.3	<i>Beauveria</i>	28
2.4	Produção industrial de bioinsumos.....	28
2.5	produção <i>on farm</i> de bioinsumos.....	30
2.6	Métodos para o estudo de comunidades microbianas.....	32
2.6.1	Métodos Baseados em Cultivo.....	32
2.6.2	Métodos Moleculares Independentes de Cultivo.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Amostragem e local das análises.....	36
3.2	pH e Condutividade Elétrica dos cultivos.....	39
3.3	Diluição Seriada e Plaqueamento em Meios de Cultura.....	39
3.4	Sequenciamento Parcial do gene Ribossomal 16S RNAr dos Isolados Obtidos em Meio de Cultura 41	
3.5	Abordagem Metagenômica.....	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Características físico-químicas das amostras de bioinsumos produzidos <i>on farm</i>	44
4.2	Caracterização molecular a nível de gênero dos isolados obtidos nos meios de cultura.....	45
4.3	Caracterização taxonômica e genes de resistência a antimicrobianos das amostras de bioinsumos produzidas <i>on farm</i> baseadas em metagenômica.....	48
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	60
7	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A.....	105
	APÊNDICE B.....	117
	APÊNDICE C.....	120
	APÊNDICE D.....	122

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Programa Nacional de Bioinsumos (Decreto No. 10.375 de 26 de Maio de 2020), os bioinsumos são definidos como “Produto, processo ou tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos”. Diversos isolados microbianos têm sido utilizados como bioinsumos, devido sua capacidade de estimular o crescimento vegetal, por meio de vários mecanismos, como a produção de fitormônios, solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio. Microrganismos também são empregados no controle biológico de pragas e doenças a partir de mecanismos como produção de antibióticos, resistência sistêmica induzida, ou ação direta sobre a praga ou o patógeno, entre outros.

Dentre os microrganismos mais utilizados como bioinsumos, estão as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), como as do gênero *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, empregadas nas culturas de soja, milho, trigo e, mais recentemente, em pastagens com braquiárias. Além da promoção de crescimento de plantas, isolados dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* também apresentam atividade no biocontrole fitossanitário, como o *Bacillus thuringiensis* que são utilizados contra lagartas em culturas de soja, milho, algodão, feijão, dentre outras. Destacam-se ainda outros grupos de microrganismos utilizados no controle biológico, como, os fungos dos gêneros *Beauveria* e *Trichoderma*, como *Beauveria bassiana*, utilizada contra broca-do-café, dentre outras pragas.

O mercado de insumos biológicos vem crescendo no Brasil com a perspectiva de triplicar o volume de vendas até 2030 (ANPII, 2023c). Para que os produtos comerciais utilizados em biocontrole possam ser comercializados, é necessário que sejam avaliados quanto à eficiência agronômica, para registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A depender dos microrganismos, o processo de registro precisará tramitar também na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual analisa se há riscos ao ser humano, e também pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

(IBAMA) para verificação se há impacto do produto no ambiente e riscos à fauna e flora nativa.

No caso de inoculantes, se os microrganismos constituintes forem os que constam na relação de autorizados no Anexo II da IN 13 do MAPA de 2011, estes precisam apenas comprovar pureza, concentração mínima na data de vencimento e identidade da estirpe para obtenção do registro. Já os microrganismos que constam na lista dos recomendados para a produção de inoculantes, presentes no Anexo III da mesma IN, além das exigências anteriores, também precisam comprovar eficiência agrônômica. No caso de novos isolados microbianos, estes deverão ser depositados pela instituição responsável em um banco de germoplasma indicado pelo MAPA e, além de comprovar a eficiência agrônômica, o órgão ambiental ou de saúde poderá exigir avaliações que comprovem a inocuidade ao ambiente e à saúde humana (Brasil, 2011). Em todos os casos é necessário o registro do estabelecimento produtor no MAPA.

A produção industrial de bioinsumos requer profissionais capacitados, equipamentos adequados e assepsia do ambiente de produção para evitar contaminação no processo, exigindo um controle de qualidade rigoroso com a finalidade de obter o microrganismo de interesse em concentração adequada e com a pureza mínima exigida.

Todavia, recentemente, tem surgido um interesse de alguns produtores rurais em produzirem seus próprios insumos biológicos em biofábricas rudimentares nas propriedades, nas denominadas produções *on farm*, com o intuito de diminuir custos com insumos agrícolas comerciais. Porém devido à precariedade da grande maioria das instalações, os produtos acabam sendo contaminados por microrganismos indesejados, alguns potencialmente patogênicos para humanos, animais e plantas e, na maioria dos casos, o microrganismo alvo não é encontrado e, quando presente, sua concentração se encontra muito abaixo da adequada para promover o efeito desejado (Bocatti et al., 2023).

Uma das sugestões para a melhoria da qualidade das produções de insumos biológicos *on farm* seria o emprego apenas de microrganismos depositados em bancos de germoplasma oficiais credenciados pelo MAPA, reconhecidamente eficientes e seguros ao ambiente e à saúde humana, cadastro de produtor no MAPA e responsabilidade técnica habilitada (EMBRAPA, 2021).

O controle de qualidade é etapa fundamental no processo de produção

de bioinsumos, seja industrialmente, seja *on farm*. Para a avaliação da qualidade dos insumos biológicos à base de microrganismos, os métodos usuais são baseados no cultivo em meios de cultura específicos para a quantificação das células viáveis do microrganismo de interesse. Esse procedimento é relativamente simples quando o microrganismo alvo está em cultura pura. Entretanto, na maioria dos casos, os meios de cultivo não são seletivos, o que permite o crescimento de microrganismos não alvo (contaminantes), como frequentemente ocorre em produções *on farm*, o que dificulta ou impede a avaliação adequada do produto final. Neste caso, tão importante quanto saber se o microrganismo alvo realmente está presente, é preciso também conhecer o microrganismo contaminante, que pode ser um microrganismo inócuo ou um patógeno de risco sanitário.

Recentemente, técnicas moleculares têm sido empregadas para a avaliação da diversidade genética de comunidades microbianas complexas, independentes do cultivo em meios de cultura artificiais. Tal método permite a quantificação relativa de genomas de diferentes organismos em níveis taxonômicos distintos, bastando apenas a extração do DNA total presente em uma amostra. Essa abordagem, denominada metagenômica, permite analisar a diversidade taxonômica de organismos presentes em uma amostra, de solo, água, sedimento e até produtos biológicos complexos. Além da diversidade taxonômica, esse procedimento também possibilita analisar a diversidade funcional existente em uma amostra.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de bioinsumos produzidos *on farm* com uma abordagem baseada em metagenômica e métodos microbiológicos clássicos baseados em cultivo e verificar, além da presença dos microrganismos alvo, a caracterização dos microrganismos não alvo quanto ao potencial patogênico e presença de genes de resistência a antimicrobianos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BREVE HISTÓRICO DO USO DE BIOINSUMOS NA AGRICULTURA BRASILEIRA

Um dos pioneiros nos estudos sobre fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura da soja no Brasil foi a Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA) da Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul (RS), assim como o Instituto Biológico de São Paulo, que trabalharam na seleção de cepas e na produção dos primeiros inoculantes a partir de isolados locais (JONES, 2019). Em 1955, estirpes da Coleção de Culturas da Universidade de Wisconsin dos Estados Unidos foram trazidas ao Brasil (FREIRE e VERNETTI, 1999) e, em 1956, foi inaugurada a primeira biofábrica de inoculantes no país, em Pelotas-RS (ARAUJO, 2012; FREIRE e VERNETTI, 1999).

Na década de 1960, inoculantes contendo estirpes eficientes de *Bradyrhizobium*, adaptadas ao clima e aos solos brasileiros, já eram utilizados pelos produtores de soja em larga escala e a inoculação passou a substituir parcial ou totalmente o uso de fertilizante nitrogenado sintético (JONES, 2019). Atualmente, a inoculação a cada safra com *Bradyrhizobium* é adotada em 85% das áreas de produção de soja do país, substituindo totalmente a adubação nitrogenada e reduzindo os custos para o agricultor (ANPII, 2023a). Além disso, o uso de inoculantes resulta em uma menor poluição das águas e redução da emissão de gases de efeito estufa (HUNGRIA e NOGUEIRA, 2014; TELLES et al., 2024).

A legislação brasileira estabeleceu em 1975 que as estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio para a produção de inoculantes deveriam ser as recomendadas pelos órgãos oficiais de pesquisa, sendo a SEMIA e a Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) do RS, responsáveis pela distribuição e a manutenção das estirpes de rizóbios para a produção de inoculantes (GIONGO, 2007). Atualmente, outros bancos de germoplasma credenciados pelo MAPA atuam como provedores de estirpes para as indústrias, notadamente os da Embrapa Soja e da Embrapa Agrobiologia, garantindo a pureza e a identidade deste ingrediente ativo para a produção do bioinsumo.

A partir de 2013, a Embrapa Soja passou a recomendar o uso de uma segunda espécie bacteriana para a inoculação da cultura da soja, o *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, em coinoculação com as estirpes recomendadas

de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Em coinoculação, as duas espécies de microrganismos resultam em uma interação sinérgica, promovendo nodulação mais precoce e mais abundante, que promove o desenvolvimento da planta, notadamente as raízes resultando em aumento de produtividade (JONES, 2019; HUNGRIA, NOGUEIRA e ARAUJO, 2013; PRANDO et al., 2024). Atualmente, a coinoculação já é adotada em mais de 35% das áreas de produção de soja do país (ANPII, 2023b).

Embora os inoculantes à base de rizóbios em leguminosas sejam adotados desde longa data, e mais recentemente o uso de *Azospirillum* em gramíneas ou em coinoculação com rizóbios em soja e feijoeiro, novos inoculantes à base de outros gêneros de microrganismos e mecanismos de ação também têm chegado ao mercado. Na Rússia, a inoculação com microrganismos solubilizadores de fosfato (PO_4^{3-}) do gênero *Bacillus* já é realizada desde 1950 em culturas de grãos (KUDASHEV, 1956). No Brasil, a Embrapa Milho e Sorgo conduziu pesquisas por cerca de 20 anos que levaram à indicação de dois isolados de microrganismos (*Bacillus megaterium* CNPMS B119 e *Bacillus subtilis* CNPMS B2084) mobilizadores de fosfato capazes de aumentar a absorção de P pelas plantas de milho e soja, resultando em um primeiro inoculante comercial registrado no país para esta finalidade. O mecanismo se dá pela solubilização de formas minerais e pela mineralização de formas orgânicas de P no solo, além do estímulo ao aumento das raízes das plantas, melhorando a eficiência de uso desse nutriente (GOMES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2009; SOUSA et al. 2021; VELLOSO et al., 2020).

Além do uso de inoculantes voltados para a nutrição de plantas e atenuação de estresses, notadamente a seca, há vários microrganismos usados para o biocontrole de pragas e doenças. Um caso emblemático foi o uso do Baculovírus anticarsia para o controle da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) nos anos 1980, a principal praga da cultura na época (MOSCARDI, 1983). Indicado pela pesquisa oficial como eficiente método de controle, os produtores passaram a recolher e armazenar as lagartas infectadas da própria lavoura para uso como bioinseticida nos anos seguintes. Esse fato pode ter contribuído para a seleção de inóculos pouco eficientes, levando ao descrédito da tecnologia e sua descontinuidade de uso a partir dos anos 1990 (GAZZONI e HUNGRIA, 2021).

Recentemente, o mercado brasileiro de insumos biológicos tem crescido consideravelmente. De acordo com dados do MAPA, o número de indústrias

produtoras de insumos biológicos registradas como estabelecimento produtor aumentou de 16 em 2011 para 171 em 2022 (BRASIL, 2023). No que se refere aos agentes de biocontrole, em 2022 foram registrados 501 produtos para ação em cerca de 200 alvos biológicos (BORSARI e VIEIRA, 2022).

O mercado brasileiro de insumos biológicos representa apenas 5% do mercado global, mas entre 2017 a 2020, o mercado de biológicos cresceu 46% no país, enquanto o mercado global cresceu 16% (SILVA, 2021). Portanto, ainda há grande potencial de crescimento para o uso de insumos biológicos no país, que deverá se consolidar entre os maiores mercados do mundo.

2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

As plantas interagem na sua rizosfera com vários microrganismos capazes de auxiliar o crescimento vegetal, entre os quais diversas BPCP. Essas bactérias possuem diversos mecanismos de ação, como a mobilização de fosfato, FBN, supressão de fitopatógenos, produção de fitormônios, atenuação de estresses abióticos, entre outros fatores (GLICK, 2012). Dentre os gêneros de bactérias mais estudados como BPCP, destacam-se: *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e *Pseudomonas*.

2.2.1 *Bacillus*

O gênero *Bacillus* apresenta células no formato de bastonete, Gram-positivas e inclui espécies aeróbicas ou anaeróbicas facultativas (PRASHAR, KAPOOR e SACHDEVA, 2014). É conhecido por sua capacidade de formar endósporos, estrutura rígida e resistente, que permite ao microrganismo sobreviver a condições ambientais adversas (KUMAR, KUMAR e PRATUSH, 2014). Também são encontrados predominantemente no solo e na rizosfera (PRASHAR, KAPOOR e SACHDEVA, 2014).

As espécies do gênero *Bacillus* têm uma temperatura ótima para crescimento de 30 ± 4 °C *in vitro*, por um período de 16 a 24 h (MONNERAT *et al.*, 2020). Entretanto, tolera temperaturas mais elevadas, como apontado no estudo realizado por Fasolin (2017), em que alguns isolados do gênero *Bacillus* tiveram crescimento ótimo a 37 °C. As colônias deste gênero apresentam morfologias

distintas, dependendo da espécie, podendo variar a coloração entre esbranquiçada ou creme, opacas ou brilhosas, superfície lisa, uniforme ou rugosa, presença ou ausência de elevações centrais, e bordas com características variadas (MONNERAT *et al.*, 2020).

As BPCP do gênero *Bacillus* apresentam diversos mecanismos de promoção de crescimento de plantas, como o controle biológico a partir de seus metabólitos secundários que podem ser compostos antimicrobianos (FIRA *et al.*, 2018), antibióticos, enzimas hidrolíticas e sideróforos. Também podem suprimir patógenos pela competição por nutrientes e espaço (BENEDUZI e PASSAGLIA, 2012). Outro mecanismo de promoção de crescimento das plantas é a produção de fitormônios, principalmente giberelinas, citocininas, auxinas e ácido abscísico (BHATTACHARYYA e JHA, 2011). Também podem fixar nitrogênio em vida livre e solubilizar fosfato, contribuindo na nutrição de plantas (BORRISS, 2011). Entretanto, é importante ressaltar que todas estas propriedades não estão reunidas em um mesmo isolado, sendo que a intensidade de cada propriedade e, portanto, sua finalidade, varia entre os isolados, mesmo dentro de uma mesma espécie. Por exemplo, a espécie *Bacillus subtilis* apresenta isolados que atuam como mobilizadores de fosfato, biofungicidas, bioinseticidas ou bionematicidas, mas cada propriedade depende da estirpe, e raramente mais de uma propriedade é encontrada em uma mesma estirpe.

Outro mecanismo de ação promotora de crescimento de plantas está relacionado à proteção contra estresses abióticos. A inoculação de isolados dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* em trigo (*Triticum aestivum* L.) e milho (*Zea mays* L.) atenuou os sintomas de estresse hídrico nessas plantas, em parte atribuída a alterações na arquitetura das raízes, tornando-as mais eficientes em explorar o solo em busca de água e nutrientes (JOCHUM *et al.*, 2019).

Algumas espécies do gênero *Bacillus* foram reclassificadas como *Priestia*, como o caso de *Priestia megaterium* e de *Priestia aryabhatai*, com base em suas semelhanças filogenéticas e moleculares entre si e diferentes do gênero *Bacillus*, sofrendo assim essa distinção taxonômica (GUPTA *et al.*, 2020).

Entre as espécies que são conhecidas pelo seu papel como BPCP destacam-se *B. subtilis* (BLAKE, CHRISTENSEN e KOVACS, 2021) e *Priestia megaterium*. A espécie *P. megaterium* STB1 é uma BPCP capaz de resistir ao estresse ambiental como salinidade, ampla faixa de temperaturas, produz fitormônios

como a auxina, e possui genes de produção de compostos antimicrobianos (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

2.2.2 *Pseudomonas*

Este gênero pode ser encontrado em diversos ambientes, incluindo a rizosfera (Muleta *et al.*, 2009). Possuem diversas espécies de BPCP como *P. fluorescens* e *P. psychrotolerans* (KUBI *et al.*, 2021; PARK *et al.*, 2015). Além de ser adaptada à rizosfera, possui rápido crescimento em meios artificiais e uma exigência nutricional simples, capaz de utilizar diversos substratos orgânicos como fontes de carbono e energia. São bastonetes Gram-negativos, aeróbicos, podendo ser anaeróbicos facultativos, flagelados, sendo assim móveis, e produzem pigmentos (DORJEY e SHARMA, 2017). Algumas espécies apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C (DONNARUMMA *et al.*, 2010), conseguindo suportar ampla faixa de temperatura, de 4 a 42 °C, porém valores extremos podem prejudicar seu desenvolvimento (MUNNA *et al.*, 2016), enquanto o pH ideal fica em torno de 7,0 a 7,5 (SOESANTO *et al.*, 2022).

As espécies de *Pseudomonas* podem apresentar diversas estratégias de biocontrole, como a produção de compostos antifúngicos, sideróforos, competição por espaço e nutrientes com outros microrganismos, entre outros. São particularmente eficientes no biocontrole de fitopatógenos, produzindo moléculas antifúngicas de amplo espectro, sendo encontrados diversos isolados com essa propriedade. Além disso, produzem fitormônios, que estimulam o crescimento das plantas, tais como auxinas, giberelinas, citocininas, entre outros (DORJEY; DOLKAR e SHARMA, 2017). Quanto ao efeito nutricional, alguns isolados podem fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e promover a quelação de ferro (PANPATTE *et al.*, 2016).

Compostos orgânicos voláteis identificados como 13-Tetradecadien-1-ol, 2-butanone e 2-Methyl-n-1-tridecene produzidos por *P. flourescens* SS101 foram capazes de promover o crescimento de tabaco (*Nicotiana tabacum*), usado como planta modelo, por meio da indução de resistência sistêmica, evidenciando o papel desses compostos na intercomunicação planta-microrganismos (PARK *et al.*, 2015).

A aplicação prévia de *P. flourescens* foi capaz de controlar o bolor verde causado por *Penicillium digitatum* em frutos de laranja (*Citrus sinensis*) em pós-colheita, aumentando o tempo de prateleira da fruta. O isolado foi capaz de inibir a

germinação dos esporos e o alongamento do tubo germinativo do fungo, além de induzir resistência na casca da laranja ao ataque fúngico por estimular a atividade de quitinases e outras enzimas envolvidas na defesa e atenuação o estresse oxidativo nas plantas (WANG *et al.*, 2018).

2.2.3 *Bradyrhizobium*

Rizóbio é um termo genérico que compreende diferentes gêneros de bactérias capazes de formar nódulos nas leguminosas e realizar a FBN, sendo *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* os gêneros de maior importância agrônômica (WILLEMS, 2006). São bactérias estritamente aeróbias, Gram-negativas, encontradas normalmente em vida livre no solo ou em simbiose com algumas leguminosas (SOMASEGARAM e HOBEN, 1994). Também denominadas de diazotróficas, possuem um complexo enzimático chamado dinitrogenase, que é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônia que, em sequência, é convertida em outras formas assimiláveis pela planta (HUNGRIA, 2005).

No estabelecimento da simbiose, ocorre a formação de nódulos nas raízes das plantas hospedeiras compatíveis, que são colonizados pelos rizóbios. Em contrapartida, a planta fornece abrigo e recursos como fontes de carbono e energia para o microrganismo (MARIN *et al.*, 1999).

Os isolados de *Bradyrhizobium* são fáceis de serem cultivados em condições de laboratório, pois consomem carboidratos simples e aminoácidos. Entretanto, apresentam crescimento lento, por isso precisam ser cultivados em condições de assepsia, caso contrário contaminantes de crescimento rápido podem dominar o meio de crescimento. A temperatura ideal para seu crescimento está entre 25 a 30 °C com pH ideal entre 6 e 7 (O'HARA *et al.*, 2016).

O meio de cultura universalmente utilizado para o cultivo de rizóbios é à base de extrato de levedura, manitol e ágar (do inglês *Yeast Mannitol Agar*, YMA) que foi descrito por Fred e Waksman (1928) e Vicent (1970), no qual se utiliza o vermelho congo, que auxilia na diferenciação entre rizóbios e contaminantes, já que os microrganismos de interesse tendem a não absorver o corante devido à produção de exopolissacarídeos. Colônias de *Bradyrhizobium* possuem um crescimento lento e são translúcidas quando novas (quando as colônias são menores que 1 mm de diâmetro), depois passam a ser mais opacas e raramente são gomosas, são circulares

e convexas (HUNGRIA *et al.*, 2016).

No Brasil são utilizadas quatro estirpes elite para a produção de inoculantes para soja, sendo as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *B. elkanii*, SEMIA 5079 de *B. japonicum* e SEMIA 5080 de *B. diazoefficiens* (MENDES *et al.*, 2014). O suprimento de N para a soja via FBN pode chegar a 90% (ZILLI *et al.*, 2021), sendo que em termos nacionais, estima-se que o suprimento de N via FBN para a soja brasileira seja em torno de 80%, um dos mais altos do mundo (HERRIDGE *et al.*, 2021; HERRIDGE *et al.*, 2008).

Na cultura da soja, a FBN consegue suprir a demanda de nitrogênio sem o uso de fertilizantes químicos nitrogenados, sendo capaz de sustentar uma produtividade superior a 6.000 kg ha⁻¹ (SATURNO *et al.*, 2017). Tentativas de suplementação com N mineral, além de onerosas, raramente resultam em aumento de produtividade da soja quando a inoculação com estirpes elite de *Bradyrhizobium* é realizada adequadamente, mesmo em altos níveis de produtividade (SATURNO *et al.*, 2017; ZILLI *et al.*, 2021). Em outras leguminosas, como feijão caupi (*Vigna unguiculata*) a inoculação com estirpes elite de *Bradyrhizobium* aumentou o número de vagens por planta, a massa e o rendimento de grãos, em substituição aos fertilizantes nitrogenados (AYALEW *et al.*, 2021). Há que se considerar que existe uma alta especificidade entre a estirpe e a planta hospedeira, havendo a necessidade de seleção das estirpes elite que apresentem maior afinidade e interação com a planta hospedeira.

Em áreas onde o cultivo da soja já é realizado há vários anos, existe no solo uma população estabelecida de rizóbios compatíveis, capazes de nodular a cultura. Entretanto, a reinoculação com estirpes elite comerciais de *Bradyrhizobium* aumenta o rendimento de grãos de 12 a 18%, em relação à soja não inoculada. Isso ocorre porque as bactérias presentes no inoculante encontram-se em alta concentração, pureza e fisiologicamente ativas, diferentemente das células que estão estabelecidas no solo, que podem, além de estarem em menor número, também serem menos ativas fisiologicamente, atrasando o processo de nodulação e FBN (ZILLI *et al.*, 2021). Este efeito destaca a importância da inoculação anual como estratégia para aumento da produtividade e, conseqüentemente, da sustentabilidade do sistema de produção de soja.

2.2.4 *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum* compreende bastonetes curtos, levemente curvos, Gram-negativos, com flagelos polares (HALL e KRIEG, 1984). Geralmente colonizam a superfície das raízes e, em alguns casos, a parte interna dos tecidos das raízes das plantas, sendo denominadas diazotróficas endofíticas facultativas (DOBEREINER e BALDANI, 1982). O pH ideal de crescimento varia entre 7 e 8, e temperatura ótima de 28 a 38 °C (CAIZA, TAMAYO e GUZMÁN, 2018).

São bactérias consideradas promotoras de crescimento em diversas culturas de importância agrônômica como o milho, trigo, bem como a soja em coinoculação com *Bradyrhizobium*, e vêm sendo amplamente utilizadas em inoculantes (DAY e DÖBEREINER, 1976; HUNGRIA *et al.*, 2010; HUNGRIA *et al.*, 2013). Embora tenha baixa capacidade de FBN, o gênero *Azospirillum* é um dos maiores produtores de fitormônios como auxinas, citocininas, ácido abscísico, entre outros (CASSÁN *et al.*, 2011), os quais promovem o crescimento vegetal.

Esses fitormônios atuam não apenas na parte aérea das plantas, mas também melhoram a arquitetura do sistema radicular, conseqüentemente, aumentando a capacidade das plantas de explorar o solo em busca de água e nutrientes (ARDAKANI *et al.*, 2011; RONDINA *et al.*, 2020). A inoculação com estirpes elite de *A. brasilense* pode promover aumentos na taxa fotossintética das plantas, o que aumenta a capacidade de fixação de carbono pela cultura. Tem efeito positivo na condutância estomática e na elasticidade da parede celular, o que resulta em maior desempenho e produtividade pelas plantas (ZUFFO *et al.*, 2019). Outros benefícios promovidos pelo *Azospirillum* incluem a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, mas os mecanismos de ação dependem do genótipo do hospedeiro, da estirpe da bactéria, do fitopatógeno e da intensidade do estresse abiótico (FUKAMI, CERZINI e HUNGRIA, 2018).

Pesquisas realizadas no Brasil têm tido papel importante no estudo do gênero *Azospirillum*, as quais focaram principalmente no mecanismo de FBN pela bactéria. Apenas a partir de 2004 foram selecionadas as primeiras estirpes comerciais de *A. brasilense* pela Embrapa Soja e, após a comprovação de sua eficiência agrônômica em 2009 (HUNGRIA *et al.*, 2010), foi lançado no mercado o primeiro inoculante comercial para as culturas de milho, trigo e arroz, compreendendo as estirpes Ab-V5 e Ab-V6, atualmente as mais utilizadas na produção de inoculantes

dessa espécie (HUNGRIA, 2016).

A inoculação com a estirpe Ab-V5 de *A. brasilense* promoveu o crescimento do milho, melhorou suas características bioquímicas e aumentou a eficiência do uso do nitrogênio pela cultura (ZEFFA *et al.*, 2019). *A. brasilense* associado à adubação nitrogenada em cobertura pode ainda aumentar o número de grãos por espiga (DA COSTA SAPUCAY *et al.*, 2020). Devido ao aumento da eficiência de uso do N mineral pelo efeito no sistema de raízes, é possível reduzir a adubação nitrogenada de cobertura em até 25% sem perdas de produtividade, substituindo-se pela inoculação (HUNGRIA *et al.*, 2022). Estes resultados indicam a importância do uso de inoculantes à base de *Azospirillum brasilense* para o aumento da eficiência do sistema de produção de milho.

2.2.5 Coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em soja

A coinoculação compreende o uso simultâneo de mais de um microrganismo benéfico que juntos contribuem, por diferentes mecanismos, para potencializar os benefícios isolados que podem oferecer às plantas, como a FBN pelo *Bradyrhizobium* e a promoção de crescimento pela ação de fitormônios pelo *Azospirillum* (HUNGRIA e NOGUEIRA, 2014).

É uma tecnologia que oferece diversas vantagens às plantas, como a melhoria da arquitetura do sistema radicial, como aumento do comprimento específico, comprimento total, superfície de absorção e densidade de raízes no solo (RONDINA *et al.*, 2020). Essa melhoria da arquitetura das raízes resulta em maior capacidade de absorção de nutrientes e água, de forma que as plantas tenham melhores condições de suportar a ocorrência de um estresse hídrico moderado e com isso apresentar maior estabilidade produtiva (HUNGRIA e NOGUEIRA, 2014; CERZINI *et al.*, 2016). Além disso, a coinoculação da soja promove nodulação precoce e mais abundante (CHIBEBA *et al.*, 2015), o que aumenta a capacidade de FBN da cultura e pode contribuir para aumentos de produtividade que podem chegar a 16% (HUNGRIA, NOGUEIRA e ARAUJO, 2015).

A soja coinoculada com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* apresenta um aumento da área foliar e das raízes, com aumento do número de nódulos nas raízes principais e secundárias, resultando em aumento de produtividade (MAURÍCIO FILHO *et al.*, 2018). Portanto, o aprimoramento da tecnologia de inoculação, passando da

inoculação simples para a coinoculação, demonstra a importância da pesquisa contínua sobre o tema, promovendo uma revolução sem precedentes na forma de uso de inoculantes no país, em que uma tecnologia lançada há cerca de 10 anos já é utilizada e cerca de 35% da área de produção de soja do país (ANPII, 2023b).

2.3 MICRORGANISMOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO

Para o controle biológico ou biocontrole, utilizam-se de organismos vivos para controlar outros organismos, por exemplo as pragas e microrganismos patogênicos (STENBERG *et al.*, 2021). Dentre os microrganismos para biocontrole mais utilizados estão bactérias do gênero *Bacillus* e fungos dos gêneros *Trichoderma* e *Beauveria*, dentre outros. A seguir são apresentadas algumas breves considerações sobre estes gêneros de agentes microbiológicos de controle.

2.3.1 *Bacillus*

O gênero *Bacillus* apresenta grande versatilidade em termos de uso como bioinsumo. Pode variar desde promotor de crescimento de plantas pela ação hormonal, melhoria da condição nutricional, ou ainda no biocontrole de pragas e doenças. Por exemplo, isolados da espécie *B. thuringiensis* são amplamente utilizados no controle biológico de Lepidopteras (CHAKRABARTY *et al.*, 2020), enquanto isolados de *B. subtilis*, como as cepas UFTBs 01, UFTBs 02, UFTBs 03, UFTBs 05, UFTBs 06 e UFTBs 07 são capazes de inibir o crescimento micelial dos microrganismos patogênicos *Fusarium subglutinans*, *Curvularia lunata* e *Bipolaris* sp. (BRAGA JUNIOR *et al.*, 2017). Estes microrganismos podem ainda apresentar diferentes funções. Por exemplo, o isolado B44 de *Bacillus* sp. é capaz de inibir o patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, causador de murcha do tomateiro e ao mesmo tempo promover o crescimento das plantas (JANGIR *et al.*, 2018). Os mecanismos empregados por isolados *Bacillus* no biocontrole de patógenos podem ocorrer pela competição por nutrientes, espaço, produção de antibióticos, enzimas hidrolíticas, sideróforos, indução de resistência, entre outros (BENEDUZI e PASSAGLIA, 2012).

Dentre os isolados de bactérias do gênero *Bacillus*, alguns são produtores de enzimas com atividade antimicrobiana, inibindo crescimento e

desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Enzimas hidrolíticas como quitinases, quitosanases, glucanases, celulasas, entre outras, hidrolisam/degradam componentes da parede celular de fungos e bactérias. Alguns isolados são também capazes de produzir sideróforos, que são substâncias orgânicas que quelam o Fe do ambiente, permitindo que seja fornecido ao microrganismo em uma forma solúvel e reduz a disponibilidade deste nutriente para outros microrganismos, inibindo-os pela competição por um nutriente limitante no meio (MILJAKOVIĆ, MARINKOVIĆ e BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, 2020).

Os *Bacillus* e outras rizobactérias, além de induzir resistência sistêmica em plantas, tornando-as mais eficientes em restringir a infecção por patógenos, também agem pela produção de metabólitos como compostos orgânicos voláteis que diminuem ou inibem o crescimento e o desenvolvimento de patógenos (MARTINS *et al.*, 2019). Todas estas características aumentam a capacidade da planta em se defender frente a um patógeno (SINGH, PATHAK e CHOUDHARY, 2016).

2.3.2 *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* compreende fungos de vida livre, pertencentes aos ascomicetos (Filo Ascomycota), possuem conídios de coloração esverdeada, e podem ser encontrados em solos de forma avirulenta associado às raízes de plantas (HARMAN *et al.*, 2004). Sua temperatura ótima de crescimento varia entre 25 a 30 °C e pH entre 5,5 a 7,5 (SINGH *et al.*, 2014). Podem induzir a resistência das plantas a patógenos e competir com estes por nutrientes e espaço. Além desses mecanismos, também pode ocorrer a produção de compostos que reduzem o crescimento de outros fungos por antibiose, produção de antibióticos e micoparasitismo, condição em que coloniza e desintegra diretamente estruturas de fungos fitopatogênicos (SOOD *et al.*, 2020).

Ademais, alguns isolados de fungos deste gênero também atuam como promotores de crescimento em plantas pela produção de fitormônios, solubilização de fostato, assim como a atenuação de estresses bióticos e abióticos, salino, entre outros (FRANÇA *et al.*, 2017; RUBIO *et al.*, 2017).

A espécie *T. harzianum* isolado T-aloe é capaz de proteger a soja contra a podridão do caule causada por esclerotinia (*Sclerotinia sclerotiorum*), o que se dá principalmente pelo micoparasitismo, que inibe o crescimento do fungo fitopatogênico

e a produção de escleródios, além da promoção do crescimento das plantas por aliviar os danos causados pelo estresse ocasionado pelo patógeno (ZHANG *et al.*, 2016).

Ao comparar o efeito de quatro isolados de *Trichoderma*, TSM1 e TSM2 de *T. viride* e 2B2 e 2B22 de *T. harzianum*, mais uma mistura dos quatro isolados sobre a emergência e crescimento de plântulas de camará (*Gochnatia polymorpha*), os dois isolados de *T. harzianum* promoveram o crescimento dessa planta (MACHADO *et al.*, 2015), indicando que provavelmente estes isolados também atuam no estímulo ao crescimento de plantas também pela produção de hormônios vegetais.

2.3.3 *Beauveria*

O gênero *Beauveria* engloba espécies de fungos que apresentam crescimento micelial branco (hialino), com conídios unicelulares, haploides e hidrofóbicos (KESWANI, SINGH e SINGH, 2013). A temperatura ótima de crescimento está entre 25 e 28 °C (FARGUES *et al.*, 1997), enquanto o pH ideal apresenta ampla variação, entre 5 e 13 (PADMAVATHI, DEVI e RAO, 2003). *Beauveria* constitui um gênero predominantemente de fungos entomopatogênicos, capazes de parasitar alguns insetos e aracnídeos, nos quais penetra diretamente através da cutícula do hospedeiro, coloniza e se multiplica, levando-o à morte (MASCARIN e JARONSKI, 2016). Ao adentrar o hospedeiro, o fungo produz metabólitos secundários (toxinas) como, beauvericina, bassianina, bassianolida, tenelina, ácido oxálico, dentre outros, que auxiliam o parasitismo e morte do hospedeiro (WANG *et al.*, 2021).

Este fungo é capaz de realizar endofitismo em diversas espécies vegetais, como o tomate (*Lycopersicon esculentum*), diminuindo simultaneamente a ocorrência de pragas como *Macrosiphum euphorbiae* e doenças causadas por *Botrytis cinerea* e *Alternaria alternata*. Além da habilidade de atenuar estresses bióticos, o isolado Bb716 de *Beauveria bassiana* ainda auxilia no crescimento das plantas (SINNO *et al.*, 2021).

2.4 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE BIOINSUMOS

A produção de bioinsumos na indústria é um processo especializado que requer mão de obra capacitada, condições ideais de assepsia, instalações e equipamentos adequados para o processo de fabricação de produtos microbiológicos,

com controle rigoroso de qualidade para assegurar pureza, concentração e a identidade do microrganismo de interesse.

O mercado brasileiro comercializa mais de 130 milhões de doses de inoculantes anualmente, a maioria destinada à cultura da soja (80%) (ANPII, 2023a). Entretanto, com a recomendação de uso de inoculantes à base de *Azospirillum brasilense* para gramíneas e para a coinoculação de soja e feijoeiro, a participação de inoculantes à base desses microrganismos no mercado já ultrapassa 12% atualmente (HUNGRIA e NOGUEIRA, 2022).

Mais recentemente, novos inoculantes à base de *Bacillus* para mobilização de fosfatos (GOMES *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SOUSA *et al.*, 2021; VELLOSO *et al.*, 2020) e tolerância à seca (KAVAMURA *et al.*, 2013) foram lançados e vêm ganhando espaço no mercado. Inoculantes para culturas como a cana de açúcar e pastagens, à base de isolados elite de *Azospirillum*, *Nitrospirillum* e/ou *P. fluorescens* também fazem parte deste mercado em expansão (SANTOS, NOGUEIRA e HUNGRIA, 2019).

A eficiência do inoculante não depende apenas da estirpe de microrganismo que contém, mas também de uma formulação adequada para manter a viabilidade dos microrganismos até o momento do uso, além dos cuidados com a inoculação, como a compatibilidade com produtos químicos ou mesmo entre produtos biológicos. A inoculação pode ser realizada de diferentes formas, como via sementes, sulco de semeadura, ou mesmo foliar, dependendo do inoculante e da cultura, bem como dos recursos que o agricultor dispõe em termos de equipamentos e mão de obra (SANTOS, NOGUEIRA e HUNGRIA, 2019).

A produção de inoculantes no Brasil é regulamentada pelo MAPA, pela instrução normativa (IN) nº13 de 2011 (BRASIL, 2011) e seus anexos, IN nº 30 de 2010 (BRASIL, 2010) e IN nº 53 de 2013 (BRASIL, 2013). Estas IN definem as estirpes recomendadas ou autorizadas para uso em inoculantes, como devem ser realizados o registro, informações da embalagem e rotulagem dos produtos à base dos microrganismos e que possuam reconhecida eficiência agrônômica e ausência de contaminantes na diluição 1×10^{-5} , autorização de comercialização, armazenamento, análises laboratoriais de controle de qualidade, entre outras adequações.

A IN nº 13 estabelece que a concentração mínima de células no inoculante à base de bactérias fixadoras de nitrogênio que fazem simbiose com soja deve ser 1×10^9 UFC/mL ou g (unidades formadoras de colônia) até a data de

vencimento especificada no rótulo, que deve ser de no mínimo seis meses após a fabricação. Já para o *Rhizobium* sp., a concentração mínima deve ser de 1×10^8 UFC/mL ou g até a data de vencimento, enquanto para os demais microrganismos a concentração de garantia deve ser a informada pelo fabricante no registro do produto, ou ainda pela recomendação emitida por órgão de pesquisa oficial ou credenciado pelo MAPA (BRASIL, 2011).

Por sua vez, a IN nº 30 de 12 de novembro de 2010 regulamenta como deve ser realizado o controle de qualidade da produção comercial inoculantes (BRASIL, 2010). Essas regulamentações têm contribuído para a produção de inoculantes de alta qualidade no país, com grandes contribuições para o agronegócio brasileiro (HUNGRIA e NOGUEIRA, 2014).

Para os produtos utilizados para controle biológico, a Portaria Conjunta SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA Nº 1, de 10 de abril de 2023, orienta como deve ser realizado o registro destes produtos, todas as avaliações que devem ser realizadas, e o que deve conter no rótulo e bula, como aspecto físico-químico do produto, espécie contida, concentração, culturas testadas, dentre outros (MAPA, 2023). Em 2012 havia 135 produtos registrados para biocontrole, já em 2020 o número de registros aumentou para 411 produtos (BETTIOL *et al.*, 2012; MAPA, 2021). Em junho de 2024, o aplicativo Bioinsumos (<https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/7227/aplicativo-bioinsumos>) indicava mais de 600 para biocontrole registrados no MAPA. Esta evolução é resultado do aumento do interesse por insumos biológicos para controle de pragas e doenças, uma tendência não apenas brasileira, mas mundial.

2.5 PRODUÇÃO ON FARM DE BIOINSUMOS

Recentemente, alguns produtores têm buscado realizar a produção de bioinsumos nas propriedades, sob o argumento de diminuição dos custos de produção. Entretanto, na maioria dos casos, a produção é realizada em estruturas rudimentares, chamadas de produções *on farm* (CASTRO e ARAÚJO, 2018), o que pode comprometer a qualidade do produto final (BOCATTI *et al.*, 2022).

Na produção *on farm*, os próprios produtores tentam fabricar seus bioprodutos para biocontrole e inoculantes, alguns em estruturas rudimentares como caixas d'água, ou mesmo fermentadores mais elaborados, mas, em geral, sem

assegurar o controle da qualidade adequado. Os meios de cultura para a produção são geralmente fornecidos por terceiros, ou às vezes são subprodutos encontrados na propriedade, sem levar em conta as exigências nutricionais específicas e o metabolismo de cada microrganismo, que frequentemente são misturados para crescer em um mesmo fermentador. A fonte de inóculo inicial pode ser obtida de bancos de germoplasma ou de fornecedores de inóculos, a partir de microrganismos com especificação de referência, ou mesmo produtos comerciais (SANTOS, DINNAS e FEITOZA, 2020). Entretanto, independentemente do tipo de microrganismo alvo, se inoculantes ou para biocontrole, ocorre alto nível de contaminação por microrganismos não alvo, alguns dos quais com potencial patogênico a humanos (BOCATTI *et al.*, 2022), o que compromete a qualidade do produto final do ponto de vista não apenas agrônomo, mas também sanitário.

A contaminação por microrganismos indesejados é frequente, por não haver um controle adequado do processo de produção, principalmente devido a condições inadequadas de assepsia (SANTOS, DINNAS e FEITOZA, 2020). Na grande maioria dos casos, não existe controle de qualidade para se conhecer a ocorrência de microrganismos contaminantes e nem a concentração e a identidade dos microrganismos alvo (CASTRO e ARAÚJO, 2018).

Dessa forma, os produtores consideram estar economizando na tentativa de fabricar seus próprios insumos biológicos, mas na maioria dos casos acabam prejudicados, pois os microrganismos de interesse podem não estar presentes ou estar em concentrações muito aquém das necessárias para promover o efeito esperado (CASTRO; ARAÚJO, 2018), além do risco sanitário pela presença de microrganismos potencialmente patogênicos ao homem no produto final (BOCATTI *et al.*, 2022).

A qualidade microbiológica de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistemas *on farm* foi avaliada em amostras de biofábricas *on farm* no estado de Goiás. Todas as amostras estavam contaminadas com diferentes microrganismos e o produto foi considerado inadequado para uso nas lavouras, pois apresentava risco de contaminação a humanos e animais devido ao alto índice de contaminação com microrganismos potencialmente patogênicos, além de a bactéria alvo, quando presente, não apresentar o cristal da proteína ativa contra as pragas (VALICENTE, 2018).

Não raro, a contaminação das amostras desses tipos de produção de

bioinsumos chega a 100%, incluindo coliformes totais, coliformes termotolerantes e presença de *Salmonella*, o que reforça o risco à saúde humana, além de acarretar baixa ou nenhuma eficiência agrônômica do produto final (SANTOS *et al.*, 2020).

Os microrganismos conseguem, por diferentes mecanismos, resistir aos agentes antimicrobianos, como por exemplo, pela ação de enzimas que modificam a molécula do agente ativo (WILSON, 2014), sua destruição por lise enzimática (D’COSTA *et al.*, 2011), modificando os transportadores de membrana para evitar que o agente ativo entre na célula, entre outros (FALAGAS *et al.*, 2019). A análise de 18 amostras de inoculantes produzidos *on farm*, cujo objetivo era multiplicar *Bradyrhizobium* ou *Azospirillum*, revelou alta contaminação do produto final. Entre os cerca de 80 morfotipos de microrganismos encontrados nas amostras, 34 eram de espécies com potencial patogênico para humanos, vários apresentando resistência a antibióticos, o que aumenta ainda mais o risco sanitário (BOCATTI *et al.*, 2022). A disseminação de genes de resistência a antibióticos no ambiente é de particular importância sanitária, pois microrganismos suscetíveis a determinados antibióticos podem se tornar resistentes pela obtenção de genes de resistência mantidos por outros microrganismos no ambiente, por transferência horizontal, o que dificulta cada vez mais o combate a infecções (MUNITA e ARIAS, 2016).

2.6 MÉTODOS PARA O ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS

2.6.1 Métodos Baseados em Cultivo

Os microrganismos cultiváveis isolados do ambiente podem ter várias aplicações práticas. Originam produtos à base de metabólitos secundários para uso medicinal, agrícola e industrial, como o caso de antibióticos, além dos microrganismos empregados na agricultura, como inoculantes e para o controle biológico de pragas e doenças. Entretanto, sua aplicação depende da capacidade de crescimento em meios artificiais (OLIVEIRA *et al.*, 2006), o que é exceção entre os microrganismos, visto que a grande maioria não é cultivável. Devido às suas características e exigências metabólicas, estima-se que apenas de 1 a 10% dos microrganismos existentes no ambiente consigam ser isolados e multiplicados em meios de cultura artificiais (BORNEMAN *et al.*, 1996), enquanto a imensa maioria não é cultivável, ou seja, não

podem ser multiplicados em condições artificiais de cultivo em meio de cultura em laboratório.

Os métodos clássicos para o isolamento de microrganismos são baseados em cultivo em meio de cultura e utilizam diluição seriada para individualizar colônias que, teoricamente, são provenientes de uma única célula (HERIGSTAD, HAMILTON e HEERSINK, 2001). Após a diluição, uma alíquota é transferida para o meio de cultura específico e é espalhada uniformemente com o auxílio de uma alça, geralmente em duplicatas ou triplicatas (JETT *et al.*, 2018). As placas são incubadas por determinado tempo em temperatura pré-estabelecida, e as colônias formadas são contadas para se estimar a concentração de células na amostra (ANNUNZIO *et al.*, 2019).

Esse procedimento é geralmente empregado para o controle de qualidade da produção de insumos biológicos (PACE, 1986; FERREIRA *et al.*, 2024). Entretanto, uma das limitações do método é que o meio de cultura pode não ser adequado para o crescimento de outros microrganismos contaminantes que estejam na amostra, pois estes podem ter exigências nutricionais diferentes. Por isso, métodos independentes de cultivo podem ser mais adequados para se conhecer a diversidade microbiana em amostras contendo comunidades microbianas complexas (BULL; WARD e GOODFELLOW, 2000).

2.6.2 Métodos Moleculares Independentes de Cultivo

Para a identificação e o posicionamento taxonômico de um microrganismo, os primeiros estudos dependiam do isolamento e cultivo do microrganismo para estudo de sua fisiologia, morfologia celular, de colônia, etc. Na década de 1970, com o surgimento das primeiras técnicas de sequenciamento de DNA, foi sugerido o sequenciamento de genes que codificam para o RNA ribossomal como marcadores moleculares para classificação e posicionamento taxonômico de microrganismos (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977; WOESE e FOX, 1977). A análise da sequência do gene ribossomal 16S RNAr, que se encontra em uma região conservada do gene, permitiu melhorias no estudo e classificação taxonômica de bactérias (JANDA e ABBOTT, 2007), mas este método também depende do isolamento de microrganismos em culturas puras. Além disso, as funções metabólicas e a ecologia dos microrganismos ainda não podem ser avaliadas por este método

(ESCOBAR-ZEPEDA, LEÓN, e SANCHEZ-FLORES, 2015). Outro problema é que os resultados do sequenciamento do gene 16S RNAr são limitados e permitem um posicionamento taxonômico apenas até o nível de filo a gênero. Portanto, sua capacidade de identificar espécies bacterianas é limitada (SANTOS-MARCOS *et al.*, 2019). Assim, este método pode ser utilizado apenas para identificação inicial de bactérias (CLARRIDGE, 2004), tendo sido usado como método auxiliar para reclassificar microrganismos que foram classificados de forma incongruente pelos métodos convencionais (PETTI, POLAGE e SCHRECKENBERGER, 2005), entre outras aplicações.

A partir de 1980, foram desenvolvidas as primeiras técnicas moleculares independentes de cultivo para análise da diversidade microbiana em amostras ambientais a partir da extração do DNA genômico total (SILVEIRA, 2004). Dentre essas técnicas, a metagenômica permite analisar a diversidade genética em uma comunidade microbiana complexa com base no DNA total extraído diretamente da amostra, sem a necessidade de cultivo dos microrganismos em meios artificiais, o que supera o problema de limitação de crescimento nessas condições e permite detectar o(s) gene(s) do(s) microrganismo(s) no seu ambiente de crescimento (HANDELSMAN, 2005; PARAGES *et al.*, 2016; NGARA e ZHANG, 2018).

Essa técnica permite avaliar não apenas a diversidade taxonômica de microrganismos, mas também sua diversidade funcional no ambiente onde estão, seja em amostras de solo ou água, seja em amostras de alimentos ou de produtos biológicos (SCHMEISSER, STEELE e STREIT, 2007). Portanto, essa técnica também é aplicável para a análise da qualidade microbiológica de amostras de bioinsumos.

O sequenciamento em *shotgun* rompe as moléculas de DNA presentes nas amostras em pequenos fragmentos, as sequencia e, ao término do sequenciamento, é possível, com auxílio de programas de bioinformática, juntar estes pequenos fragmentos e obter os *contigs*, que são conjuntos de leituras sobrepostas que, quando agrupadas, formam uma sequência de DNA maior, possibilitando reconstruir a sequência de DNA fragmentado de uma dada espécie presente na amostra (MIGUEL e VIEIRA, 2017).

A tecnologia utilizada para a realização da análise por metagenoma a partir do sequenciamento do DNA total extraído de uma amostra é reconhecida por ter alto rendimento e gerar alta quantidade de informações genéticas (HIRAOKA, YANG e IWASAKI, 2016; SHARON *et al.*, 2013). O método é utilizado para estudos

na agricultura (CARBONETTO *et al.*, 2014) e na saúde humana, entre outros (SAXENA e SHARMA, 2016).

O metagenoma é uma tecnologia que pode ser ainda aplicada para estudar microrganismos extremófilos, que habitam ambientes com temperaturas extremas, alta salinidade, alta concentração de metais, dentre outros. A partir desta tecnologia concluiu-se que os microrganismos extremófilos possuem genes que codificam proteínas de interesse para a biotecnologia, como celulasas e genes envolvidos com a capacidade desses microrganismos de sobreviverem em condições extremas (MIRETE, MORGANTE e GONZÁLEZ-PASTOR, 2016), o que permite aplicações biotecnológicas.

Assim, como as produções de bioinsumos *on farm* podem formar comunidades microbianas consideradas complexas, devido à alta frequência de contaminação (BOCATTI *et al.*, 2023), métodos de avaliação da diversidade de microrganismos nestas amostras com base na abordagem metagenômica podem trazer mais informações quanto à diversidade de microrganismos presentes do que os métodos clássicos baseados em cultivo em meios de cultura. Além disso, permite fazer um estudo de outros genes de interesse na amostra, como genes funcionais e genes relacionados à resistência a antimicrobianos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM E LOCAL DAS ANÁLISES

Com o objetivo de analisar a qualidade microbiológica de bioinsumos produzidos *on farm*, foi realizada uma divulgação do estudo para os produtores via e-mail e redes sociais com o intuito de incentivar produtores e técnicos a fornecerem amostras para o estudo e, ao mesmo tempo, conhecerem a sua qualidade microbiológica do que está sendo produzido. Ao longo de 18 meses, foram obtidas 22 amostras provenientes dos estados de Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Piauí e Mato Grosso. Para a coleta, foram enviados kits de amostragem, contendo três tubos estéreis do tipo “Falcon” de 50 mL, pipetas descartáveis esterilizadas para a coleta, gelo reutilizável para a preservação das amostras no transporte, luvas descartáveis, fitas Parafilm® para vedação dos tubos após a coleta, instruções de coleta e caixa de isopor para envio das amostras (Figura 1).

Figura 1- Aspecto geral do kit de coleta das amostras de bioinsumos produzidos *on farm* para análise da qualidade microbiológica.



Fonte: Bocatti, 2018.

De acordo com as instruções de coleta, mediante o auxílio de uma pipeta estéril descartável, uma alíquota do meio de crescimento foi retirada do tanque de produção ou de sua saída e transferida para dois tubos “Falcon” até completar um volume de 30 mL cada. Posteriormente, os tubos foram identificados e vedados com a fita Parafilm® e as amostras acondicionadas em caixa de isopor com gelo reutilizável

e encaminhadas para o Laboratório de Biotecnologia do Solo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Soja, Londrina, PR (Embrapa Soja), para a realização das análises.

Os gêneros dos microrganismos alvo das multiplicações utilizadas no estudo foram: *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Priestia*, e os fungos *Beauveria* e *Trichoderma* (Tabela1).

Além das amostras coletadas nas propriedades rurais, foi preparado no laboratório um mix contendo cinco microrganismos: *A. brasilense*, *B. diazoefficiens*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas brassicacearum* e *Rhizobium tropici* visando verificar a eficiência da extração de DNA, sequenciamento metagenômico e análise de bioinformática, como controle positivo.

Tabela 1- Microrganismos(s) alvo(s) da produção *on farm*, conforme declarado no formulário de envio e estado de origem.

Amostra	Microrganismos Alvo	Estado de Origem
Controle positivo	<i>Azospirillum brasilense, Bradyrhizobium diazoefficiens, Bacillus pumilus, Pseudomonas brassicacearum e Rhizobium tropici</i>	-
1	<i>Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis, Bradyrhizobium, Azospirillum</i>	PI
2	<i>Bradyrhizobium, Azospirillum, Metarhizium, Trichoderma, Chromobacterium, Paecilomyces, B. subtilis, Priestia megaterium, Pochonia sp.</i>	MT
3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	PI
4	<i>A. brasilense</i>	PI
5	<i>B. subtilis, Bacillus thuringiensis</i>	PR
6	<i>B. subtilis, B. thuringiensis</i>	PR
7	<i>B. subtilis</i>	SC
8	<i>B. thuringiensis</i>	SC
9	<i>Priestia aryabhattai</i>	GO
10	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	GO
11	<i>P. fluorescens, P. aryabhattai</i>	GO
12	<i>B. subtilis, P. megaterium</i>	GO
13	<i>Beauveria bassiana</i>	GO
14	<i>Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus e Saccharomyces cerevisiae</i>	PR
15	<i>P. megaterium</i>	SC
16	<i>P. aryabhattai</i>	SC
17	<i>P. megaterium</i>	PR
18	<i>B. subtilis</i>	PR
19	<i>P. aryabhattai</i>	PR
20	<i>P. fluorescens</i>	PR
21	<i>B. subtilis, P. megaterium</i>	MG
22	<i>Trichoderma harzianum</i>	MG

Nota: as amostras do mesmo estado não são necessariamente da mesma propriedade.

3.2 PH E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS CULTIVOS

Em câmara de fluxo laminar, retirou-se uma alíquota de 15 mL para a caracterização do pH com o potenciômetro FiveEasy Plus FP20 (Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Zurique, Suíça) e da condutividade elétrica, com o condutivímetro digital MB-11P (TECNAL, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Os valores obtidos foram anotados e tabelados para a caracterização das amostras.

3.3 DILUIÇÃO SERIADA E PLAQUEAMENTO EM MEIOS DE CULTURA

Com base na IN 30 do MAPA de 2010 (BRASIL, 2010), que descreve como deve ser feito o controle de qualidade da produção comercial de inoculantes, foram realizadas as diluições seriadas e os plaqueamentos. Os inoculantes foram plaqueados em meios específicos para os microrganismos, conforme o microrganismo alvo indicado. O meio de cultura *Ágar Rojo Congo* (RC) foi utilizado para *Azospirillum* e *Yeast Mannitol Agar* (YMA) para as amostras para *Bradyrhizobium* como microrganismo alvo. O meio *Ágar Triptona de Soja* (TSA) foi empregado para o crescimento de *Bacillus*, o meio King B foi empregado para *Pseudomonas* e *Batata Dextrose Ágar* (BDA) para fungos *Beauveria* e *Trichoderma*.

Em câmara de fluxo laminar, as amostras foram homogeneizadas por 20 s em agitador de tubos, retirando-se uma alíquota de 1 mL, que foi suspensa em um tubo contendo 9 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%), obtendo-se a primeira diluição de 10^{-1} . A partir desta diluição foram feitas novas diluições, em mais 6 tubos consecutivos com 9 mL de solução fisiológica estéril que recebeu 1 mL da suspensão anterior, até obter a diluição 10^{-7} . Para cada amostra, as séries de diluições foram realizadas em duplicata.

Figura 2- Imagem ilustrativa de uma diluição seriada e plaqueamento a partir da amostra do bioinsumo produzido *on farm*, até a diluição de 10^{-7} em solução salina a 0,85% estéril.

As placas foram incubadas a 28 ± 1 °C no escuro, na posição invertida para a verificação da ocorrência de colônias características dos microrganismos alvo. Com o intuito de diminuir a formação de colônias de microrganismos contaminantes, os meios YMA e RC foram acrescidos de vancomicina (antibiótico) e actidione (antifúngico).

As contagens das colônias foram realizadas no primeiro, quinto e sétimo dia de incubação. Para as amostras que continham *Bacillus* e *Pseudomonas* como microrganismos alvo, a verificação da formação de colônias típicas ocorreu após um dia de incubação; o aparecimento de colônias de microrganismos contaminantes também ocorreu dentro de um dia em todos os meios de cultura. Para as amostras que continham *Azospirillum*, nova verificação foi feita no quinto dia, enquanto as que tinham *Bradyrhizobium* e fungos como organismos alvo foram reavaliadas no sétimo dia, visto que são microrganismos de crescimento lento.

3.4 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE RIBOSSOMAL 16S RNAR DOS ISOLADOS OBTIDOS EM MEIO DE CULTURA

Para realizar o sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S RNAr foram selecionadas as colônias que apresentavam morfologia similar às dos microrganismos alvo e as colônias atípicas predominantes nos meios de cultura em placas de Petri, suspeitas de serem contaminantes.

Após a seleção, cada colônia foi repicada por estriamento no respectivo meio de cultura para a obtenção de colônias puras isoladas. Depois do crescimento, as colônias foram inoculadas em frascos contendo aproximadamente 10 mL do respectivo meio de cultura líquido e incubadas a 28 °C sob agitação a 100 rpm em incubadora SL-223 (SOLAB, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil). Após o crescimento das bactérias nos meios líquidos, representado pela turbidez no meio de cultura, foi realizada a extração do DNA genômico com o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha).

O gene ribossomal 16S RNAr foi amplificado com o uso dos primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991), com um mix contendo tampão PCR 10x (Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (1,5 mM de cada nucleotídeo), enzima Taq DNA polimerase (1,2 U), DNA (fita molde) e água purificada, para um total de 50

μ L de mix de reação, que foi levado para o termociclador ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Os ciclos de amplificação, compreenderam um ciclo inicial de desnaturação (95 °C) por 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação (94 °C) por 15 s, 93 °C por 45 s, ciclo de anelamento a 55 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min e um ciclo final de extensão (72 °C) por 5 min (MENNA *et al.*, 2006).

A purificação dos produtos da PCR foi realizada com o kit PureLink Quick PCR Purification (Invitrogen, Paneriai, Vilnius, Lituânia). Ao término de cada uma das etapas, o produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1% para verificação do procedimento de amplificação. Constatado o amplicon correspondente e a pureza da amostra, estas foram submetidas ao sequenciamento no sequenciador ABI3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, California, Estados Unidos) para posicionamento taxonômico a nível de gênero pelo sequenciamento parcial do gene 16S RNAr usando o primer 27F (LANE *et al.*, 1985), conforme o procedimento descrito por Menna *et al.* (2006), com modificações (Delamuta *et al.*, 2017). As sequências foram analisadas usando o software Bionumerics versão 7.6 e o resultado foi comparado com as sequências depositadas no banco de dados NCBI – National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a partir da ferramenta BLAST.

3.5 ABORDAGEM METAGENÔMICA

A análise metagenômica foi realizada nas 22 amostras para verificar a diversidade de microrganismos presentes em cada uma. A extração do DNA total das amostras foi realizada com o kit PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio, Califórnia, Estados Unidos), segundo as recomendações do fabricante. Os DNAs extraídos foram usados para a construção da biblioteca, usando o kit Nextera XT (Califórnia, Estados Unidos), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, a biblioteca genômica foi sequenciada no sequenciador NextSeq 1000, plataforma Illumina (Estados Unidos, Califórnia), no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja.

A análise das leituras (*reads*) geradas pelo sequenciamento foram pré-processadas utilizando o programa Fastp 0.23.4. Este programa realiza a filtragem e o controle de qualidade nos arquivos fastq. O pré-processamento ocorreu da seguinte forma: 1) remoção de duplicatas e; 2) os dez primeiros e dez últimos nucleotídeos de

cada leitura foram removidos. Na segunda etapa, as leituras com comprimento total ≤ 20 nucleotídeos e as leituras de baixa qualidade com índice de qualidade Phred ≤ 20 foram removidas. Finalmente, sequências com baixa complexidade e leituras contendo mais de 5 N (cinco bases nitrogenadas sem definição) para cada leitura foram removidas (CHEN *et al.*, 2018).

Para obter estimativas de abundância relativa em cada sequência, as leituras processadas foram mapeadas usando genes marcadores específicos de taxonomia microbiana com MetaPhlAn 4.0.6 (BLANCO-MÍGUEZ *et al.*, 2023). Todo o pipeline MetaPhlAn (Metagenomic Phylogenetic Analysis) foi executado usando o banco de dados de referência `mpa_vOct22_CHOCOPhlAnSGB_202212` (http://cmprod1.cibio.unitn.it/biobakery4/metaphlan_databases/).

Com o intuito de confirmar os resultados do MetaPhlAn, as leituras de amostras das espécies de menor e maior abundância, e os microrganismos alvo foram alinhadas com seus genomas de referência usando Bowtie2 v. 2.3.2 (LANGMEAD e SALZBERG, 2012). Foram utilizados dois métodos para permitir a comparação da abundância relativa. As figuras foram elaboradas em R (R Core Team, 2022) e finalizadas em CorelDraw.

As amostras processadas foram submetidas ao software MetaSpades 4.0.6 para montagem metagenômica. Nessa etapa, os *reads* são sobrepostos nos pontos de complementaridade, formando *contigs*, que são sequências mais extensas (NURK *et al.*, 2017). Posteriormente, esses *contigs* foram analisados para a detecção de genes de resistência a antimicrobianos, utilizando o Resfinder FG 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinderFG/>). Este recurso concentra-se em genes de resistência a antibióticos (GRAs), predominantemente de origem bacteriana cultivável e patogênica, e opera através de metagenômica funcional (GSCHWIND *et al.*, 2023).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE BIOINSUMOS PRODUZIDOS *ON FARM*

As 22 amostras recebidas apresentaram pH entre 2,9 (amostra 5) e 6,8 (amostra 8), sendo que 15 amostras apresentaram pH menor que 5,0. Já a condutividade elétrica estava entre 152 (amostra 2) e 10.830 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (amostra 17). Valores altos de condutividade elétrica indicam alta salinidade dos meios de cultivo, o que também é desfavorável para o crescimento dos microrganismos de interesse (Tabela 2).

Tabela 2- pH e condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) de amostras de bioinsumos produzidos *on farm*, provenientes de diferentes regiões do Brasil.

Amostra	Estado de Origem	pH	Condutividade Elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
1	PI	5,0	4.075
2	MT	4,0	152
3	PI	5,3	3.369
4	PI	6,7	2.760
5	PR	2,9	1.625
6	PR	3,3	3.058
7	SC	6,4	2.601
8	SC	6,8	2.405
9	GO	3,3	10.450
10	GO	6,5	5.839
11	GO	3,9	9.081
12	GO	5,7	4.516
13	GO	4,2	8.199
14	PR	3,0	4.393
15	SC	3,5	10.050
16	SC	3,2	5.691
17	PR	3,8	10.830
18	PR	4,3	7.206
19	PR	4,3	6.283
20	PR	3,6	6.189
21	MG	3,3	668,5
22	MG	4,6	1.552

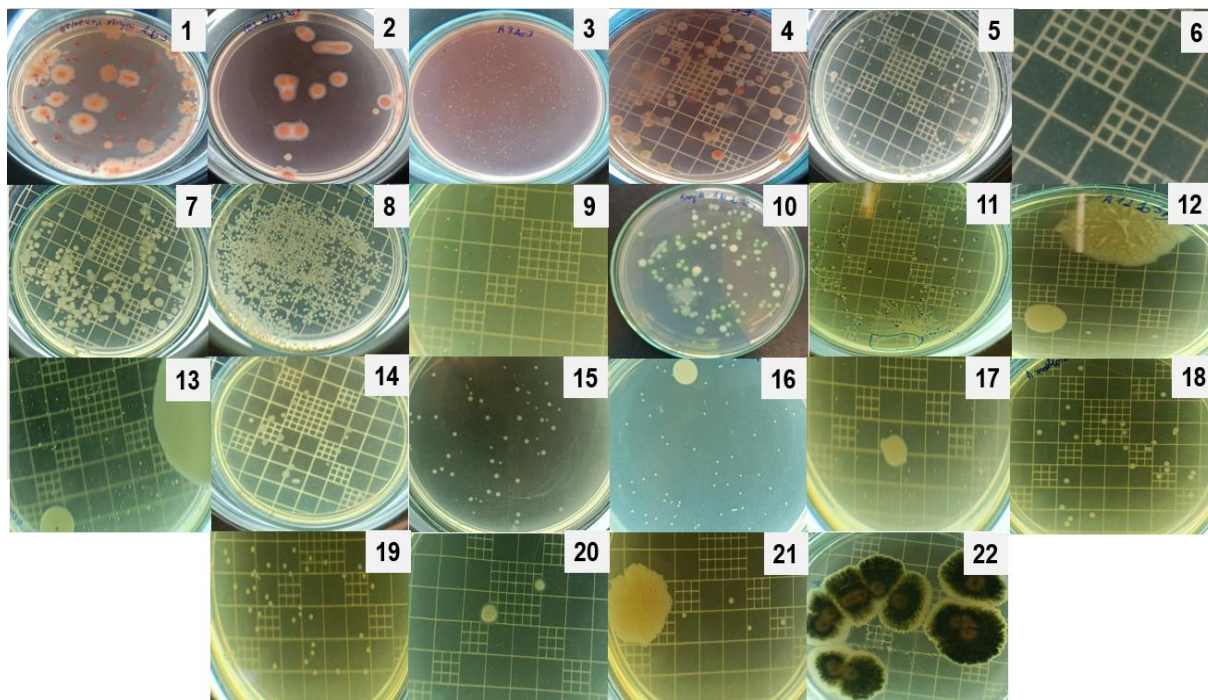
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR A NÍVEL DE GÊNERO DOS ISOLADOS OBTIDOS NOS MEIOS DE CULTURA

O crescimento microbiano foi observado nos meios de cultura em placas de Petri no primeiro, quinto e sétimo dia de incubação. As amostras 3, 5, 6 e 14 não apresentaram colônias nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} e por isso a análise foi repetida utilizando o inóculo sem diluição nas amostras 5, 6 e 14, e mesmo assim resultou em um número baixo de colônias. A amostra 3 foi plaqueada nas diluições 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} . Nota-se que as colônias são de difícil visualização, pois muitas eram pequenas, com diâmetro menor que 2 mm, na amostra 3, 6 e 9 (Figura 3).

As imagens das amostras plaqueadas em seus respectivos meios de cultura, dependendo do microrganismo alvo nos meios RC e YMA, indicam colônias com diferentes morfologias e diferentes concentrações. Algumas placas demonstraram maior variedade de colônias do que outras, dependendo da origem. Não foram observadas colônias típicas dos microrganismos alvo nas placas contendo os meios de cultivo de RC e YMA, *Azospirillum* e *Bradyrhizobium*, respectivamente. Alguns microrganismos alvo foram encontrados em seus respectivos meios, como *Pseudomonas*, *Trichoderma* e *Bacillus*, porém em baixas concentrações. Ademais, o gênero *Bacillus* também foi encontrado em outros meios de culturas como contaminantes. Algumas placas apresentaram crescimento muito baixo, mesmo com o plaqueamento da amostra com baixa ou sem diluição (amostras 3, 5, 6 e 14) (Figura 3).

As colônias mais frequentemente observadas nos meios de cultura foram isoladas para purificação, totalizando 79 morfotipos (Tabela 3). O DNA genômico dos morfotipos bacterianos a partir de colônias isoladas das amostras foi extraído e o gene ribossomal 16S amplificado para sequenciamento parcial. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do NCBI. Para as amostras cujos microrganismos alvo eram fungos, não foi realizado sequenciamento parcial, apenas foi realizada a verificação morfológica no meio de cultura, como no caso do fungo *Trichoderma* da amostra 22 (Figura 3).

Figura 3- Aspecto visual de placas de Petri contendo meios de cultivo específicos, de acordo com o microrganismo alvo. O número na imagem representa a amostra, na diluição 10^{-5} , exceto amostra 3 na diluição 10^{-3} e as amostras 5, 6 e 14 sem diluição.



Fonte: Próprio autor, 2023.

O sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S indicou que dentre os microrganismos alvo, o gênero mais frequentemente observado foi *Bacillus*, que além de ser isolado no meio TSA (meio ideal para seu crescimento), também foi encontrado em outros meios de cultivo em amostras em que não era o microrganismo alvo. O gênero *Pseudomonas* também foi encontrado em algumas amostras em que era o microrganismo alvo, enquanto os demais gêneros alvo não foram encontrados no sequenciamento parcial do gene ribossomal extraído de colônias isoladas, indicando baixa ocorrência ou ausência na amostra.

Tabela 3- Morfotipos de colônias que apresentaram crescimento nos respectivos meios de cultura em placas de Petri, selecionados para o sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S para indicação do gênero, com base na comparação com o banco de dados de genes ribossomais do NCBI e a respectiva concentração na amostra.

Amostra	Morfotipos de colônias	Meio de cultura	Indicação do Gênero	UFC/mL gênero alvo
1	4	TSA	<i>Bacillus</i>	$1,6 \times 10^7$
	6	RC e YMA	<i>Bacillus</i>	
	1		<i>Brevibacillus</i>	
	1		<i>Caldibacillus</i>	
2	1	TSA	<i>Gluconacetobacter</i>	$4,3 \times 10^5$
	2		<i>Bacillus</i>	
	2	RC	<i>Gluconacetobacter</i>	
	1		<i>Lactococcus</i>	
	1	YMA	<i>Lactococcus</i>	
	1		<i>Bacillus</i>	
1	<i>Gluconacetobacter</i>			
	1		<i>Paraburkholderia</i>	
3	1	YMA	<i>Acinetobacter</i>	
	1		<i>Escherichia</i>	
	1		<i>Acinetobacter</i>	
4	3	RC	<i>Acinetobacter</i>	
	1		<i>Alcaligenes</i>	
	1		<i>Ochrobactrum</i>	
5	3	TSA	<i>Bacillus</i>	80
6	2	TSA	<i>Lactocaseibacillus</i>	
7	1	TSA	<i>Citrobacter</i>	$2,1 \times 10^8$
	1		<i>Bacillus</i>	
8	1	TSA	<i>Acinetobacter</i>	
	1		<i>Citrobacter</i>	
	1		<i>Acinetobacter</i>	
9	3	TSA	<i>Lactiplantibacillus</i>	
10	1	TSA	<i>Morganella</i>	$3,1 \times 10^7$
	1		<i>Klebsiella</i>	
	1		<i>Pseudomonas</i>	
	1		<i>Escherichia</i>	
11	2	TSA	<i>Paenibacillus</i>	
	2		<i>Lactiplantibacillus</i>	
12	3	TSA	<i>Bacillus</i>	$7,0 \times 10^6$
	1		<i>Brevibacillus</i>	
	1		<i>Lysinibacillus</i>	

Continua...

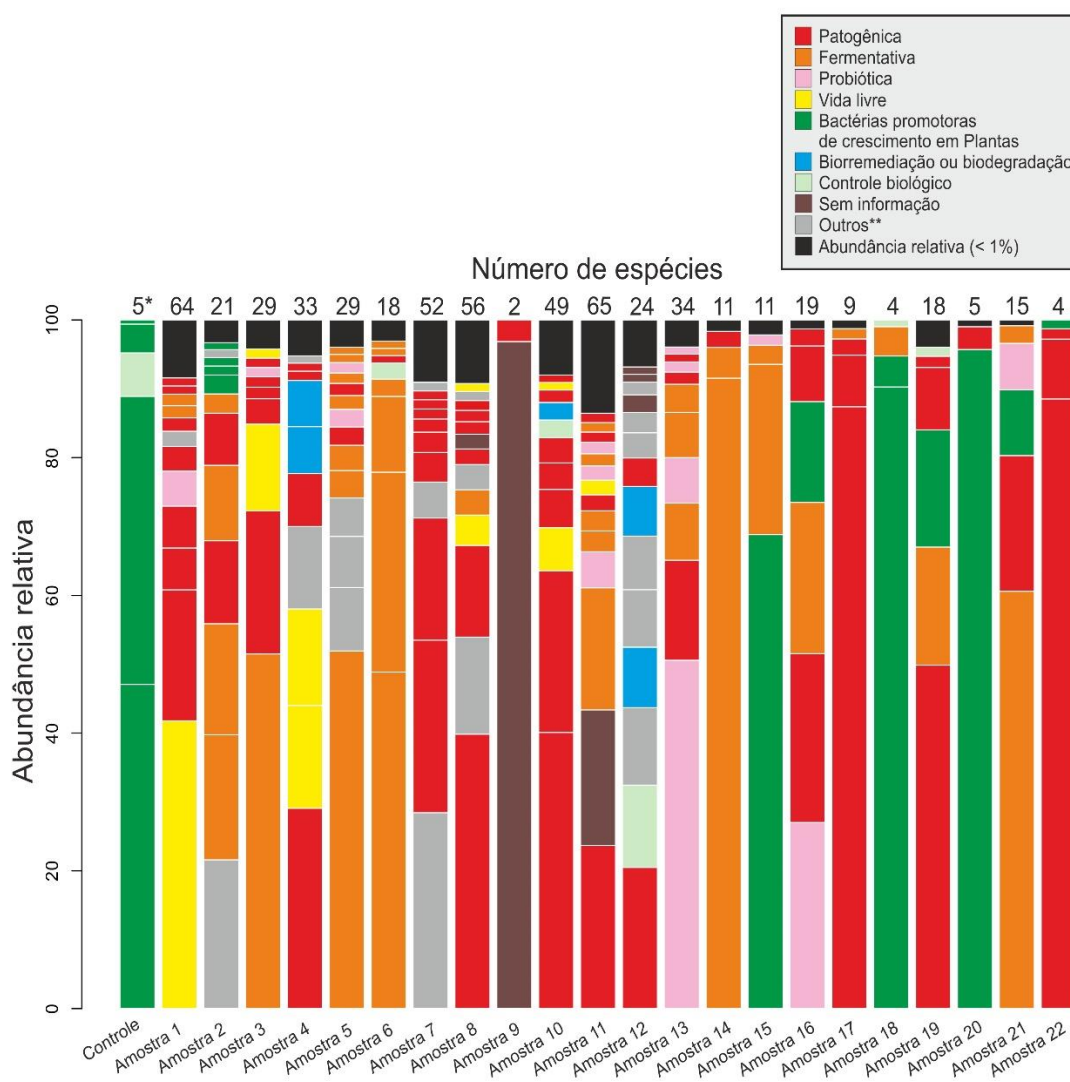
Tabela 3- Continuação...

Amostra	Morfotipos de colônias	Meio de cultura	Indicação do Gênero	UFC/mL gênero alvo
13	1 1	BDA	<i>Levilactobacillus</i> <i>Lacticaseibacillus</i>	
14	2	TSA	<i>Bacillus</i>	23
15	1 1 1	TSA	<i>Leuconostoc</i> <i>Lactiplantibacillus</i> <i>Lactobacillus</i>	
16	1 1 1	TSA	<i>Bacillus</i> <i>Lactiplantibacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	$7,3 \times 10^7$
17	3 1	TSA	<i>Enterococcus</i> <i>Bacillus</i>	$6,0 \times 10^6$
18	1 1	TSA	<i>Lactococcus</i> <i>Acetobacter</i>	
19	1 1	TSA	<i>Enterococcus</i> <i>Citrobacter</i>	
20	1	King B	<i>Acetobacter</i>	
21	1 1 1	TSA	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactiplantibacillus</i> <i>Bacillus</i>	$1,7 \times 10^6$
22	1	BDA	<i>Trichoderma</i>	$1,2 \times 10^7$

4.3 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DAS AMOSTRAS DE BIOINSUMOS PRODUZIDAS ON FARM BASEADAS EM METAGENÔMICA

Após o sequenciamento do metagenoma e análise pelo programa MetaPhlAn, obteve-se a tabela taxonômica indicando a frequência relativa do DNA genômico dos microrganismos presentes (Figura 4) em relação à quantidade de *reads* lidos pelo programa (Apêndice B).

Figura 4- Frequência relativa de sequências do DNA genômico de microrganismos presentes nas amostras de bioinsumos obtidas de produção *on farm* e a amostra controle, apresentada por espécie. Os respectivos grupos funcionais como geralmente são reconhecidos os microrganismos são representados por cores.



* Cada bloco é correspondente a uma espécie, exceto os microrganismos com abundância relativa menor que 1%, representados pela cor preta em bloco único.

** Outros: equivale a bactérias de menor ocorrência, mas pode incluir bactérias fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato, microbiota humana, animal, etc., decompositores, oxidativas, redutoras, conversão de biomassa em combustível, biocombustível, atividade antifúngica ou antimicrobiana, endossimbiontes de insetos, metabolização de compostos, produtoras de pigmento, propionato, hidrogênio, bioplástico, álcool, xantolisina, ciclagem bioquímica de enxofre, tolerante a altas temperaturas, a boro, tratamento de água ou esgoto, uso industrial, produtora de biogás, associação a gastrite, e uso em biotecnologia.

No total foram encontrados 305 taxa de microrganismos com base nas

sequências de DNA extraídas das amostras dos bioinsumos produzidos *on farm*, indicando alto grau de contaminação, formada pelos microrganismos não alvo da multiplicação. Entre os diferentes taxa, 101 são patogênicos de humanos, animais ou plantas, 32 são consideradas BPCP, e/ou auxiliarem no controle biológico ou fixação biológica de nitrogênio, 22 são empregados em biorremediação ou biodegradação, 50 são bactérias fermentativas e/ou probióticas, mostrando que o grupo de patogênicas é o predominante. O restante são bactérias de vida livre, outras que não foram encontradas informações e bactérias de diferentes grupos que não se encaixavam nos grupos acima, como decompositoras, endossimbiontes de insetos, entre outras. As amostras 10, 17 e 22 apresentaram grande abundância relativa de patógenos, com destaque para os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Enterococcus*.

Os DNAs dos microrganismos alvo foram encontrados em algumas amostras, porém em sua maioria com baixa abundância relativa (Tabela 4). As amostras 1, 2, 3, 4 e 17 apresentaram abundância relativa dos microrganismos alvo menor que 1%; as amostras 15, 18 e 21 com maiores frequências em torno de 69, 4,5 e 9,5/0,3%, respectivamente. Mesmo nos casos em que foi encontrada maior frequência dos microrganismos alvo, como na amostra 15, com 69% de *Priestia megaterium*, também foram encontrados patógenos na mesma amostra, como *Bacillus cereus* e *Candida tropicalis*. Nas demais amostras as sequências de DNA dos microrganismos alvo não foram encontradas na análise pelo programa MetaPhlAn.

As amostras 1, 8 e 11 foram as que apresentaram maior número de espécies pela abordagem metagenômica. A amostra 1 possuía quatro microrganismos alvo, a amostra 8 apenas um e a amostra 11 tinha dois. Entretanto, na amostra 1 foram encontradas 64 espécies, na amostra 8 foram 56 espécies e na amostra 11 foram 65 espécies, indicando alta contaminação. Apesar de a amostra 20 apresentar grande ocorrência de DNA de uma BPCP, este não era o microrganismo alvo. Neste caso, o microrganismo alvo era *Pseudomonas fluorescens*, mas houve predominância de *Acetobacter peroxydans* com mais de 95% de abundância relativa.

Tabela 4 – Resultados da análise metagenômica pelo MetaPhlan com a abundância relativa de DNA dos microrganismos alvo encontrados no controle positivo (C) e nas amostras provenientes de produções de bioinsumos *on farm* (1 a 22).

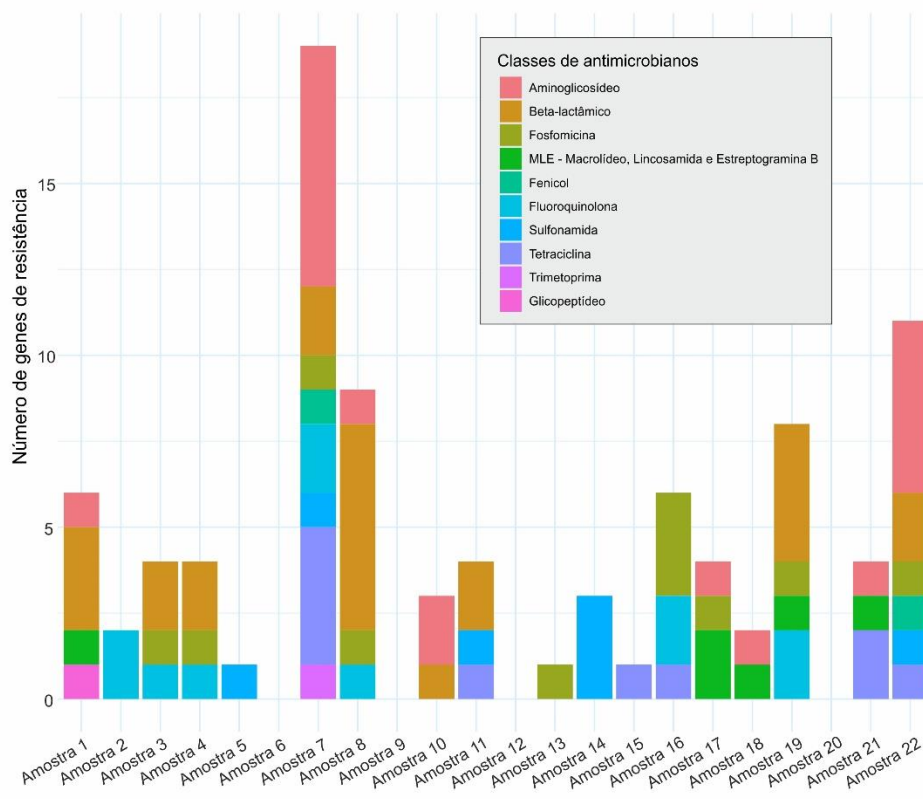
Microrganismos	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>A. brasilense</i>	41,83%	0,00%	0,10%	-	0,79%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. lecheniformis</i>	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. pumilus</i>	6,30%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	0,13%	0,47%	-	-	0,00%	0,00%	0,00%	-	-	-	-	0,00%	-	-	-	-	-	4,48%	-	-	9,55%	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-	0,00%	0,00%	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bassiana</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. japonicum</i>	-	0,00%	0,00%	0,59%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. diazoefficiens</i>	0,61%	0,01%	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aryabhattai</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	0,00%	-	-	-	-	0,00%	-	-	0,00%	-	-	-
<i>P. megaterium</i>	-	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	-	68,82%	-	0,45%	-	-	-	0,27%	-
<i>P. brassicacearum</i>	4,19%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	-
<i>R. tropici</i>	47,07%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. harzianum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00%

Nota: 0% significa que o microrganismo alvo era objeto da multiplicação, mas seu DNA não foi encontrado na amostra.

Além do metagenoma analisado pelo MetaPhlAn, as amostras também foram analisadas pelo software Bowtie2, em que os microrganismos alvo e as sequências de DNA dos microrganismos reconhecidos na análise pelo MetaPhlAn foram comparados com genomas de referência dessas espécies para averiguar suas abundâncias relativas nas amostras. A maior parte das frequências relativas ficaram iguais ou próximas pelas duas formas de análise, mas houve discrepância em alguns casos (Apêndice C), indicando que a frequência relativa pode variar conforme o método de análise. Entretanto, independentemente do método, não alterou o resultado para a confirmação dos microrganismos alvo e os contaminantes nas amostras.

Em relação à presença de genes de resistência a antibióticos, as amostras 6, 9, 12 e 20 não apresentaram genes adquiridos, ou seja, não intrínsecos à resistência natural apresentada pelos microrganismos encontrados (Figura 5). Todas as demais amostras apresentaram pelo menos um gene de resistência não intrínseco. A amostra 7 foi a que apresentou a maior quantidade de genes de resistência a antimicrobianos, sendo encontrados 19 genes, entre os quais os que levam à resistência a aminoglicosídeos, β -lactâmicos, fosfomicina, fenicol, fluoroquinolona, sulfonamida, tetraciclina, trimetoprim.

Figura 5- Análise da presença de genes de resistência adquirida a antibióticos em 22 amostras de bioinsumos produzidos *on farm*.



5 DISCUSSÃO

O cultivo de microrganismos para a produção de bioinsumos exige conhecimentos específicos de microbiologia, especialmente quanto à fisiologia e o metabolismo microbiano para que a eficiência e a qualidade sejam maximizadas. Além do conhecimento sobre as exigências nutricionais dos microrganismos alvo, como a capacidade de uso de fontes de carbono, fontes de nitrogênio, fatores de crescimento etc., fatores importantes como a salinidade do meio e o pH interferem diretamente no comportamento do desenvolvimento do microrganismo no meio de cultura, impactando diretamente na concentração final de células do microrganismo de interesse (O'HARA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

A condutividade elétrica em um meio aquoso, como os meios de cultura para crescimento microbiano, é diretamente proporcional à concentração de solutos (DELAZERI *et al.*, 2016). Portanto, alta condutividade elétrica influencia nas relações osmóticas da célula, que por sua vez limita o crescimento dos microrganismos não adaptados àquelas condições. Alguns resultados de condutividade elétrica encontrados nas amostras de bioinsumos produzidas *on farm* são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos alvo, com valores que ultrapassaram 3.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, sendo que apenas as amostras 2, 4, 5, 7 e 8 não ultrapassam esse valor.

Além da condutividade elétrica, a temperatura e o pH também são cruciais para o ótimo crescimento microbiano. Para gêneros mais sensíveis como o *Bradyrhizobium*, a temperatura ótima de crescimento está entre 25 a 30 °C, e o pH próximo à neutralidade, sendo que a taxa de crescimento dessas bactérias, que já é lento, diminui à medida que o pH cai abaixo de 6,5 (O'HARA *et al.*, 2016). O gênero *Azospirillum* apresenta temperatura ótima de crescimento entre 28 e 38 °C e pH entre 7 e 8 (CAIZA, TAMAYO e GUZMÁN, 2018). Por sua vez, espécies do gênero *Bacillus* conseguem tolerar maiores temperaturas com ótimo de crescimento a 30 ± 4 °C (MONNERAT *et al.*, 2020), sendo que para alguns isolados a temperatura ótima é 37 °C (FASOLIN, 2017). O gênero *Pseudomonas* apresenta pH de crescimento em torno de 7,0 a 7,5 (SOESANTO *et al.*, 2022) e temperatura ótima entre 25 e 30 °C (DONNARUMMA *et al.*, 2010). O gênero de fungo entomopatogênico *Trichoderma*, também alvo de uma das amostras, apresenta temperatura ótima de crescimento entre 25 a 30 °C e pH entre 5,5 a 7,5 (SINGH *et al.*, 2014), enquanto o gênero *Beauveria* apresenta temperatura ótima de crescimento entre 25 e 28 °C (FARGUES

et al., 1997) e ampla variação de pH, entre 5 e 13 (PADMAVATHI, DEVI e RAO, 2003).

Sob esse aspecto, a maioria das amostras de bioinsumos produzidos *on farm* apresentaram valores de pH abaixo de 5. Apenas as amostras 1, 3, 4, 7, 8, 10, 12, apresentaram pH 5 ou superior, o que revela um ambiente excessivamente ácido para o crescimento dos microrganismos alvo. Quanto à temperatura, embora as amostras tivessem chegado no laboratório sob refrigeração, há relatos de produtores de bioinsumos *on farm* de que seus fermentados atingem temperaturas acima de 40 °C, o que é totalmente desfavorável ao crescimento da grande maioria dos microrganismos usados para a produção de bioinsumos, notadamente os promotores de crescimento de plantas dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*.

Além dos aspectos físico-químicos e nutricionais dos meios de cultivo, as amostras de bioinsumos multiplicados *on farm* apresentaram alta contaminação por microrganismos não alvo, o que foi detectado tanto pelo método baseado em cultivo, quanto pela abordagem metagenômica. Na avaliação baseada em cultivo, seguido de sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S, os gêneros dos microrganismos alvo foram pouco frequentes. Apenas os gêneros bacterianos de interesse *Bacillus* e *Pseudomonas* foram encontrados com base em cultivo, mas não necessariamente a espécie pretendida. Já o fungo do gênero *Trichoderma* foi encontrado em uma amostra (22) e caracterizado pelo crescimento típico em meio de cultivo (Figura 3), no entanto, não foi feita a confirmação do gênero pelo sequenciamento do gene ribossomal 18S. Os demais microrganismos alvo declarados nas amostras *on farm* não foram encontrados pelos isolamentos em meio de cultivo. Acrescenta-se às limitações dos meios de cultivo já destacadas o fato de que alguns microrganismos alvos como *Bradyrhizobium* possuem taxa de crescimento lenta, enquanto os contaminantes possuem tempo de geração menor, ou seja, apresentam crescimento mais rápido, o que facilita o seu predomínio nestes meios.

A diversidade de microrganismos encontrada pela abordagem metagenômica foi maior do que a observada pelo método baseado em cultivo, chegando a 65 espécies na amostra 11 e mais de 10 espécies detectadas na maioria das amostras, embora fosse declarado apenas um microrganismo alvo em mais da metade das amostras analisadas. É conhecido o fato de que a grande maioria dos microrganismos (90 a 99%) não pode ser cultivada em meios de cultura artificiais (BORNEMAN *et al.*, 1996). Portanto, o método baseado em metagenoma apresentou maior sensibilidade na detecção da diversidade de microrganismos encontrados nas

amostras das produções *on farm*.

Os resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S após o isolamento em meio de cultivo e a abordagem metagenômica independente de cultivo que utiliza o sequenciamento do genoma completo por *shotgun*, apresentaram algumas divergências que podem ser explicadas pelo fato de que o sequenciamento por *shotgun* consegue identificar mais microrganismos, mesmo quando a frequência relativa destes é baixa, indicando maior sensibilidade em comparação aos métodos baseados em cultivo (BRUMFIELD *et al.*, 2020).

Algumas discrepância entre os resultados da análise do sequenciamento das amostras pelos programas MetaPhlAn e Bowtie2, podem ser atribuídas ao fato de o primeiro método utilizar genes marcadores (BLANCO-MÍGUEZ *et al.*, 2023), enquanto o segundo utiliza genomas de microrganismos depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para alinhamento com os genomas encontrados nas amostras (LANGMEAD e SALZBERG, 2012). Desta forma, o Bowtie2 apresenta uma precisão maior, mas não seria possível utilizar apenas este programa para a análise inicial porque não se conhecia, *a priori*, todos os microrganismos presentes nas amostras, o que foi revelado apenas após as amostras terem sido analisadas pelo MetaPhlAn, tornando possível a análise utilizando o Bowtie2. Outro fator é que o MetaPhlAn não conseguiu analisar todas as leituras, mas apenas as que continham os genes marcadores (Apêndice A). Um exemplo dessa discrepância é o gênero *Trichoderma*, microrganismo alvo da amostra 22, que não foi detectado na análise metagenômica pelo MetaPhlAn (Tabela 4), mas apenas pelo Bowtie2, com 0,01% de frequência relativa (Apêndice C). Dessa forma, um método acaba complementando o outro e dá maior segurança na interpretação dos resultados.

Alguns microrganismos foram predominantes nas amostras em relação aos demais, como é o caso da espécie *Acinetobacter baumannii* com 6,07%, 29,1% e 40%, nas amostras 1, 4 e 8, respectivamente. Outros microrganismos foram encontrados nas amostras em proporções relevantes, como *Candida tropicalis* com 14,5%, 19,7% e 88,5% nas amostras 13, 21 e 22, respectivamente, *Enterococcus faecalis* com 49,9% na amostra 19, *Enterococcus faecium* com 87,4% na amostra 17, dentre outros exemplos. Isso indica que, além da ausência ou baixa frequência dos microrganismos alvo, há prevalência de microrganismos potencialmente patogênicos. Entretanto, os microrganismos alvo, quando encontrados pela abordagem metagenômica, tiveram uma abundância relativa na maioria das amostras menor que

1%, tanto pelo programa do MetaPhlAn, quanto pelo Bowtie2. Desta forma, além das condições físico-químicas inadequadas descritas anteriormente, ocorre competição entre os microrganismos por nutrientes e espaço, o que favorece o crescimento de microrganismos contaminantes, pois geralmente apresentam capacidade de crescimento e desenvolvimento maior que os microrganismos alvo, ou ainda, por antagonismo pela produção de metabólitos que inibem crescimento dos microrganismos de interesse (MILJAKOVIĆ, MARINKOVIĆ e BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, 2020).

As espécies de microrganismos patogênicos encontradas nas amostras podem causar infecções em humanos e causar problemas sanitários. *A. baumannii* é um patógeno oportunista relacionado a infecções no trato urinário, meningite, bacteremia e pneumonia em humanos (DEXTER *et al.*, 2015). A levedura *C. tropicalis* é a segunda espécie mais virulenta de *Candida* (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017), enquanto a enterobactéria *E. faecalis* causa endocardite infecciosa (HERRERA-HIDALGO *et al.*, 2020) e *E. faecium* tem sido relacionada a casos de infecção hospitalar (ZHOU *et al.*, 2020).

Apesar de os microrganismos alvo *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* terem sido acrescentados aos tanques de multiplicação, seja por meio de pré-inóculos, seja por meio de produtos comerciais usados como inóculos, não conseguiram se estabelecer naquele ambiente e prevalecer, conforme indicam os resultados pela abordagem metagenômica ou baseada em cultivo. O fato de os microrganismos alvo terem sido encontrados em algumas amostras pela abordagem metagenômica, ainda que em quantidades relativas ínfimas, pode ser decorrente do DNA trazido pelo inóculo introduzido nos tanques de multiplicação, uma vez que o método metagenômico é bastante sensível na detecção de pequenas quantidades de material genético na amostra. Entretanto, o fato de não ter sido encontrada nenhuma colônia dos microrganismos de interesse pela abordagem baseada em cultivo, à exceção da amostra 22, em que foram encontradas colônias de *Trichoderma*, apesar a alta contaminação por outros microrganismos, reforça a hipótese de que essas células não estavam viáveis nas amostras provenientes das multiplicações *on farm*.

Estudo realizado por Lana *et al.* (2019), em que foi avaliada a qualidade microbiológica de bioinseticidas produzidos *on farm* no estado de Goiás, revelou 100% de contaminação e baixa concentração ou ausência do microrganismo alvo nas amostras. Mesmo quando o microrganismo alvo foi encontrado, este não apresentava

o cristal proteico com propriedades bioinseticidas, portanto, incapaz de promover o efeito desejado no controle de pragas. Isso indica que, mesmo encontrando o microrganismo de interesse, este não estava apto a cumprir seu objetivo quando utilizado no campo por não ter a proteína chave com propriedade bioinseticida.

Em apenas quatro amostras não foram encontrados genes de resistência a antibióticos, enquanto que nas demais foi encontrado pelo menos um gene. As amostras 7 e 22 foram as que mais apresentaram genes de resistência a antimicrobianos, com 19 e 12 genes, respectivamente. Os microrganismos podem apresentar resistência intrínseca a antimicrobianos quando já possuem naturalmente genes de resistência, mas também podem adquiri-la por mutação ou por transferência horizontal de genes (MUNITA e ARIAS, 2016). Por esta razão, a multiplicação de bioinsumos *on farm* pode contribuir para a disseminação de microrganismos que abrigam genes de resistência a antibióticos, o que traz riscos à saúde pública. Além disso, foram encontradas nas amostras bactérias multirresistentes, como o caso da *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae, microrganismos que tipicamente habitam o trato gastrointestinal de insetos e animais (PAHO, 2017).

Na amostra 15 (Figura 4) os microrganismos potencialmente patogênicos apresentaram abundância menor que 1%, embora os genes de quatro potenciais patógenos estivessem presentes: *Bacillus cereus*, *Candida tropicalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Leuconostoc lactis*. Além disso, foram detectados nas amostras genes de resistência aos antibióticos do grupo dos aminoglicosídeos e macrolídeos (Figura 5; Apêndice D). A amostra 18, mesmo não apresentando microrganismos potencialmente patogênicos (Figura 4), apresentou um gene de resistência à tetraciclina (Figura 5). Na amostra 15, mesmo os contaminantes não sendo considerados patógenos prioritários pela OMS, como o *Bacillus cereus*, foram detectados genes de resistência a antibióticos, dentre eles resistência à tetraciclina (FIEDLER *et al.*, 2019). Esse aspecto também é negativo, pois mesmo o microrganismo apresentando menor potencial patogênico, pode manter e transferir genes de resistência a antibióticos para microrganismos com maior patogenicidade por transferência horizontal (ASLAM *et al.*, 2018; MUNITA e ARIAS, 2016). Fato semelhante ocorreu com a amostra 18, a qual apresentou apenas microrganismos utilizados em controle biológico, BPCP e a bactéria fermentativa *Lactococcus lactis* (Apêndice A), mas apresentou genes de resistência possivelmente adquiridos por

transferência horizontal (MUNITA e ARIAS, 2016). Além disso, a bactéria *Lactococcus lactis*, presente na amostra, é considerada um reservatório e fonte de genes de resistência a antimicrobianos em alimentos (ALEXA *et al.*, 2020). Desta forma, mesmo em amostras não contaminadas por microrganismos patogênicos, como a amostra 18, os microrganismos presentes abrigavam genes de resistência a antimicrobianos, constituindo um reservatório no ambiente destes genes que podem ser transferidos a outros microrganismos.

Além da ausência ou baixa concentração dos microrganismos alvo nas amostras de bioinsumos produzidas *on farm*, o que os torna inadequados para promover o efeito desejado, a disseminação desses contaminantes no ambiente de produção pode ser prejudicial à saúde humana e animal. Os resultados aqui apresentados corroboram outros estudos que analisaram a qualidade microbiológica de bioinsumos produzidos *on farm*, como os obtidos por Bocatti *et al.* (2022), em que cerca de 50% dos contaminantes encontrados nas amostras apresentam potencial patogênico e 30% apresentaram genes adquiridos de resistência a antimicrobianos. Por sua vez, Santos, Dinnas e Feitoza (2020) encontraram contaminações por *Salmonella* em amostras de bioinseticidas produzidas *on farm*, indicando que a produção de bioinsumos exige condições ideais de multiplicação para evitar as contaminações e um controle de qualidade adequado.

6 CONCLUSÕES

As amostras provenientes da produção de bioinsumos *on farm* e analisadas com base em cultivo e pela abordagem metagenômica apresentaram altos índices de contaminação por microrganismos não alvo que abrigam genes de resistência a antimicrobianos. Além da contaminação, a concentração de microrganismos alvo é baixa ou ausente na grande maioria dos casos, o que limita seu uso para as finalidades a que se destinam. Apenas microrganismos do gênero *Bacillus* foram detectados nas amostras da produção *on farm*, mas isto não garante que era a espécie ou cepa desejada. Por exemplo, embora o gênero *Pseudomonas* tenha sido encontrado em alta prevalência em uma das amostras da produção *on farm*, não era pertencente à espécie alvo *Pseudomonas fluorescens*.

Entre as principais causas para a falta de crescimento adequado dos microrganismos alvo nas multiplicações *on farm* estão, além do alto índice de contaminação por outros microrganismos, o pH e a salinidade inadequados.

A produção de bioinsumos *on farm* sem adequado controle de qualidade, além do descrédito quanto a capacidade de promover efeito desejado sobre o biocontrole ou promoção do crescimento de plantas, pode colocar em risco a saúde humana e animal pelo fato de os microrganismos contaminantes, em vários casos apresentarem potencial patogênico, também abrigarem genes de resistência a agentes antimicrobianos que podem ser transferidos para outros microrganismos, disseminando genes de resistência no ambiente.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, I.; YOKOTA, A.; YAMAZOE, A.; e FUJIWARA, T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 57, n. Pt 5, p. 1117–1125, maio 2007.

AHMED, A. S. I.; EL MOGHAZY, G. M.; ELSAYED, T. R.; GODA, H. A. L. E KHALAFALLA, G. M. Molecular identification and in vitro evaluation of probiotic functional properties of some Egyptian lactic acid bacteria and yeasts. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2021.

ALASWAD, A. A.; OEHRLE, N. W.; KRISHNAN, H. B. Classical Soybean (*Glycine max* (L.) Merr) Symbionts, *Sinorhizobium fredii* USDA191 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110, Reveal Contrasting Symbiotic Phenotype on Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). **International Journal of Molecular Sciences** 2019, Vol. 20, Page 1091, v. 20, n. 5, p. 1091, 3 mar. 2019.

ALEXA, E. A.; WALSH, C. J.; COUGHLAN, L. M.; AWAD, A., SIMON, C. A.; RUIZ, L.; CRISPIE, F.; COTTER, P. D. e ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. Produtos lácteos e ambientes de processamento de laticínios como reservatório de resistência a antibióticos e determinantes de extinção de quorum, conforme revelado através da metagenômica funcional. **MSystems**, v. 1, pág. 10.1128/msistemas.00723-19, 2020.

ALMEIDA, O. G. G.; MARTINISA, E. C. P. DE. Metagenome-Assembled Genomes Contribute to Unraveling of the Microbiome of Cocoa Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 16, p. 1–18, 1 jul. 2021.

ALOU, M. T.; NDONGO, S.; FRÉGÈRE, L.; LABAS, N.; ANDRIEU, C.; RICHEZ, M.; COUDERC, C.; BAUDOIN, J. P.; ABRAHÃO, J.; BRAH, S.; DIALLO, A.; SOKNA, C.; CASSIR, N.; SCOLA, B.L. e CADORET, F. Taxonogenomic description of four new *Clostridium* species isolated from human gut: ‘*Clostridium amazonitimonense*’, ‘*Clostridium merdae*’, ‘*Clostridium massilidielmoense*’ and ‘*Clostridium nigeriense*’. **New Microbes and New Infections**, v. 21, p. 128–139, 1 jan. 2018.

ANNUNZIO, S. R. DE *et al.* Reliability of Quantification of *Candida* Species Colonies Using Alternative Plating Methods. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 5, n. 0, 6 dez. 2019.

ANPII – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. Brasil utiliza mais de 130 milhões de doses de inoculantes biológicos nas lavouras e os benefícios ambientais ganham destaque. 2023a. Disponível em: < <https://www.anpii.org.br/brasil-utiliza-mais-de-130-milhoes-de-doses-de-inoculantes-biologicos-nas-lavouras-e-os-beneficios-ambientais-ganham-destaque/> > Acesso em: 14 jan. 2024.

ANPII – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. Dados da ANPII mostram crescimento acima de 15% ao ano e mais de 134 milhões de doses de inoculantes biológicos vendidos em 2023b. 2023d. Disponível em: < <https://www.anpii.org.br/dados-da-anpii-mostram-crescimento-acima-de-15-ao-ano-e-mais-de-134-milhoes-de-doses-de-inoculantes-biologicos-vendidos-em-2023/> > Acessado em: 14 jan. 2024.

ANPII – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. O mercado de biológicos irá triplicar no Brasil em 2030. 2023c. Disponível em: < <https://www.anpii.org.br/o-mercado-de-biologicos-ira-triplicar-no-brasil-em-2030/#:~:text=O%20mercado%20de%20produtos%20biol%C3%B3gicos,mas%20esse%20n%C3%BAmero%20est%C3%A1%20aumentando.> > Acesso em: 3 set. 2023.

ARAÚJO, S.C. Roadmapping da comercialização de inoculantes no Brasil: novas estratégias, articulações e demandas da ANPII. **Anais da XVI Relare**. Londrina-PR, 2012.

ARDAKANI, M. R.; MAZAHARI, D.; MAFAKHERI, S. e MOGHADDAM, A. Absorption efficiency of N, P, K through triple inoculation of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Azospirillum brasilense*, *Streptomyces* sp., *Glomus intraradices* and manure application. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 17, p. 181-192, 2011.

ARULDASS, C. A.; AZIZ, A.; VENIL, C. K.; KHASIM, A. R. e AHMAD, W. A. Utilization of agro-industrial waste for the production of yellowish-orange pigment from

Chryseobacterium artocarp CECT 8497. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 113, p. 342–349, 1 set. 2016.

ASLAM, B.; WANG, W.; ARSHAD, M.I.; KHURSHID, M.; MUZAMMIL, S.; RASOOL, M.H.; NISAR, M.A.; ALVI, R.F.; ASLAM, M.A.; QAMAR, M.U.; SALAMAT, M.K.F. e BALOCH, Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1645–1658, 2018.

ASSIH, E. A.; OUATTARA, A. S.; THIERRY, S.; CAYOL, J. L.; LABAT, M. e MACARIE, H. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. Pt 2, p. 559–568, 2002.

AYALEW, T.; YOSEPH, T.; PETRA, H.; CADISCH, G. Yield response of field-grown cowpea varieties to *Bradyrhizobium* inoculation. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 4, p. 3258–3268, 18 jul. 2021.

BANCALARI, E. ALINOVI, M.; BOTTARI, B.; CALIGIANI, A.; MUCCHETTI, G.; E GATTI, M. Ability of a Wild *Weissella* Strain to Modify Viscosity of Fermented Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 502767, 28 jan. 2020.

BARATI-DEAK, B.; BELAK, A.; MOHACSI-FARKAS, C. Characterisation of *Pseudomonas lundensis* CP-P-5 as a potential antagonist of foodborne pathogenic bacteria. **Acta Alimentaria**, v. 50, n. 2, p. 219–227, 18 mar. 2021.

BARTLETT, A.; PADFIELD, D.; LEAR, L.; BENDALL, R. e VOS, M. A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans. **Microbiology**, v. 168, n. 12, 9 dez. 2022.

BAUR, T.; DÜRRE, P. New Insights into the Physiology of the Propionate Producers *Anaerostignum propionicum* and *Anaerostignum neopropionicum* (Formerly *Clostridium propionicum* and *Clostridium neopropionicum*). **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 685, 1 mar. 2023.

BEHERA, S. S.; RAMACHANDRAN, S. Potential uses of halophytes for biofuel production: opportunities and challenges. **Sustainable Biofuels: Opportunities and Challenges**, p. 425–448, 1 jan. 2021.

BEHRENDT, U.; AUGUSTIN, J.; SPRÖER, C.; GELBRECHT, J.; SCHUMANN, P. e ULRICH, A. Taxonomic characterisation of *Proteus terrae* sp. nov., a N₂O-producing, nitrate-ammonifying soil bacterium. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 6, p. 1457–1468, 5 out. 2015.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, LUCIANE M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1044–1051, 2012.

BERARDO, N.; GIRAUDO, J.; MAGNANO, G.; NADER-MACIAS, M. E.; BOGNI, C., e PELLEGRINO, M. *Lactococcus lactis* subsp *lactis* CRL1655 and *Schleiferilactobacillus perolens* CRL1724 inhibit the adherence of common bovine mastitis pathogens to mammary gland cells, without causing histological changes in the mammary gland. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 733–742, 1 ago. 2022.

BETTIOL, W.; MEDEIROS, F. H. V. DE. Como o Brasil se tornou o maior produtor e consumidor de produtos de biocontrole. **Embrapa**. 2023. Disponível em: <[BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JÚNIOR, T. J. DE; CORRÊA, É. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. DE C. DO B.; BEZERRA, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas, 1 ed., **Embrapa Meio Ambiente**: Jaguariúna; 2012.](https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/79156418/artigo-como-o-brasil-se-tornou-o-maior-produtor-e-consumidor-de-produtos-de-biocontrole#:~:text=de%20biocontrole%20registrado,-,A%20expans%C3%A3o%20de%20mercado%20mais%20extraordin%C3%A1ria%20para%20o%20controle%20biol%C3%B3gico,44%25%20das%20vendas%20de%20bioagentes.>. Acesso em: 3 set. 2023.</p></div><div data-bbox=)

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 24 dez. 2011.

BLANCO-BLANCO, M. T.; GÓMEZ-GARCÍA, A. C.; HURTADO, C.; GALÁN-LADERO, M. A.; DEL CARMEN LOZANO, M.; GARCÍA-TAPIAS, A. e BLANCO, M. T. *Candida orthopsilosis* fungemias in a Spanish tertiary care hospital: Incidence, epidemiology

and antifungal susceptibility. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 2, p. 145–148, 1 abr. 2014.

BLANCO-MÍGUEZ, A.; BEGHINI, F.; CUMBO, F.; MCLVER, L.J.; THOMPSON, K.N.; ZOLFO, M.; DUBOIS, L.; HUANG, K.D.; THOMAS, A. M.; NICKOLS, W. A.; PICCINNO, G.; PIPERNI, E.; PUNČOCHÁŘ, M.; VALLES-COLOMER, M.; TETT, A.; GIORDANO, F.; DAVIES, R.; WOLF, J.; BERRY, S. E.; SPECTOR, T. D.; FRANZOSA, E. A.; PASOLLI, E.; ASNICAR, F.; HUTTENHOWER, C. & SEGATA, N. Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlan 4. **Nature Biotechnology**, p. 1–12, 23 fev. 2023.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVACS, A. T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, n. 1, p. 15–25, 1 jan. 2021.

Biofertilizers Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Nitrogen Fixing, Phosphate Solubilizing, Others), By Application, By Crop Type, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. Grand View Research, 2019. Disponível em <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/biofertilizers-industry>>.

Acessado em: 11 de agosto de 2022.

BOCATTI, C. R.; FERREIRA, E.; RIBEIRO, R. A.; CHUEIRE, L. M. O.; DELAMUTA, J. R. M.; KOBAYASHI, R. K. T.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum* brasilense produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 267–280, 1 mar. 2022.

BOECHAT, C. L.; CARLOS, F. S.; NASCIMENTO, C. W. A. D.; QUADROS, P. D. D.; SÁ, E. L. S. D. e CAMARGO, F. A. D. O. Bioaugmentation-assisted phytoremediation of As, Cd, and Pb using *Sorghum bicolor* in a contaminated soil of an abandoned gold ore processing plant. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, p. e0200081, 12 out. 2020.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P.W.; O’SULLIVAN, K.M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E.W. Molecular microbial diversity of

an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1935-1943, 1996.

BORRIS, R. Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture. **European Journal of Plant Pathology**, v. 2011, p. 41–76, 2011.

BORSARI, A.C.P. e VIERIA, L.C. Mercado e perspectivas dos bioinsumos no Brasil. In: MEYER, M.C.; BUENO, A.F., MAZARO, S.M.; SILVA, J.C.; et al. Bioinsumos na cultura da soja. Embrapa Soja, 2022. p. 39-51.

BOZHOKINA, E.; KEVER, L.; KHAITLINA, S. The *Serratia grimesii* outer membrane vesicles-associated grimeysin triggers bacterial invasion of eukaryotic cells. **Cell Biology International**, v. 44, n. 11, p. 2275–2283, 12 nov. 2020.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F. B.; FILHO, M. R. C.; MILER, L. O. e SANTOS, G. R. Controle Biológico de Fitopatógenos por *Bacillus subtilis* in vitro. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 7, n. 3, p. 45–51, 30 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, seção 1, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, seção 1, p.3-7,2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 53, de 23 de outubro de 2013. Estabelece as disposições e critérios para as definições, a classificação, o registro e renovação de registro de estabelecimento, o registro de produto, a autorização de comercialização e uso de materiais secundários... **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, seção 1, 2013.

BRIDEL, S.; BOUCHEZ, V.; BRANCOTTE, B.; HAUCK, S.; ARMATYS, N.; LANDIER, A.; MÜHLE, E.; GUILLOT, S.; TOUBIANA, J.; MAIDEN, M. C. J.; JOLLEY, K. A. e BRISSE, S. Genomic library of *Bordetella*. **bioRxiv**, p. 2022.01. 20.475763, 2022.

BRIDGES, C. M.; NELSON, M. C.; GRAF, J. e GAGE, D. J. Draft genome sequences of *Dysgonomonas* sp. strains BGC7 and HGC4, isolated from the hindgut of a lower termite. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, n. 4, p. 10.1128/mra.01427-20, 2021.

BRUMFIELD, K. D.; HUQ, A.; COLWELL, R. R.; OLDS, J. L. e LEDDY, M. B. Microbial resolution of whole genome shotgun and 16S amplicon metagenomic sequencing using publicly available NEON data. **PLoS One**, v. 15, n. 2, p. e0228899, 2020.

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

CAGNO, R. DI; FILANNINO, P.; GOBBETTI, M. Microbial Metabolic Pathways and the “Fermented Plant Foods—Human Health” Axis. **Foods** 2021, Vol. 10, Page 1105, v. 10, n. 5, p. 1105, 17 maio 2021.

CALVO-GARRIDO, C.; ROUDET, J.; AVELINE, N.; DAVIDOU, L.; DUPIN, S. e FERMAUD, M. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 404076, 1 fev. 2019.

CAIZA, C. A. S.; TAMAYO, Y. V.; GUZMÁN, F. Y. Respuesta biológica de aislados de *Azospirillum* spp. frente a diferentes tipos de estrés. **Centro Agrícola**, v. 45, p. 40–46, mar. 2018.

CARBONETTO, B.; RASCOVAN, N.; ÁLVAREZ, R.; MENTABERRY, A. e VÁZQUEZ, M. Structure, Composition and Metagenomic Profile of Soil Microbiomes Associated to Agricultural Land Use and Tillage Systems in Argentine Pampas. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99949, 12 jun. 2014.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V. e LUNA, V. Basic and Technological Aspects of Phytohormone Production by Microorganisms: *Azospirillum* sp. as a Model of Plant

Growth Promoting Rhizobacteria. **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. p. 141-182.

CASTILLO, J. D. L. M.; CAMINATA LANDRIEL, S.; SÁNCHEZ COSTA, M.; TABOGA, O. A.; BERENQUER, J.; HIDALGO, A.; FERRAROTTI, S. A. e COSTA, H. A single mutation in cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus barengoltzii* changes cyclodextrin and maltooligosaccharides production. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 31, n. 10, p. 399–407, 1 out. 2018.

CASTRO, J. R. P e ARAUJO, S. Importância dos inoculantes para a economia brasileira. **AgroANALYSIS**, v. 38, n. 8, p. 39-40, 2018.

CERRATO, J. M.; FALKINHAM III, J. O.; DIETRICH, A. M.; KNOCKE, W. R.; MCKINNEY, C. W. E PRUDEN, A. Manganese-oxidizing and -reducing microorganisms isolated from biofilms in chlorinated drinking water systems. **Water Research**, v. 44, n. 13, p. 3935–3945, 1 jul. 2010.

CHA, Q. Y.; HOU, X. K.; ZHANG, X. F.; LI, M.; WEI, Y. Q.; ZHANG, T. K.; QIN, S. C.; LIU, Z. Y.; WANG, X. J.; LIU, J. J.; ZHU, M. L. e MO, M. H. *Luteimonas lumbrici* sp. nov., a novel bacterium isolated from wormcast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 604-610, 2020.

CHAROENWONGPAIBOON, T.; WANGPAIBOON, K.; PICHYANGKURA, R.; NEPOGODIEV, S. A.; WONGANAN, P.; MAHALAPBUTR, P. e FIELD, R. A. Characterization of a nanoparticulate exopolysaccharide from *Leuconostoc holzapfelii* KM01 and its potential application in drug encapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 690–698, 30 set. 2021.

CHAUDHARY, T.; GERA, R.; SHUKLA, P. Deciphering the Potential of *Rhizobium pusense* MB-17a, a Plant Growth-Promoting Root Endophyte, and Functional Annotation of the Genes Involved in the Metabolic Pathway. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 617034, 18 jan. 2021.

CHAKRABARTY, S.; JIN, M., WU, C.; CHAKRABORTY, P. e XIAO, Y. *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein family Vip3A and mode of action against pest Lepidoptera. **Pest Management Science**, v. 76, n. 5, p. 1612–1617, 1 maio 2020.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y. e GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ

preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. 884–890, 1 set. 2018.

CHETTRI, B.; SINGH, A. K. Kinetics of hydrocarbon degradation by a newly isolated heavy metal tolerant bacterium *Novosphingobium panipatense* P5:ABC. **Bioresource Technology**, v. 294, p. 122190, 1 dez. 2019.

CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; BRITO, O. R.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with Bradyrhizobium and Azospirillum promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1641-1649, 2015.

CHINMAY, J.; MANISH, S. A Correlational Analysis of the Phosphate Solubilising Bacteriathe Growth Rate of Lady Rosetta Potato. **Current Agriculture Research Journal**, v. 10, n. 3, p. 290–299, 5 jan. 2023.

CHITPIROM, K.; TANASUPAWAT, S.; AKARACHARANYA, A.; LEEPEPATPIBOON, N.; PRANGE, A.; KIM, K. W.; LEE, K. C. e LEE, J. S. *Comamonas terrae* sp. nov., an arsenite-oxidizing bacterium isolated from agricultural soil in Thailand. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 245–251, 2012.

CHUN, B. H.; LEE, Y.; JIN, H. M. e JEON, C. O. *Cloacibacterium caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1688–1692, 1 jun. 2017.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 840–862, out. 2004.

CEREZINI, P.; KUWANO, B.H.; SANTOS, M.B.; TERASSI, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought, **Field Crops Research**, v. 196, p. 160-167, 2016.

CIMMINO, T.; METIDJI, S.; LABAS, N.; LE PAGE, S.; MUSSO, D.; RAOULT, D. E ROLAIN, J. M. Genome sequence and description of *Actinomyces polynesiensis* str. MS2 sp. nov. isolated from the human gut. **New Microbes and New Infections**, v. 12, p. 1–5, 1 jul. 2016.

DA COSTA SAPUCAY, M. J. L.; FERREIRA, A. S.; DE OLIVEIRA, A. L. M. e

ZUCARELLI, C. Rizobactérias em pós-emergência e adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico do milho. **MAGISTRA**, v. 31, p. 653-660, 2020.

DAY, J. M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from Digitaria roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 45–50, jan. 1976.

D’COSTA, V. M.; KING, C. E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W. W.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G. B.; POINAR, H. N. e WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, n. 7365, p. 457-461, 2011.

DE ANDRADE, W. L.; DE MELO, A. S.; MELO, Y. L.; SÁ, F. V. S.; ROCHA, M. M.; OLIVEIRA, A. P.S. e FERNANDES, P. I. *Bradyrhizobium* inoculation plus foliar application of salicylic acid mitigates water deficit effects on cowpea. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 656-667, 2021.

DELAMUTA, J. R. M.; MENNA, P.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Phylogenies of symbiotic genes of *Bradyrhizobium* symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. **Systematic and applied microbiology**, v. 40, n. 5, p. 254-265, 2017.

DELAZERI, P.; GARLET, J.; SOUZA, G. F. Teste de Condutividade Elétrica em Lotes de Sementes de *Schinus molle* L. **Floresta e Ambiente**, v. 23, p. 413-417, 2016.

DEXTER, C.; MURRAY, G.L.; PAULSEN, I.T. e PELEG, A.Y. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 5, p. 567-573, 2015.

DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Bases científicas para uma agricultura biológica. . **Ciência e Cultura**, v. 34, p. 869–881, 1982.

DOLKA, B.; CZOPOWICZ, M.; CHROBAK-CHMIEL, D.; LEDWOŃ, A. E SZELESZCZUK, P. Prevalence, antibiotic susceptibility and virulence factors of *Enterococcus* species in racing pigeons (*Columba livia* f. domestica). **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–14, 8 jan. 2020.

DOBRZYŃSKI, J.; DOBRZYŃSKI, J.; JAKUBOWSKA, Z.; KULKOVA, I.; KOWALCZYK, P. e KRAMKOWSKI, K. Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

DONNARUMMA, G.; BUOMMINO, E.; FUSCO, A.; PAOLETTI, I.; AURICCHIO, L. e TUFANO, M. A. Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to a potential human pathogen. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 227-234, 2010.

DORJEY, S.; DOLKAR, D.; SHARMA, R. Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: A review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 7, p. 1335-1344, 2017.

DROUIN, P. TREMBLAY, J.; RENAUD, J. E APPER, E. Microbiota succession during aerobic stability of maize silage inoculated with *Lentilactobacillus buchneri* NCIMB 40788 and *Lentilactobacillus hilgardii* CNCM-I-4785. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 1, p. e1153, 1 fev. 2021.

DUNLAP, C. A.; KWON, S. W.; ROONEY, A. P. e KIM, S. J. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 65, n. 10, p. 3487–3492, 1 out. 2015.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ); RICCI, A.; ALLENDE, A.; BOLTON, D.; CHEMALY, M.; DAVIES, R.; ... e FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, P. S. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 3, p. e04663, 1 mar. 2017.

ENDO, A.; IRISAWA, T.; DICKS, L. e TANASUPAWAT, S. Fermented Foods: Fermentations of East and Southeast Asia. **Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition**, p. 846–851, 2 abr. 2014.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; LEÓN, A. V. P. DE; SANCHEZ-FLORES, A. The road to metagenomics: From microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in Genetics**, v. 6, n. DEC, p. 155161, 17 dez. 2015.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm). **Esclarecimentos Oficiais**.

2021. Disponível em <https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/nota-tecnica-producao-de-microrganismos-para-uso-proprio-na-agricultura-on-farm-?inheritRedirect=false&redirect=https%3A%2F%2Fwww.embrapa.br%2Fesclarecimentos-oficiais%3Fp_p_id%3D101_INSTANCE_TMQZKu1jxu5K%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1> Acessado em: 20 mar. 2024.

FALAGAS, M. E.; ATHANASAKI, F.; VOULGARIS, G. L.; TRIARIDES, N. A. e VARDAKAS, K. Z. Resistance to fosfomycin: mechanisms, frequency and clinical consequences. **International journal of antimicrobial agents**, v. 53, n. 1, p. 22-28, 2019.

FAN, B.; WANG, C.; SONG, X.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; GAO, X. E BORRIS, R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 408393, 16 out. 2018.

FASOLIN, J. P. **Influência da temperatura na produção de antimicrobianos e no controle da antracnose e do crestamento bacteriano do feijão por bactérias biocontroladoras**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

FARGUES, J.; GOETTEL, M. S.; SMITS, N.; OUEDRAOGO, A. e ROUGIER, M. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. **Mycologia**, v. 89, n. 3, p. 383–392, maio 1997.

FELFÖLDI, T.; NAGYMÁTÉ, Z.; SZÉKELY, A. J.; JURECSKA, L. e MÁRIALIGETI, K. Biological treatment of coke plant effluents: from a microbiological perspective. **Biologia Futura** 2020 71:4, v. 71, n. 4, p. 359–370, 20 ago. 2020.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. **Manual de Análises de Bioinsumos para o Uso Agrícola: Inoculantes**. Brasília DF: Embrapa, 2014. 164 p.

FIEDLER, G.; SCHNEIDER, C.; IGBINOSA, E. O.; KABISCH, J.; BRINKS, E., BECKER, B.; STOLL, D. A.; CHO, G. S.; HUCH, M. e FRANZ, C. M. Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables

from German retail markets. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2019.

FINKMANN, W.; ALTENDORF, K.; STACKEBRANDT, E. E LIPSKI, A. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegbernensis* gen. nov., sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50 Pt 1, n. 1, p. 273–282, 2000.

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

FONDI, M.; MAIDA, I.; PERRIN, E.; ORLANDINI, V.; LA TORRE, L.; BOSI, E.; NEGRONI, A.; ZANAROLI, G.; FAVA, F.; DECOROSI, F.; GIOVANNETTI, L.; VITI, C.; VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L. E FANI, R. Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 23 fev. 2016.

FORNASARI, M. E.; Rossetti, L.; Remagni, C. e Giraffa, G. Quantification of *Enterococcus italicus* in traditional Italian cheeses by fluorescence whole-cell hybridization. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 223–230, 4 ago. 2008.

FRANÇA, D. V. C.; KUPPER, K. C.; MAGRI, M. M. R.; GOMES, T. M. e ROSSI, F. *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato¹. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 4, p. 360–368, 1 out. 2017.

FRED, E. B. e WAKSMAN, S. A. Laboratory manual of general microbiology. New York, **McGraw-Hill Book Company**, 1928. p.143.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. DE J. A Pesquisa com Soja, A Seleção de Rizóbio e a Produção de Inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, n. 1, p. 117–126, 31 ago. 1999.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 4 maio 2018.

FUKAMI, J.; DE LA OSA, C.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M. E HUNGRIA, M. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 3, p. 328, 2018.

GAZZONI, D. L.; HUNGRIA, M. Produção *on farm* de bioinsumos. **Revista Cultivar**, p. 56, outubro 2021.

GIACOMUCCI, L.; RADDADI, N.; SOCCIO, M.; LOTTI, N. E FAVA, F. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. **New Biotechnology**, v. 52, p. 35–41, 25 set. 2019.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

GISLASON, A. S.; KIEVIT, T. R. DE. Friend or foe? exploring the fine line between *Pseudomonas brassicacearum* and phytopathogens. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 347–360, 24 jan. 2020.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GOMES, E. A.; SILVA, U. D. C.; MARRIEL, I. E.; DE OLIVEIRA, C. A. e LANA, U. G. D. P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista brasileira de Milho e Sorgo**, v. 13, n. 1, p. 69-81, 2014.

GÓMEZ EXPÓSITO, R.; POSTMA, J.; RAAIJMAKERS, J. M. E DE BRUIJN, I. Diversity and Activity of *Lysobacter* Species from Disease Suppressive Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 16 nov. 2015.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GSCHWIND, R.; PEROVIC, S. U.; WEISS, M.; PETITJEAN, M.; LAO, J.; COELHO, L. P. e RUPPÉ, E. ResFinderFG v2. 0: a database of antibiotic resistance genes obtained by functional metagenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W493-W500, 2023.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N. e CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *subtilis* and *cereus* clades of species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753–5798, 28 out. 2020.

HAIKARA, A.; HELANDER, I. *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. *Em: The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US, 2006. p. 965–981.

HALL, P. G.; KRIEG, N. R. Application of the Indirect Immunoperoxidase Stain Technique to the Flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 433–435, 1984.

HALKET, G.; HERRON, P.; MUNRO, C. Isolation of thermophilic Actinobacteria from compost and identification of bioactive compounds with antimicrobial properties. **Access Microbiology**, v. 2, n. 7A, p. 954, 10 jul. 2020.

HAN, H. S.; LEE, S. Y.; OH, S. Y.; MOON, H. W.; CHO, H. E KIM, J. H. Correlations of the Gastric and Duodenal Microbiota with Histological, Endoscopic, and Symptomatic Gastritis. **Journal of Clinical Medicine** 2019, Vol. 8, Page 312, v. 8, n. 3, p. 312, 5 mar. 2019.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 195-195, 2005.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I. e LORITO, M. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology** 2004 2:1, v. 2, n. 1, p. 43–56, jan. 2004.

HATAMOTO, M.; KANESHIGE, M.; NAKAMURA, A. E YAMAGUCHI, T. *Bacteroides luti* sp. nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. PART 5, p. 1770–1774, 1 maio 2014.

HAUGWITZ, G. V.; HAN, X.; PFAFF, L.; LI, Q.; WEI, H.; GAO, J.; METHLING, K.; AO, Y.; BRACK, Y.; MICAN, J.; FEILER, C. G.; WEISS, M. S.; BEDNAR, D.; PALM, G. J.; LALK, M.; LAMMERS, M.; DAMBORSKY, J.; WEBER, G.; LIU, W.; BORNSCHEUER, U.T. E WEI, R. Structural Insights into (Tere)phthalate-Ester Hydrolysis by a Carboxylesterase and Its Role in Promoting PET Depolymerization. **ACS Catalysis**, v. 12, n. 24, p. 15259–15270, 16 dez. 2022.

HE, Q.; LI, J.; LIU, Q.; LI, Y.; LIAO, X.; ZHOU, J. E ZHOU, X. Complete Genome Sequence Resource of *Pantoea anthophila* CL1 Causing Soft Rot Disease in *Clausena lansium* (Wampee) in China. **Plant Disease**, v. 107, n. 5, p. 1613–1616, 1 maio 2023.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 1 mar. 2001.

HERRERA-HIDALGO, L.; ALARCÓN, A.; LÓPEZ-CORTES, L. E.; LUQUE-MARQUEZ, R.; LÓPEZ-CORTES, L. F.; GUTIÉRREZ-VALENCIA, A. e GIL-NAVARRO, M. V. Enterococcus faecalis endocarditis and outpatient treatment: a systematic review of current alternatives. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 657, 2020.

HERRIDGE, D.F.; GILLER, K.E.; JENSEN, E.S. et al. Quantifying country-to-global scale nitrogen fixation for grain legumes: I. Reliance on nitrogen fixation of soybean, groundnut and pulses. **Plant and Soil**, p. 1-14, 2021.

HERRIDGE D.F.; PEOPLES M.B.; BODDEY R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and soil**, v. 311, p. 1-18, 2008.

HEYLEN, K.; LEBBE, L.; VOS, P. DE. *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 58, n. Pt 1, p. 73–77, jan. 2008.

HIRAOKA, S.; YANG, C. C.; IWASAKI, W. Metagenomics and Bioinformatics in Microbial Ecology: Current Status and Beyond. **Microbes and Environments**, v. 31, n. 3, p. 204–212, 2016.

HOWARD, G. T.; NORTON, W. N.; BURKS, T. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. **Biodegradation**, v. 23, n. 4, p. 561–573, 7 jul. 2012.

HUNGRIA, M.; BARBOSA, J.Z.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v.114, n.5, p.2969-2980, 2022.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA M; FRANCHINI J.C.; CAMPO R.J.; GRAHAM P.H. A importância da fixação de nitrogênio na cultura da soja na América do Sul. In: Newton WE (ed) Fixação de nitrogênio: origens, aplicações e progresso da pesquisa, v.4, Werner W, Newton WE (Ed) Fixação de nitrogênio na agricultura, silvicultura, ecologia e meio ambiente. **Springer**, Dordrecht, Amsterdã, 2005. p. 25–42.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Tecnologia de coinoculação: rizóbios e *Azospirillum* em soja e feijoeiro. **Embrapa Soja**, 2014.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Fixação biológica do nitrogênio. In: MEYER, M C.; BUENO, A.F.; MAZARO, S.M.; SILVA, J. C. **Bioinsumos na Cultura da Soja**. (Eds.). 2022. Embrapa: Brasília, Brasil. p. 141-162.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American journal of Plants Sciences**, v.6, p.811-817, 2015.

HUNGRIA, M.; O'HARA, G.W.; ZILLI, J.E.; ARAÚJO, R.S.; DEAKER, R. AND HOWIESON, J.G. Isolation and growth of rhizobia. In: HOWIESON J.G. e DILWORTH M.J. **Working with rhizobia**. (Eds.). 2016. Australian Centre for International

Agricultural Research: Canberra. p. 39-60.

HUTCHISON, J. M.; POUST, S. K.; KUMAR, M.; CROPEK, D. M.; MACALLISTER, I. E.; ARNETT, C. M. E ZILLES, J. L. Perchlorate reduction using free and encapsulated *Azospira oryzae* enzymes. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 17, p. 9934–9941, 2 set. 2013.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, set. 2007.

JANGIR, M.; PATHAK, R.; SHARMA, S. e SHARMA, S. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Biological Control**, v. 123, p. 60–70, 1 ago. 2018.

JEON, H. H. ; KIM, K. H.; CHUN, B. H.; RYU, B. H.; HAN, N. S. E JEON, C. O. A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Jonggajibkimchii* subsp. nov. and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. based on complete genome sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2225–2230, 1 jul. 2017.

JETT, B. D.; HATTER, K. L.; HUYCKE, M. M. e GILMORE, M. S. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. **Biotechniques**, v. 23, n. 4, p. 648-650, 1997.

JIA, X.; ZHAO, K.; ZHAO, J.; LIN, C.; ZHANG, H.; CHEN, L.; CHEN, J. E FANG, Y. Degradation of poly(butylene adipate-co-terephthalate) films by *Thermobifida fusca* FXJ-1 isolated from compost. **Journal of Hazardous Materials**, v. 441, p. 129958, 5 jan. 2023.

JIANG, S.; CAI, L.; LV, L. LI, L. *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. **Microbial Cell Factories** 2021, v. 20, n. 1, p. 1–14, 16 fev. 2021.

JOCHUM, M. D.; MCWILLIAMS, K. L.; BORREGO, E. J.; KOLOMIETS, M. V.; NIU, G.; PIERSON, E. A.; e JO, Y. K. Bioprospecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Mitigate Drought Stress in Grasses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 466447, 10 set. 2019.

JONES, F. Os primeiros inoculantes. FAPESP. Nov, 2019. Ed 285. Disponível em: <<https://revistapesquisa.fapesp.br/os-primeiros-inoculantes/>> Acesso em: 3 set. 2023.

JONES, R. M.; HEDRICH, S.; JOHNSON, D. B. *Acidocella aromatica* sp. nov.: An acidophilic heterotrophic alphaproteobacterium with unusual phenotypic traits. **Extremophiles**, v. 17, n. 5, p. 841–850, 25 set. 2013.

JUVONEN, R.; SUIHKO, M. L. *Megasphaera paucivorans* sp. nov., *Megasphaera sueciensis* sp. nov. and *Pectinatus haikarae* sp. nov., isolated from brewery samples, and emended description of the genus *Pectinatus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. Pt 4, p. 695–702, abr. 2006.

KAI, Marco. Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 559, 2020.

KAMALASKAR, L. B.; DHAKEPHALKAR, P. K.; MEHER, K. K. e RANADE, D. R. High biohydrogen yielding *Clostridium* sp. DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant. **International journal of hydrogen energy**, v. 35, n. 19, p. 10639-10644, 2010.

KÄMPFER, P.; BUSSE, H. J.; MCINROY, J. A. E GLAESER, S. P. *Paracandidimonas soli* gen. Nov., sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1740–1745, 1 jun. 2017.

KANG, X.; LI, X. D.; LUO, C. Y.; XIN, W. G.; ZHOU, H. Y.; WANG, F. E LIN, L. B. Effects of Dietary Supplementation of *Lactocaseibacillus Chiayiensis* AACE3 on Hepatic Antioxidant Capacity, Immune Factors and Gut Microbiology in Nandan Yao Chicks. **Antibiotics**, v. 12, n. 9, p. 1356, 23 ago. 2023.

KANNIAH GOUD, R.; ARUNASRI, K.; YERUVA, D. K.; KRISHNA, K. V.; DAHIYA, S. E MOHAN, S. V. Impact of selectively enriched microbial communities on long-term fermentative biohydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 253–264, 1 out. 2017.

KAVAMURA, V.; SANTOS, S.N.; Silva, J.L.; PARMA, M.M.; AVILA, L.A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T.D.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of Brazilian Cacti Rhizobacteria for Plant Growth Promotion Under Drought. **Microbiological Research**, v. 168, p. 183 – 191, 2013.

KE, X.; TANG, S. Q.; GUO, T. T.; PAN, L.; XUE, Y. P. E. ZHENG, Y. G. Characterization of *Acinetobacter indicus* ZJB20129 for heterotrophic nitrification and aerobic denitrification isolated from an urban sewage treatment plant. **Bioresource Technology**, v. 347, p. 126423, 1 mar. 2022.

KEIS, S.; SHAHEEN, R.; JONES, D. T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2095–2103, 1 nov. 2001.

KESWANI, C.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. *Beauveria bassiana*: Status, Mode of action, Applications and Safety issues. **Biotech Today**, v. 3, n. 1, p. 16, 2013.

KHALIL, A. B.; SIVAKUMAR, N.; ARSLAN, M.; SALEEM, H. E. QARAWI, S. Insights into *Brevibacillus borstelensis* AK1 through Whole Genome Sequencing: A Thermophilic Bacterium Isolated from a Hot Spring in Saudi Arabia. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

KIM, E.; YANG, S. M.; KIM, H. Y. Differentiation of *Lacticaseibacillus zae* using pan-genome analysis and real-time pcr method targeting a unique gene. **Foods**, v. 10, n. 9, 1 set. 2021.

KIM, E.; YANG, S. M.; KIM, H. Y. Differentiation of *lacticaseibacillus zae* using pan-genome analysis and real-time pcr method targeting a unique gene. **Foods**, v. 10, n. 9, p. 2112, 2021.

KIM, J. F.; JEONG, H.; LEE, J. S.; CHOI, S. H.; HA, M.; HUR, C. G.; KIM, J. S.; LEE, S.; PARK, H. S.; PARK, Y. H. E OH, T. K. Complete Genome Sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 8, p. 3093–3094, abr. 2008.

KIM, Y. O.; PARK, S.; PARK, I. S.; NAM, B. H.; KIM, D. G. e YOON, J. H. *Empedobacter tilapiae* sp. nov., isolated from an intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 2781-2786, 2019.

KRAMER, T.; KELLEHER, P.; VAN DER MEER, J.; O'SULLIVAN, T.; GEERTMAN, J. M. A.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. E LOUIS, P. Comparative genetic and physiological characterisation of *Pectinatus* species reveals shared tolerance to beer-

associated stressors but halotolerance specific to pickle-associated strains. **Food Microbiology**, v. 90, p. 103462, 1 set. 2020.

KUBOTA, H.; NAKAYAMA, T.; ARIYOSHI, T.; UEHARA, S.; UCHITANI, Y.; TSUCHIDA, S.; ... SADAMASU, K. Emergence of *Phytobacter diazotrophicus* carrying an IncA/C2 plasmid harboring blaNDM-1 in Tokyo, Japan. **mSphere**, v. 8, n. 4, 14 jul. 2023.

KUBI, H. A. A.; KHAN, M. A.; ADHIKARI, A.; IMRAN, M.; KANG, S. M.; HAMAYUN, M. e LEE, I. J. Silício e rizobactérias promotoras de crescimento de plantas *Pseudomonas psychrotolerans* CS51 mitigam o estresse salino em *Zea mays* L. **Agriculture**, v. 3, pág. 272, 2021.

KUDASHEV, I. S. The effect of phosphobacterin on the yield and protein content in grains of Autumn wheat, maize and soybean. **Doki Akad Skh Nauk**, v. 8, p. 20–23, 1956.

KUHNER, C. H.; MATTHIES, C.; ACKER, G.; SCHMITTROTH, M.; GÖßNER, A. S. E DRAKE, H. L. *Clostridium akagii* sp. nov. and *Clostridium acidisoli* sp. nov.: acid-tolerant, N₂-fixing clostridia isolated from acidic forest soil and litter. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50 Pt 2, n. 2, p. 873–881, 2000.

KUMAR, H.; SALMINEN, S. Probiotics. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 510–515, 14 set. 2015.

KUMAR, U.; PANNEERSELVAM, P.; GUPTA, V. V.; MANJUNATH, M.; PRIYADARSHINEE, P.; SAHOO, A.; DASH, R. S.; KAVIRAJ, M. E ANNAPURNA, K. Diversity of Sulfur-Oxidizing and Sulfur-Reducing Microbes in Diverse Ecosystems. p. 65–89, 2018.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; PRATUSH, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 25 jun. 2014.

KURAMAE, E. E.; DERKSEN, S.; SCHLEMPER, T. R.; DIMITROV, M. R.; COSTA, O. Y. E DA SILVEIRA, A. P. Sorghum Growth Promotion by *Paraburkholderia tropica* and

Herbaspirillum frisingense: Putative Mechanisms Revealed by Genomics and Metagenomics. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 725, 13 maio 2020.

LAKRA, A. K.; DOMDI, L.; HANJON, G.; TILWANI, Y. M. E ARUL, V. Some probiotic potential of *Weissella confusa* MD1 and *Weissella cibaria* MD2 isolated from fermented batter. **LWT**, v. 125, p. 109261, 1 maio 2020.

LANA, U. G. P.; TAVARES, A. N. G.; AGUIAR, F. M.; GOMES, E. A. e VALICENTE, F. H. Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema "on farm". 1ª Ed. **Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 191, p. 1-23. 2019.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L. e PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 20, p. 6955-6959, 1985.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods** 2012 9:4, v. 9, n. 4, p. 357–359, 4 mar. 2012.

LEGGETT, M.; DIAZ-ZORITA, M.; KOIVUNEN, M.; BOWMAN, R.; PESEK, R.; STEVENSON, C. E LEISTER, T. Soybean Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1031–1038, 1 maio 2017.

LIN, S. Y.; HAMEED, A.; HSIEH, Y. T. E YOUNG, C. C. *Mesorhizobium composti* sp. nov., isolated from compost. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 112, n. 9, p. 1387–1398, 15 set. 2019.

LIN, S. Y.; TSAI, C. F.; HAMEED, A. E YOUNG, C. C. *Aeromicrobium terrae* sp. nov., isolated from a maize field. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 004616, 2021.

LINO, T.; SUZUKI, R.; KOSAKO, Y.; OHKUMA, M.; KOMAGATA, K. E UCHIMURA, T. *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 235–243, 2012.

LIOU, J. S. C.; BALKWILL, D. L.; DRAKE, G. R. E TANNER, R. S. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 2085–2091, 1 set. 2005.

LIU, L.; JIAO, J. Y.; FANG, B. Z.; LV, A. P.; MING, Y. Z.; LI, M. M.; SALAM, N. E LI, W.J. Isolation of *Clostridium* from Yunnan-Tibet hot springs and description of *Clostridium thermarum* sp. nov. with lignocellulosic ethanol production. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 126104, 1 set. 2020.

LIU, L.; LIU, M.; JIANG, Y.; LIN, W. e LUO, J. Production and Excretion of Polyamines To Tolerate High Ammonia, a Case Study on Soil Ammonia-Oxidizing Archaeon “*Candidatus Nitrosocosmicus agrestis*”. **Msystems**, v. 6, n. 1, p. 10.1128/msystems.01003-20, 2021.

LONG, G. Y.; WEI, Y. X.; TU, W. E GU, C. T. *Lactobacillus hegangensis* sp. Nov., *Lactobacillus suibinensis* sp. nov., *Lactobacillus daqingensis* sp. nov., *Lactobacillus yichunensis* sp. nov., *Lactobacillus mulanensis* sp. nov., *Lactobacillus achengensis* sp. nov., *Lactobacillus wuchangensis* sp. nov., *Lactobacillus gannanensis* sp. nov., *Lactobacillus binensis* sp. nov. and *Lactobacillus angrenensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and yogurt. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2467–2484, 26 fev. 2020.

LU, Q.; Sun, X.; Jiang, Z.; Cui, Y.; Li, X. e Cui, J. Effects of *Comamonas testosteroni* on dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons and the response of endogenous bacteria for soil bioremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 54, p. 82351-82364, 2022.

MACHADO, D. F. M.; TAVARES, A. P.; LOPES, S. J. e DA SILVA, A. C. F. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de Cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p. 167–176, 2015.

MANAIA, C. M.; MOORE, E. R. B. *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2203–2209, 1 nov. 2002.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **MAPA registra recorde de 95 defensivos de controle biológico em 2020.** 2021. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/Mapa-registra-recorde-de-95-defensivos-biologicos-em-2020>>. Acesso em: 14 jan. 2024.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa Nacional de Bioinsumos é lançado e vai impulsionar uso de recursos biológicos na agropecuária.** 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/programa-nacional-de-bioinsumos-e-lancado-e-vai-impulsionar-uso-de-recursos-biologicos-na-agropecuaria-brasileira>>. Acesso em: 3 set. 2023.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Portaria Conjunta SDA/MAPA - IBAMA - ANVISA n.º 1, de 10 de abril de 2023 - Estabelece procedimentos a serem adotados para o registro de produtos microbiológicos empregados no controle de pragas ou como desfolhantes, dessecantes, estimuladores, inibidores de crescimento, além de revogar os atos normativos vigentes, pertinentes à esta matéria: Instrução Normativa Conjunta Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/Anvisa/Ibama nº 03 de 10 de março de 2006 e o Ato CGAA/DSV/SDA nº 06, de 23 de janeiro de 2014.** 2023. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-conjunta-sda/mapa-ibama-anvisa-n-1-de-10-de-abril-de-2023-480871674>>. Acesso em: 14 jan. 2024.

MARATHE, N. P.; SHETTY, S. A.; LANJEKAR, V. B.; RASANE, M. H.; RANADE, D. R. E SHOUCHE, Y. S. Genome sequencing of multidrug resistant novel *Clostridium* sp. BL8 reveals its potential for pathogenicity. **Gut Pathogens**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 18 jul. 2014.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. D. S.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. **Embrapa – Agrobiologia**. Comunicado Técnico. Rio de Janeiro, 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Katia-Teixeira/publication/237613129_Fixacao_Biologica_de_Nitrogenio_Bacterias_Fixadoras_de_Nitrogenio_de_Importancia_para_a_Agricultura_Tropical/links/0046352dd214cc4810000000/Fixacao-Biologica-de-Nitrogenio-Bacterias-Fixadoras-de-Nitrogenio-

de-Importancia-para-a-Agricultura-Tropical.pdf> Acesso em: 5 set. 2023.

MARTINS, S.J.; FARIA, A.F.; PEDROSO, P.; CUNHA, M.G.; ROCHA, M.R.; MEDEIROS, F.H.V. Microbial volatiles organic compounds control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Control**, v. 131, p. 36-42, 2019.

MASCARIN, G. M.; JARONSKI, S. T. The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 1–26, 15 set. 2016.

MAURICIO FILHO, J.; SILVA, C. H. S.; DE SOUZA, J. E. B. Desempenho Agronômico e Produtividade da Cultura da Soja com a Co-inoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum brasilense*. **Ipê Agronomic Journal**, v. 2, n. 2, p. 46–57, 16 nov. 2018.

MEEHAN, C. J.; BEIKO, R. G. A Phylogenomic View of Ecological Specialization in the Lachnospiraceae, a Family of Digestive Tract-Associated Bacteria. **Genome Biology and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 703–713, 1 mar. 2014.

MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Embrapa Cerrados: 37 anos de contribuições para o avanço da FBN no Brasil. In: **Anais da XVI RELARE** – Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola. Londrina: Embrapa Soja, 2014. p. 60-61. (Embrapa Soja. Documentos, 350)

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. **Microorganisms 2020, Vol. 8**, v. 8, n. 7, p. 1037, 13 jul. 2020.

MIGUEL, L.; VIEIRA, R. **Classificação taxonômica de procariotas com base em sequências simuladas do gene 16S rRNA**. 2017. Dissertação (Mestrado em Bioinformática e Biologia Computacional)- Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

MIRETE, S.; MORGANTE, V.; GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. Functional metagenomics of extreme environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 143–149, 1 abr. 2016.

MITRA, S.; PRAMANIK, K.; GHOSH, P. K.; SOREN, T.; SARKAR, A.; DEY, R. S.; PANDEY, S. E MAITI, T. K. Characterization of Cd-resistant *Klebsiella michiganensis* MCC3089 and its potential for rice seedling growth promotion under Cd stress. **Microbiological research**, v. 210, p. 12-25, 2018.

MOENS, F.; LEFEBER, T.; VUYST, L. DE. Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1848–1857, 15 mar. 2014.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; da SILVA, E. Y. Y.; GARCIA, A.; CASTRO, A.R.M.; ROCHA, G.T.; FERREIRA, A.D.C.L; e GOMES, A. **Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura (Documento 369)**. 1ª Ed. Brasília, 2020. p. 1-47.

MOSCARDI, F. Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. Embrapa Soja. **Circular Técnica**, p. 21, 1983.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; HJORT, K.; ROOS, S. e GRANHALL, U. Characterization of Rhizobacteria Isolated from Wild *Coffea arabica* L. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 2, p. 100–108, 1 abr. 2009.

MUNNA, Md Sakil; ZEBA, Zebunnesa; NOOR, Rashed. Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*. **Stamford journal of microbiology**, v. 5, n. 1, p. 9-12, 2016.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, 2016.

MURAS, A.; ROMERO, M.; MAYER, C. E OTERO, A. Biotechnological applications of *Bacillus licheniformis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 609–627, 2021.

NALIN, R.; SIMONET, P.; VOGEL, T. M. E NORMAND, P. *Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1, p. 19–23, 1 jan. 1999.

NASCIMENTO, F. X.; HERNÁNDEZ, A. G.; GLICK, B. R. e ROSSI, M. J. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00406, 1 mar. 2020.

NARAYAN, K. D.; PANDEY, S. K.; DAS, S. K. Characterization of *Comamonas thiooxidans* sp. nov., and comparison of thiosulfate oxidation with *Comamonas testosteroni* and *Comamonas composti*. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 248–253, 2010.

NCBI- National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine, 2024. < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> > Acessado em 3 jan. 2024.

NGARA, T. R.; ZHANG, H. Recent advances in function-based metagenomic screening. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 16, n. 6, p. 405-415, 2018.

NICAISE, B.; MAALOU, M.; LO, C. I.; ARMSTRONG, N.; BRETELLE, F.; FOURNIER, P. É.; DIOP, K. E FENOLLAR, F. Taxono-genomics description of '*Lactobacillus raoultii* sp. nov.', strain Marseille-P4006T, a new *Lactobacillus* species isolated from the female genital tract of a patient with bacterial vaginosis. **New Microbes and New Infections**, v. 29, p. 100534, 1 maio 2019.

NINGSIH, F.; SARI, D. C. A. F.; YABE, S.; YOKOTA, A.; OETARI, A. E SJAMSURIDZAL, W. Antibacterial activity of *Microbispora rosea* subsp. *rosea* SL3- 2-R-1 grown on different media and solidifying agents. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1918, n. 5, p. 052011, 1 jun. 2021.

NISENBAUM, M.; CORTI-MONZÓN, G.; VILLEGAS-PLAZAS, M.; JUNCA, H.; MANGANI, A.; PATAT, M. L.; GONZÁLEZ, J. F. e MURIALDO, S. E. Enrichment and key features of a robust and consistent indigenous marine-cognate microbial consortium growing on oily bilge wastewaters. **Biodegradation**, v. 31, p. 91-108, 2020.

NÚÑEZ-MONTERO, K.; SALAZAR, R.; SANTOS, A.; GÓMEZ-ESPINOZA, O.; FARAH, S.; TRONCOSO, C.; HOFFMANN, C.; MELIVILU, D.; SCOTT, F. E DÍAZ, L.

B. Antarctic *Rahnella inusitata*: A producer of cold-stable β -galactosidase enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8, p. 4144, 2 abr. 2021.

NURK, S.; MELESHKO, D.; KOROBAYNIKOV, A. e PEVZNER, P.A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome Research**, v. 27, n. 5, p. 824-834, 2017.

O'HARA, G.W.; ZILLI, J.E.; POOLE, P.S. AND HUNGRIA, M. Taxonomy and physiology of rhizobia. In: HOWIESON J.G. e DILWORTH M.J. **Working with rhizobia**. (Eds.). 2016. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra. p. 125-144.

OHTSUBO, Y.; NAGATA, Y.; NUMATA, M.; TSUCHIKANE, K.; HOSOYAMA, A.; YAMAZOE, A.; TSUDA, M.; FUJITA, N. e KAWAI, F. Complete genome sequence of polyvinyl alcohol-degrading strain *Sphingopyxis* sp. 113P3 (NBRC 111507). **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 10.1128/genomea.01169-15, 2015.

OLIVEIRA, E. M. DE; SALES, V. H. G.; DIAS, E. D. C.; BORGES, W. L.; ANDRADE, M. S. E DE SOUZA, T. M. Diferentes estratégias para aumentar a produção de biossurfactante de um isolado de *Paenibacillus* sp. (BR13834). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 17, p. e44101724232, 20 dez. 2021.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an Oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782–1787, 1 set. 2009.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D. e FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **MultiCiência**, Campinas, v. 7, p. 1-19, 2006.

OUYANG, L.; WANG, K.; LIU, X.; WONG, M. H.; HU, Z.; CHEN, H.; YANG, X. E LI, S. A study on the nitrogen removal efficacy of bacterium *Acinetobacter tandoii* MZ-5 from a contaminated river of Shenzhen, Guangdong Province, China. **Bioresource Technology**, v. 315, p. 123888, 1 nov. 2020.

PABARI, K.; PITHVA, S.; KOTHARI, C.; PURAMA, R. K.; KONDEPUDI, K. K.; VYAS,

B. R. M.; KOTHARI, R. E AMBALAM, P. Evaluation of Probiotic Properties and Prebiotic Utilization Potential of *Weissella paramesenteroides* Isolated From Fruits. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1126–1138, 1 set. 2020.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 9, n. 1, p. 1-55, 1986.

PADMAVATHI, J.; DEVI, K.U.; RAO, C U. M. The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* - A potential biopesticide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 469–477, jul. 2003.

PAHO- Pan American Health Organization. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. 2017. <<https://www.paho.org/pt/noticias/27-2-2017-oms-publica-lista-bacterias-para-quais-se-necessitam-novos-antibioticos>>Acessado em 9 fev. 2024.

PAN, L.; WANG, Q.; QU, L.; LIANG, L.; HAN, Y.; WANG, X. e ZHOU, Z. Pilot-scale production of exopolysaccharide from *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and its application in set yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 2, p. 1072-1083, 2022.

PANPATTE, D. G.; JHALA, Y. K.; SHELAT, H. N. e VYAS, R. V. *Pseudomonas fluorescens*: A promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 1: Research Perspectives**, p. 257–270, 1 jan. 2016.

PARAGES, M. L.; GUTIÉRREZ-BARRANQUERO, J. A.; REEN, F. J.; DOBSON, A. D.; O'GARA, F. Integrated (meta) genomic and synthetic biology approaches to develop new biocatalysts. **Marine Drugs**, v. 14, n. 3, p. 62, 2016.

PARK, Y. S.; DUTTA, S.; ANN, M.; RAAIJMAKERS, J. M. e PARK, K. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 2, p. 361–365, 2015.

PARTE, A. C.; SARDÀ CARBASSE, J.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; REIMER, L. C. E

GÖKER, M. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 2020.

PASCUAL, J.; GARCÍA-LÓPEZ, M.; CARMONA, C.; SOUSA, T. D. S.; DE PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MARTÍN, J.; VICNETE, F.; REYES, F.; BILLS, G. F. E GENILLOUD, O. *Pseudomonas soli* sp. nov., a novel producer of xantholysin congeners. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 412–416, 1 set. 2014.

PATEL, R. R.; THAKKAR, V. R.; SUBRAMANIAN, B. R. A *Pseudomonas guariconensis* strain capable of promoting growth and controlling collar rot disease in *Arachis hypogaea* L. **Plant and Soil**, v. 390, n. 1–2, p. 369–381, 1 maio 2015.

PATRICK, S. Bacteroides. **Molecular Medical Microbiology**, p. 917–944, 1 jan. 2014.

PRANDO, A.M.; BARBOSA, J.Z.; Oliveira, A.B.; Nogueira, M.A.; POSSAMAI, E.J.; Hungria, M. Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: Large-scale validation with farmers in Brazil. **European Journal of Agronomy**, v. 155, e-127112, 2024.

PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 63–77, 2014.

PEDRAZA, R. O. Acetic acid bacteria as plant growth promoters. **Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology**, p. 101–120, 1 jan. 2016.

PEDRAZA, R. O.; FILIPPONE, M. P.; FONTANA, C.; SALAZAR, S. M.; RAMÍREZ-MATA, A.; SIERRA-CACHO, D. e BACA, B. E. *Azospirillum*. In: **Micróbios Benéficos em Agroecologia**. Imprensa Acadêmica, 2020. p. 73-105.

PEETERS, C.; DE CANCK, E.; CNOCKAERT, M.; DE BRANDT, E.; SNAUWAERT, C.; VERHEYDE, B.; DEPOORTER, E.; SPILKER, T.; LIPUMA, J. J. E VANDAMME, P. Comparative Genomics of *Pandoraea*, a Genus Enriched in Xenobiotic Biodegradation and Metabolism. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 496577, 6 nov. 2019.

PENLAND, M.; MOUNIER, J.; PAWTOWSKI, A.; TRÉGUER, S.; DEUTSCH, S. M. E COTON, M. Use of metabarcoding and source tracking to identify desirable or spoilage

autochthonous microorganism sources during black olive fermentations. **Food Research International**, v. 144, p. 110344, 1 jun. 2021.

PEREIRA, C. R.; DE JESUS SOUSA, T.; DA SILVA, A. L.; DOS SANTOS, R. G.; MINHARRO, S.; CUSTÓDIO, D. A. C.; PIKARD, D. J.; O'CALLAGHAN, D.; FOSTER, J. T.; SOARES, S. C.; RAMOS, R. T. J.; GÓES-NETO, A.; COSTA, M. M.; LAGE, A. P.; AZEVEDO, V. E DORNELES, E. M. S. First report and whole-genome sequencing of *Pseudochrobactrum saccharolyticum* in Latin America. **Microbes and Infection**, v. 25, n. 1-2, p. 105018, 2023.

PETTI, C. A.; POLAGE, C. R.; SCHRECKENBERGER, P. The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6123–6125, 2005.

PINILLOS-MIÑANO, R. M.; RODRIGUEZ-PORTILLA, L. M. I.; HATTA-SAKODA, B. A. E ESTELA-ESCALANTE, W. D. Isolation of Lactic Acid Bacteria from the Feces of Ring-tailed Coati (*Nasua nasua*), Biochemical and Fermentative Aspects Related to Coffee Fermentation. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, n. S1, p. S102–S112, 26 dez. 2022.

QIN, J.; HU, Y.; FENG, Y.; LV, X. E ZONG, Z. *Acinetobacter sichuanensis* sp. nov., recovered from hospital sewage in China. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3897–3901, 1 dez. 2018.

QIN, W.; ZHU, Y.; FAN, F.; WANG, Y.; LIU, X.; DING, A. E DOU, J. Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: Degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 131–138, 15 maio 2017.

QUINTAS-NUNES, F.; ROSSI, M. J.; NASCIMENTO, F. X. Genomic insights into the plant-associated lifestyle of *Kosakonia radicincitans* MUSA4, a diazotrophic plant-growth-promoting bacterium. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 126303, 1 abr. 2022.

RAJABAIRAVI, N.; RAJU, C. S.; KARTHIKEYAN, C.; VARUTHARAJU, K.; NETHAJI, S.; HAMEED, A. S. H. E SHAJAHAN, A. Biosynthesis of novel zinc oxide nanoparticles

(ZnO NPs) using endophytic bacteria *Spingobacterium thalpophilum*. **Springer Proceedings in Physics**, v. 189, p. 245–254, 2017.

RAAIJMAKERS, J. M.; MAZZOLA, M. Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>, v. 50, p. 403–424, 2011.

R CORE TEAM 2022. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>> Acesso em: 3 set. 2023.

RONDINA, A.B.L.; SANZOVO, A.W. dos S.; GUIMARÃES, G.S.; WENDLING, J.R.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 537–549, 2020.

RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; VICENTE, R.; GÓMEZ-ACOSTA, F. A.; MORCUENDE, R.; MONTE, E. e BETTIOL, W. The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 244099, 2017.

SAKAMOTO, M.; OHKUMA, M. Reclassification of *Xylanibacter oryzae* Ueki *et al.* 2006 as *Prevotella oryzae* comb. nov., with an emended description of the genus *Prevotella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 2637–2642, 1 nov. 2012.

SAKAMOTO, M.; IKEYAMA, N.; KUNIHITO, T.; IINO, T.; YUKI, M. E OHKUMA, M. *Mesosutterella multiformis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Sutterellaceae and *Sutterella megalosphaeroides* sp. nov., isolated from human faeces. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3942-3950, 2018.

SAKAMOTO, M.; IKEYAMA, N.; TOYODA, A.; MURAKAMI, T.; MORI, H.; IINO, T. E OHKUMA, M. *Dialister hominis* sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 589-595, 2020.

SALAZAR-RAMÍREZ, M. T.; GALLEGOS-LÓPEZ, D. A.; HERNÁNDEZ-ORDAZ, G.; PRECIADO-RANGEL, P. E. VIDAL, J. A. O. Inoculated Growth Promoting Rhizobacteria in Serrano Chili Pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings under abiotic stress conditions. **Agrociencia**, 15 mar. 2023.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS-MARCOS, J. A.; HARO, C.; VEJA-ROJAS, A.; ALCALA-DIAZ, F. A.; MOLINA-ABRIL, H.; LEON-ACUNÁ, A.; LOPEZ-MORENO, J.; LANDA, B. B.; TENA-SEPERE, M.; PEREZ-MARTINEZ, P.; LOPEZ-MIRANDA, J.; PEREZ-JIMENEZ, F. e CAMARGO, A. Sex Differences in the Gut Microbiota as Potential Determinants of Gender Predisposition to Disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 7, 2019.

SANTOS, A.; DINNAS, S.; FEITOZA, A. Qualidade microbiológica de bioprodutos comerciais multiplicados *on farm* no Vale do São Francisco: dados preliminares. **Enciclopedia Biosfera**, v. 17, n. 34, 2020.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express 2019**, v. 9, n. 1, p. 1–22, 2019.

SATO, K.; TAKE, S.; AHMAD, S. A.; GOMEZ-FUENTES, C. e ZULKHARNAIN, A. Carbazole Degradation and Genetic Analyses of *Sphingobium* sp. Strain BS19 Isolated from Antarctic Soil. **Sustainability 2023, Vol. 15, Page 7197**, v. 15, n. 9, p. 7197, 26 abr. 2023.

SATURNO, D. F.; CEREZINI, P.; MOREIRA DA SILVA, P.; OLIVEIRA, A. B. D.; OLIVEIRA, M. C. N. D.; HUNGRIA, M. e NOGUEIRA, M. A. Mineral nitrogen impairs the biological nitrogen fixation in soybean of determinate and indeterminate growth types. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, n. 12, p. 1690-1701, 2017.

SAVANI, A. K.; BHATTACHARYYA, A.; BARUAH, A. Endophyte mediated activation of defense enzymes in banana plants pre-immunized with covert endophytes. **Indian Phytopathology**, v. 73, n. 3, p. 433–441, 21 set. 2020.

SAXENA, R.; SHARMA, V. K. A Metagenomic Insight Into the Human Microbiome: Its Implications in Health and Disease. **Medical and Health Genomics**, p. 107–119, 2016.

SCHMIDT, V. S. J.; WENNING, M.; SCHERER, S. *Sphingobacterium lactis* sp. nov. and *Sphingobacterium alimentarium* sp. nov., isolated from raw milk and a dairy environment. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, n. Pt 7, p. 1506–1511, jul. 2012.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W. R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 955–962, 2007.

SCHNEIDER, M.; BÄUMLER, M.; LEE, N. M.; WEUSTER-BOTZ, D.; EHRENREICH, A. e LIEBL, W. Monitoring co-cultures of *Clostridium carboxidivorans* and *Clostridium kluyveri* by fluorescence in situ hybridization with specific 23S rRNA oligonucleotide probes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 126271, 1 nov. 2021.

SCHOLTEN-KOERSELMAN, I. *et al.* *Bacteroides xylyanolyticus* sp. nov., a xylyanolytic bacterium from methane producing cattle manure. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 52, n. 6, p. 543–554, nov. 1986.

SHARMA, A.; HOUWAARD, F.; JANSSEN, P. e ZEHNDER, A. J. Impact of carbendazim on cellular growth, defence system and plant growth promoting traits of *Priestia megaterium* ANCB-12 isolated from sugarcane rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1005942, 20 dez. 2022.

SHARON, I.; MOROWITZ, M. J.; THOMAS, B. C.; COSTELLO, E. K.; RELMAN, D. A. e BANFIELD, J. F. Time series community genomics analysis reveals rapid shifts in bacterial species, strains, and phage during infant gut colonization. **Genome Research**, v. 23, n. 1, p. 111–120, 2013.

SHAZMIN; AHMAD, S. A.; NAQVI, T. A.; MUNIS, M. F. H.; JAVED, M. T. e CHAUDHARY, H. J. Biodegradation of monocrotophos by *Brucella intermedia* Msd2 isolated from cotton plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 1–13, 1 jun. 2023.

SHETTY, S. A.; MARATHE, N. P.; LANJEKAR, V.; RANADE, D. e SHOUCHE, Y. S. Comparative genome analysis of *Megasphaera* sp. reveals niche specialization and its potential role in the human gut. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79353, 2013.

SILVA, M. B. **Programa Nacional de Bioinsumos: história, situação atual e perspectivas futuras. 2021.** 67 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

SINGH, A.; SHAHID, M.; SRIVASTAVA, M.; PANDEY, S.; SHARMA, A. e KUMAR, V. Optimal Physical Parameters for Growth of *Trichoderma* Species at Varying pH. **Temperature and Agitation. Virol Mycol**, v. 3, p. 127, 2014.

SINGH, O.; GUPTA, M.; MITTAL, V.; KIRAN, S.; NAYYAR, H.; GULATI, A. e TEWARI, R. Novel phosphate solubilizing bacteria '*Pantoea cypripedii* PS1' along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant growth regulation**, v. 73, p. 79-89, 2014.

SINGH, S. K.; PATHAK, R.; CHOUDHARY, V. Plant growth-promoting rhizobacteria-mediated acquired systemic resistance in plants against pests and diseases. **Microbial-Mediated Induced Systemic Resistance in Plants**, p. 125–134, 2016.

SINNO, M.; RANESI, M.; LELIO, I. D.; IACOMINO, G.; BECCHIMANZI, A.; BARRA, E.; DONATA, M.; PENNACCHIO, F.; DIGILIO, M. C.; VITALE, S.; TURRÁ, D.; HARIZANOVA, V.; LORITO, M. e WOO, S. L. Selection of Endophytic *Beauveria bassiana* as a Dual Biocontrol Agent of Tomato Pathogens and Pests. **Pathogens** v. 10, n. 10, p. 1242, 2021.

SILVEIRA, É. L. da. **Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rRNA.** 2004. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2004.

SITLAOTHAWORN, K.; BUDSABUN, T.; DECHKLA, M.; YUKPHAN, P.; TANASUPAWAT, S. e SAVARAJARA, A. Identification and plant growth-promoting activity of endophytic bacteria from sugarcane roots and genome analysis of *Gluconacetobacter* strain PS25. **ScienceAsia**, v. 49, n. 2, p. 161, 2023.

SMIT, A. M.; STRABALA, T. J.; PENG, L.; RAWSON, P.; LLOYD-JONES, G. e JORDAN, T. W. Proteomic phenotyping of *Novosphingobium nitrogenifigens* reveals a

robust capacity for simultaneous nitrogen fixation, polyhydroxyalkanoate production, and resistance to reactive oxygen species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 14, p. 4802–4815, jul. 2012.

SOESANTO, L.; LATIFAH, S.; MANAN, A.; MUGIASTUTI, E. e SUHARTI, W. S. Various pH Media Influence Production of *Pseudomonas fluorescens* P20 Raw Secondary Metabolites for Controlling Damping-off (*Pythium* sp.) in Cucumber Seedlings. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, v. 44, n. 1, p. 178-186, 2022.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. **Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. Springer-Verlag, New York, 1994.

SONG, L.; DONG, X. *Hydrogenoanaerobacterium saccharovorans* gen. nov., sp. nov., isolated from H₂-producing UASB granules. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 295–299, 1 fev. 2009.

SOOD, M.; KAPOOR, D.; KUMAR, V.; SHETEIWY, M. S.; RAMAKRISHNAN, M.; LANDI, M.; ARANITI, F. e SHARMA, A. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. **Plants**, v. 9, n. 6, p. 762, 2020.

SOUSA, S. M. de; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; ANDRADE, D. L.; CARVALHO, C. G. de; RIBEIRO, V. P.; PASTINA, M. M.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. de P.; GOMES, E. A. Tropical *Bacillus* Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 2, p. 867–877, 2021.

STADERMANN, K. B.; BLOM, J.; BORGMEIER, C.; SCIBERRAS, N.; HERBOLD, S.; KIPKER, M.; MEURER, G.; MOLCK, S.; PETRI, D.; PELZER, S. e SCHNEIDER, J. First complete genome sequence of *Bacillus glycinifermentans* B-27. **Journal of Biotechnology**, v. 257, p. 187–191, 10 set. 2017.

STENBERG, J. A.; SUNDH, I.; BECHER, P. G.; BJÖRKMAN, C.; DUBEY, M.; EGAN, P. A.; FRIBERG, H.; GIL, J. F.; JENSEN, D. F.; JONSSON, M.; KARLSSON, M.; KHALIL, S.; NINKOVIC, V.; REHERMANN, G.; VETUKURI, R. R. e Viketoft, M. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. **Journal of Pest Science**, v. 94, n. 3, p. 665–676, 2021.

SUN, L. N.; ZHANG, J.; CHEN, Q.; HE, J.; LI, Q. F. e LI, S. P. *Comamonas jiangduensis* sp. nov., a biosurfactant-producing bacterium isolated from agricultural soil. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt 6, p. 2168–2173, 1 jun. 2013.

TAN, L. L.; NGIAM, J. J.; SIM, E. S. Z.; CONWAY, P. L. e LOO, S. C. J. *Liquorilactobacillus satsumensis* from water kefir yields α -glucan polysaccharides with prebiotic and synbiotic qualities. **Carbohydrate Polymers**, v. 290, p. 119515, 15 ago. 2022.

TASHKANDY, N.; SABBAN, S.; FAKIEH, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; HUANG, S.; TINDALL, B. J.; ROHDE, M.; BAESHEN, M. N.; BAESHEN, N. A.; LAPIDUS, A.; COPELAND, A.; PILLAY, M.; REDDY, T. B. K.; HUNTEMANN, M.; PATI, A.; IVANOVA, N.; MARKOWITZ, V.; WOYKE, T.; GOKER, M.; KLENK, H. P.; KYRPIDES, N. C. e HAHNKE, R. L. High-quality draft genome sequence of *Flavobacterium suncheonense* GH29-5T (DSM 17707T) isolated from greenhouse soil in South Korea, and emended description of *Flavobacterium suncheonense* GH29-5T. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 16 jun. 2016.

TELLES, T.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. **Environmental Technology and Innovation**, v. 31, e-103158, 2023.

THATOI, H.; RATH, S.; KHETI, N. K. Optimisation of Manganese Peroxidase (MnP) Activity of *Enterobacter wuhouensis* Using Response Surface Method and Evaluation of Its Maillard Reaction Products Along with Lignin Degradation Ability. **Indian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 604-620, 2023.

TIDONA, F.; MEUCCI, A.; POVOLO, M.; PELIZZOLA, V.; ZAGO, M.; CONTARINI, G.; CARMINATI, D. e GIRAFFA, G. Applicability of *Lactococcus hircilactis* and *Lactococcus laudensis* as dairy cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 271, p. 1–7, 20 abr. 2018.

TOFFIN, L.; ZINK, K.; KATO, C.; PIGNET, P.; BIDAULT, A.; BIENVENU, N.; BIRRIEN, J. L. e PRIEUR, D. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough.

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 55, n. Pt 1, p. 345–351, jan. 2005.

TORRES-MIRANDA, A.; MELIS-ARCOS, F.; GARRIDO, D. Characterization and Identification of Probiotic Features in *Lacticaseibacillus Paracasei* Using a Comparative Genomic Analysis Approach. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 14, n. 6, p. 1211–1224, 1 dez. 2022.

TRINH, C. S.; LEE, H.; LEE, W. J.; LEE, S. J.; CHUNG, N.; HAN, J.; KIM, J.; HONG, S. W. e LEE, H. Evaluation of the plant growth-promoting activity of *Pseudomonas nitroreducens* in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa*. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 6, p. 873–885, 1 jun. 2018.

UEKI, A.; AKASAKA, H.; SATOH, A.; SUZUKI, D. e UEKI, K. *Prevotella paludivivens* sp. nov., a novel strictly anaerobic, Gram-negative, hemicellulose-decomposing bacterium isolated from plant residue and rice roots in irrigated rice-field soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1803–1809, 1 ago. 2007.

UEKI, A.; TONOUCI, A.; KAKU, N. E UEKI, K. *Prevotella herbatica* sp. nov., a plant polysaccharide-decomposing anaerobic bacterium isolated from a methanogenic reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 005221, 2022.

VALE, A. S.; VENTURIM, B. C., DA SILVA ROCHA, A. R. F.; MARTIN, J. G. P.; MASKE, B. L.; BALLA, G.; LINDNER, J. D.; SOCCOL, C. R. E PEREIRA, G. V. M. Exploring Microbial Diversity of Non-Dairy Fermented Beverages with a Focus on Functional Probiotic Microorganisms. **Fermentation**, v. 9, n. 6, p. 496, 2023.

VALLINO, M.; ROSSI, M.; OTTATI, S.; MARTINO, G.; GALETTO, L.; MARZACHÌ, C. e ABBÀ, S. Bacteriophage-host association in the phytoplasma insect vector *euscelidius variegatus*. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 612, 1 maio 2021.

VALICENTE, F. H.; LANA, U. G. de P.; PEREIRA, A. C. P.; MARTINS, J. L. A.; TAVARES, A. N. G. Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis*. **Circular Técnica**, v. 239, p. 20, 2018.

VELLOSO, C. C. V.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.;

CARVALHO, C. G.; GUIMARÃES, L. J. M.; PASTINA, M. M.; SOUSA, S. M. de. Genome-guided insights of tropical *Bacillus* strains efficient in maize growth promotion. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 9, p. 157, 2020.

VERMA, S.; SINGH, D.; CHATTERJEE, S. Biodegradation of organophosphorus pesticide chlorpyrifos by *Sphingobacterium* sp. C1B, a psychrotolerant bacterium isolated from apple orchard in Himachal Pradesh of India. **Extremophiles**, v. 24, n. 6, p. 897–908, 1 nov. 2020.

VINCENT, J M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. IBP Handbook No. 15; Blackwell: Oxford, UK; Edinburgh, UK, 1970; p. 54–58.

VISCA, P.; SEIFERT, H.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. **IUBMB Life**, v. 63, n. 12, p. 1048–1054, 1 dez. 2011.

WANG, H.; PENG, H.; LI, W.; CHENG, P. e GONG, M. The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 705343, 2021.

WANG, Z.; JIANG, M.; CHEN, K.; WANG, K.; DU, M.; ZALÁN, Z.; HEGYI, F. e KAN, J. Biocontrol of *Penicillium digitatum* on Postharvest Citrus Fruits by *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

WANG, M.; LIU, Y.; JIANG, X.; FANG, J.; LYU, Q.; WANG, X. e YAN, Z. Multi-omics reveal the structure and function of microbial community in co-digestion of corn straw and pig manure. **Journal of Cleaner Production**, v. 322, p. 129150, 1 nov. 2021.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: An overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1–2, p. 3–14, 2006.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 35-48, 2014.

WEISBURG, M. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, v.173, 1991.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The

primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WU, C.; SUN, W.; HUANG, Y.; DAI, S.; PENG, C.; ZHENG, Y.; CHEN, C. e HAO, J. Effects of different additives on the bacterial community and fermentation mode of whole-plant paper mulberry silage. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 904193, 8 set. 2022.

WU, Z.; YANG, S.; XU, L.; LI, H.; SUN, J.; XU, Y.; HUANG, M. e SUN, B. Screening and identifying microorganisms with feruloyl esterase activity in Chinese sesame-flavour baijiu fermentation materials (Jiupei). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 102, p. 104069, 1 set. 2021.

XI, L.; ZHANG, Z.; QIAO, N.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZHAO, J. Y. e XIAO, Z. Complete genome sequence of the novel thermophilic polyhydroxyalkanoates producer *Aneurinibacillus* sp. XH2 isolated from Gudao oilfield in China. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 54-55, 2016.

XIA, Q.; RUFTY, T.; SHI, W. Predominant Microbial Colonizers in the Root Endosphere and Rhizosphere of Turfgrass Systems: *Pseudomonas veronii*, *Janthinobacterium lividum*, and *Pseudogymnoascus* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 643904, 23 mar. 2021.

XIN, F.; CHEN, T.; JIANG, Y.; LU, J.; DONG, W.; ZHANG, W.; MA, J.; ZHANG, M. e JIANG, M. Enhanced biobutanol production with high yield from crude glycerol by acetone uncoupled *Clostridium* sp. strain CT7. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 575–581, 1 nov. 2017.

XU, Q.; ZHANG, Y.; WANG, X.; E WANG, G. *Hyphomicrobium album* sp. nov., isolated from mountain soil and emended description of genus *Hyphomicrobium*. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 10, p. 5931–5936, 1 dez. 2021.

YANG, G.; HAN, L.; WEN, J. e ZHOU, S. *Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART 12, p. 4599–4605, 1 dez. 2013.

YANG, H.; WANG, X.; ZHENG, J.; WANG, G.; HONG, Q.; LI, S.; LI, R. e JIANG, J. Biodegradation of acetamiprid by *Pigmentiphaga* sp. D-2 and the degradation pathway. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 95-102, 2013.

YETIMAN, A. E.; ORTAKCI, F. Genomic, probiotic, and metabolic potentials of *Liquorilactobacillus nagelii* AGA58, a novel bacteriocinogenic motile strain isolated from lactic acid-fermented shalgam. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 135, n. 1, p. 34–43, 1 jan. 2023.

YUE, S.; MIZOGUCHI, T.; KOHARA, T.; ZHANG, M.; WATANABE, K.; MIYAMOTO, H.; TASHIRO, Y. e SAKAI, K. Meta-fermentation system with a mixed culture for the production of optically pure l-lactic acid can be reconstructed using the minimum isolates with a simplified pH control strategy. **Biotechnology Journal**, v. 16, n. 11, p. 2100277, 1 nov. 2021.

ZAINUDIN, M. H. M.; RAMLI, N.; HASSAN, M. A.; SHIRAI, Y.; TASHIRO, K.; SAKAI, K.; E TASHIRO, Y. Bacterial community shift for monitoring the co-composting of oil palm empty fruit bunch and palm oil mill effluent anaerobic sludge. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 869–877, 1 jun. 2017.

ZÁMOCKÝ, M.; GODOČÍKOVÁ, J.; KOLLER, F. E POLEK, B. Potential application of catalase-peroxidase from *Comamonas terrigena* N3H in the biodegradation of phenolic compounds. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 79, n. 2, p. 109–117, 2001.

ZHAN, P. C.; LI, C. J.; ZHANG, Z.; MAO, R. F.; LIU, J. R.; JIANG, X. W.; ZHI, X. Y. e YANG, L. L. *Neobacillus paridis* sp. nov., an endophyte of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 2, p. 129, 2022.

ZHANG, Kun; ZHANG, Y. L.; OUYANG, X.; LI, J. P.; LIAO, J. J.; YOU, A.; YUE, X.; XIE, G. J.; LIANG, J. L. e LI, J. T. Genome-centered metagenomics analysis reveals the microbial interactions of a syntrophic consortium during methane generation in a decentralized wastewater treatment system. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 135, 2019.

ZHANG, M.; ZHANG, Y.; HAN, X.; WANG, J.; YANG, Y.; REN, B.; XIA, M.; LI, G.; FANG, R.; HE, H. e JIA, Y. Whole genome sequencing of *Enterobacter mori*, an

emerging pathogen of kiwifruit and the potential genetic adaptation to pathogenic lifestyle. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2021.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X. e LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloee against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64–74, 2016.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M.; HARRIS, H. M.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GANZLE, M. G. e LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 1 abr. 2020.

ZHENG, Y.; LI, L.; JIN, Z.; AN, P.; YANG, S. T.; FEI, Y. e LIU, G. Characterization of fermented soymilk by *Schleiferilactobacillus harbinensis* M1, based on the whole-genome sequence and corresponding phenotypes. **LWT**, v. 144, p. 111237, 1 jun. 2021.

ZHOU, X.; WILLEMS, R. J. L.; FRIEDRICH, A. W.; ROSSEN, J. W. A. e BATHOORN, E. Enterococcus faecium: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, p. 1-13, 2020.

ZHU, B.; ZHOU, Q.; LIN, L.; HU, C.; SHEN, P.; YANG, L.; AN, Q.; XIE, G. e LI, Y. *Enterobacter sacchari* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane (*Saccharum officinarum* L.). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART7, p. 2577–2582, 1 jul. 2013.

ZEFFA, D. M.; PERINI, L. J.; SILVA, M. B.; SOUSA, N. V.; SCAPIM, C. A.; OLIVEIRA, A. L. M.; JÚNIOR, A. T. A.; GONÇALVES, L. S. A. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215332, 2019.

ZIGANSHINA, E. E.; MOHAMMED, W. S.; ZIGANSHIN, A. M. Draft genome sequence

of *Clostridium jeddahense* EE-R19 isolated from an anaerobic digester. **BMC Research Notes**, v. 13, p. 1-3, 2020.

ZILLI, J. É.; PACHECO, R. S.; GIANLUPPI, V.; SMIDERLE, O. J.; URQUIAGA, S., HUNGRIA, M. Biological N₂ fixation and yield performance of soybean inoculated with *Bradyrhizobium*. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 3, p. 323–336, 2021.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; NETO, G. F.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 38, n. 1, p. 87–93, 2019.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 281220, 13 out. 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Frequência relativa do DNA de microrganismos presentes nas amostras provenientes da produção *on farm* (1 a 22) e o controle positivo (C), apresentadas por espécie. Os respectivos grupos funcionais como geralmente são reconhecidos os microrganismos: fermentativas, controle biológico, probióticos, biorremediação ou biodegradação, vida livre, BPCP, patogênicas e fitopatogênicas, as que não foram encontradas informações (Sem informação) e outros microrganismos.

<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Biorremediação ou Biodegradação	GIACOMUCCI <i>et al.</i> , 2019	-	-	-	-	0,131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas guangdongensis</i>	Vida livre	YANG <i>et al.</i> , 2013	-	-	-	-	-	-	-	-	1,160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas guariconensis</i>	BPCP	PATEL <i>et al.</i> , 2015	-	-	-	-	0,363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas lundensis</i>	Controle biológico	BARÁTI-DEÁK e BELÁK, 2021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,568	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	0,232	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas monteilii</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,037	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	BPCP	TRINH <i>et al.</i> , 2018	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,341	0,616	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas otitidis</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	-	2,260	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	0,206	-	-	-	23,482	0,343	-	0,009	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> SGB12322	Sem informação	Sem informação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,178	0,017	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas soli</i>	Produtora de xantolisina (*Outros)	PASCUAL <i>et al.</i> , 2014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,856	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	0,782	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas thymotolerans</i>	Tolerante a Altas Temperaturas (*Outros)	MANAIA <i>et al.</i> , 2002	-	0,573	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rahnella inusitata</i>	Uso industrial (*Outros)	NÚÑEZ-MONTERO <i>et al.</i> , 2021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	17,723	-	-	1,069	0,094	-	0,020	-	-	-	-	-	-	-
<i>Raoultella terrigena</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	0,015	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium pusense</i>	BPCP	CHAUDHARY <i>et al.</i> , 2021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,286	0,119	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizobium tropici</i>	BPCP	FUKAMI <i>et al.</i> , 2017	47,072	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i>	Biorremediação ou Biodegradação	NALIN <i>et al.</i> , 2019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,790	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcaceae bacterium BL 4</i>	Fermentativa	WANG <i>et al.</i> , 2021	-	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomonospora glauca</i>	Atividade Antimicrobiana (*Outros)	HALKET <i>et al.</i> , 2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,647	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomonospora viridis</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,511	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,680	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schleiferilactobacillus harbinensis</i>	Fermentativa	ZHENG <i>et al.</i> , 2020	-	0,008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,756	-	8,300	-	-	-	-	-	-	-
<i>Schleiferilactobacillus perolens</i>	Probiótico	BERARDO <i>et al.</i> , 2022	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,009	-	0,071	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia grimesii</i>	Patogênica	BOZHOKINA <i>et al.</i> , 2020	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	Patogênica	BARTLETT <i>et al.</i> , 2023	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,025	-	-	-	-

APÊNDICE B

Reads em cada programa utilizado para análise metagenômica (Bowtie2 e Metaphlan). Em verde estão representados os microrganismos alvo, em vermelho os que apareceram em maior quantidade na amostra e em amarelo os de menor quantidade, por fim o total de *reads* de cada programa. B= Bowtie2 e M= Methaphlan. Contendo controle positivo (C) e as amostras provenientes de produções de bioinsumos *on farm* (1 a 22).

APÊNDICE D

Genes de Resistência a antibióticos encontrados nas amostras (1 a 22) e os respectivos genes de resistência extrínsecos, com base nos fatores de resistência, contendo fenótipo, nº de acesso no NCBI, microrganismo do qual o(s) gene(s) foi(ram) isolado(s), o produto destes genes e a classificação de risco pela OMS das espécies das quais o gene foi isolado. Amostras 6, 9, 12 e 20 não apresentaram genes de resistência extrínsecos.

Amostra 1						
Gene de Resistência e Classe	Fenótipo	Nº de Acesso	Microrganismo de referência	Produto	Risco OMS	
Aminoglycoside						
aac(6)-II	Tobramycin, Dibekacin, Gentamicin, Sisomicin, Netilmicin	L12710	Enterococcus faecium		Alto	
Beta-lactam						
blaOXA-556	Unknown Beta-lactam	KY126231	Acinetobacter baumannii	OXA-51 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-556	Crítico	
blaOXA-64	Unknown Beta-lactam	AY750907	Acinetobacter baumannii	beta-lactamase OXA-64	Crítico	
blaOXA-510	Unknown Beta-lactam	JX865393	Acinetobacter baumannii	beta-lactamase OXA-51-like protein	Crítico	
Fosfomicin						
fosA	Fosfomicin	AEXB01000013	Enterobacter cloacae		Crítico	
MLS - Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B						
msr(C)	Erythromycin, Telithromycin, Quinupristin, Pristinamycin IA, Virginiamycin S	AF313494	Enterococcus faecium	MsrC	Alto	
Glycopeptide						
VanC1XY	Vancomycin	AF162694	Enterococcus gallinarum	D-alanine-D-alanine ligase-related protein	-	
Amostra 2						
Fluoroquinolone						
OqxB	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim	EU370913	Escherichia coli	OqxA membrane-fusion protein	-	
OqxA	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim	EU370913	Escherichia coli	OqxB integral membrane protein	-	
Amostra 3						
Beta-lactam						
blaOXA-378	Unknown Beta-lactam	KF986259	Acinetobacter baumannii	beta-lactamase OXA-378	Crítico	
blaADC-25	Unknown Beta-lactam	EF016355	Acinetobacter baumannii	AmpC cephalosporinase	Crítico	
Fosfomicin						
fosA	Fosfomicin	AEXB01000013	Enterobacter cloacae		Crítico	
Fluoroquinolone						
OqxB	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim	EU370913	Escherichia coli	OqxB integral membrane protein	-	
Amostra 4						
Beta-lactam						
blaOXA-378	Unknown Beta-lactam	KF986259	Acinetobacter baumannii	beta-lactamase OXA-378	Crítico	
blaADC-25	Unknown Beta-lactam	EF016355	Acinetobacter baumannii	AmpC cephalosporinase	Crítico	
Fosfomicin						
fosA	Fosfomicin	AEXB01000013	Enterobacter cloacae		Crítico	
Fluoroquinolone						
OqxB	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim	EU370913	Escherichia coli	OqxB integral membrane protein	-	

Amostra 5					
Sulphonamide sul2	Sulfamethoxazole	AY034138	Vibrio cholerae	dihydropteroate synthase	-
Amostra 7					
Aminoglycoside aph(6)-IId	Streptomycin	M28829	Escherichia coli		
aph(3'')-Ib	Streptomycin	AF024602	Pseudomonas aeruginosa		Crítico
aph(3'')-Ib	Streptomycin	AF321551	Shigella flexneri		Médio
aph(3'')-Ib	Streptomycin	AF313472	Pseudomonas aeruginosa		Crítico
aph(3'')-Ib	Streptomycin	AF321550	Escherichia coli		-
aph(3'')-IIa	Kanamycin, Neomycin, Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Ribostamycin, Butiromycin, Gentamicin	V00618	Escherichia coli		-
aadA3	Spectinomycin, Streptomycin	AF047479	Desconhecido	aminoglycoside 3'-O-nucleotidyltransferase	-
Beta-lactam blaPLA1a	Ampicillin, Amoxicillin, Ticarcillin	AY302757	Raoultella planticola	beta-lactamase	-
blaTEM-1B	Amoxicillin, Ampicillin, Cephalothin, Piperacillin, Ticarcillin	AY458016	Escherichia coli	TrpA	-
Fosfomicin fosA	Fosfomicin	AGDM01000012	Raoultella ornithinolytica	glutathione transferase fosA	-
Phenicol floR	Chloramphenicol, Florfenicol	AF118107	Salmonella typhimurium	putative efflux protein Flor	Alto
Fluoroquinolone OqxB	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim	EU370913	Escherichia coli	OqxB integral membrane protein	-
OqxA	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim	EU370913	Escherichia coli	OqxA membrane-fusion protein	-
Sulphonamide sul2	Sulfamethoxazole	AY034138	Vibrio cholerae	dihydropteroate synthase	-
Tetracycline tet(B)	Doxycycline, Tetracycline, Minocycline	AP000342	Murine mastadenovirus A	pol	-
tet(A)	Doxycycline, Tetracycline	AJ517790	Aeromonas salmonicida	tetracycline resistance protein	-
tet(C)	Doxycycline, Tetracycline	AF055345	Francisella tularensi	tetracycline-resistance protein	-
tet(39)	Doxycycline, Tetracycline	KT346360	Acinetobacter baumannii	Tet39	Crítico
Trimethoprim dfrA8	Trimethoprim	U10186	Escherichia coli	dihydrofolate reductase type VIII	-
Amostra 8					
Aminoglycoside aac(6)-IIf	Tobramycin, Dibekacin, Amikacin, Sisomicin, Netilmicin	X55353	Enterobacter cloacae	AG-6'-acetyltransferase	Crítico
Beta-lactam blaADC-25	Unknown Beta-lactam	EF016355	Acinetobacter baumannii	AmpC cephalosporinase	Crítico
blaOXA-121	Unknown Beta-lactam	EU255290	Acinetobacter baumannii	beta-lactamase OXA-51-like protein	Crítico
blaCMY-152	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid	KY978224	Citrobacter freundii	class C beta-lactamase OXA-51-like protein	-
blaCMY-98	Unknown Beta-lactam	KC603538	Citrobacter freundii	class C beta-lactamase CMY-152	-
blaOXA-396	Amoxicillin, Ampicillin, Meropenem	AY306134	Pseudomonas aeruginosa	oxacillinase	Crítico
POM-1	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefepime, Cefixime, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam	GU002295	Pseudomonas otitidis	B3 beta-lactamase	-
Fosfomicin fosA	Fosfomicin	ACWU01000146	Pseudomonas aeruginosa	polypeptide deformylase	Crítico
Fluoroquinolone qnrB69	Ciprofloxacin	KC580658	Citrobacter freundii	QnrB69	Crítico
Amostra 10					
Aminoglycoside aph(6)-IId	Streptomycin	M28829	Escherichia coli		-
aph(3'')-Ib	Streptomycin	AF321551	Shigella flexneri	aminoglycoside 3'-phosphotransferase	Médio
Beta-lactam blaPAO	Amoxicillin, Ampicillin, Cefepime, Ceftazidime	FJ666073	Pseudomonas aeruginosa	class C beta-lactamase PDC-10	Crítico
Amostra 11					
Beta-lactam blaL1	Unknown Beta-lactam	EF126059	Stenotrophomonas maltophilia	L1 beta-lactamase	-
blaOXA-50	Amoxicillin, Ampicillin	AY306130	Pseudomonas aeruginosa	oxacillinase	Crítico
Sulphonamide sul2	Sulfamethoxazole	AY034138	Vibrio cholerae	dihydropteroate synthase	-
Tetracycline tet(A)	Doxycycline, Tetracycline	AF534183	Shigella sonnei	tetracycline resistance protein efflux	Médio
Amostra 13					
Fosfomicin fosA	Fosfomicin	M85195	Serratia marcescens	fosfomicin-resistance protein	-
Amostra 14					
Sulphonamide sul2	Sulfamethoxazole	AJ830710	Actinobacillus porcitisillurum	dihydropteroate synthase	-
sul2	Sulfamethoxazole	FN95456	Salmonella enterica	dihydropteroate synthase Su2	Alto
sul2	Sulfamethoxazole	AY034138	Vibrio cholerae	dihydropteroate synthase	-

Tetracycline								
tet(S)	Doxycycline, Tetracycline, Minocycline		L09756	Listeria monocytogenes				-
Amostra 16								
Fosfomicin								
fos	Fosfomicin		FN543093	Cronobacter turicensis	Glutathione transferase fosA			-
fosA6	Fosfomicin		KU254579	Escherichia coli	FosA6			-
fosB1	Fosfomicin		CP001903	Bacillus thuringiensis	fosfomicin resistance protein FosB			-
Fluoroquinolone								
OqxB	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim		EU370913	Escherichia coli	OqxB integral membrane protein			-
OqxA	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim		EU370913	Escherichia coli	OqxA membrane-fusion protein			-
Tetracycline								
tet(S)	Doxycycline, Tetracycline, Minocycline		L09756	Listeria monocytogenes				-
Amostra 17								
Aminoglicoside								
aac(6)-II	Tobramycin, Dibekacin, Gentamicin, Sisomicin, Netilmicin		L12710	Enterococcus faecium				Alto
Fosfomicin								
fosB1	Fosfomicin		CP001903	Bacillus thuringiensis	fosfomicin resistance protein FosB			-
MLS - Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B								
msr(C)	Erythromycin, Telithromycin, Quinupristin, Pristinamycin IA, Virginiamycin S		AF313494	Enterococcus faecium	MsrC			Alto
lsa(A)	Lincomycin, Clindamycin, Dalofpristin, Pristinamycin IIA, Virginiamycin M		AY737526	Enterococcus faecalis	Lsa			-
Amostra 18								
Aminoglicoside								
aadK	Streptomycin		M26879	Bacillus subtilis	aminoglicoside 6-adenylyltransferase			-
MLS - Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B								
mph(K)	Spiramycin, Telithromycin		NC_000964	Bacillus subtilis				-
Amostra 19								
Beta-lactam								
blaACT-6	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid		FJ237366	Klebsiella pneumoniae	class C beta-lactamase			-
blaCMY-124	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid		KM985462	Citrobacter freundii	class C beta-lactamase CMY-124			-
blaCMY-49	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid		GQ402541	Citrobacter freundii	AmpC			-
blaZ	Amoxicillin, Ampicillin, Penicillin, Piperacillin		M15195	B.cereus	beta-lactamase III			-
Fosfomicin								
fosA	Fosfomicin		M85195	Serratia marcescens	fosfomicin-resistance protein			-
MLS - Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B								
lsa(A)	Lincomycin, Clindamycin, Dalofpristin, Pristinamycin IIA, Virginiamycin M		AY737526	Enterococcus faecalis	Lsa			-
Fluoroquinolone								
OqxB	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim		EU370913	Escherichia coli	OqxB integral membrane protein*			-
OqxA	Chloramphenicol, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, Trimethoprim		EU370913	Escherichia coli	OqxA membrane-fusion protein			-
Amostra 21								
Aminoglicoside								
aadK	Streptomycin		M26879	Bacillus subtilis	aminoglicoside 6-adenylyltransferase			-
MLS - Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B								
mph(K)	Spiramycin, Telithromycin		NC_000964	Bacillus subtilis				-
Tetracycline								
tet(L)	Doxycycline, Tetracycline, Minocycline, Tigecycline, Doxycycline, Tetracycline		X08034	Bacillus subtilis	TET protein			-
tet(S)	Doxycycline, Tetracycline, Minocycline		L09756	Listeria monocytogenes				-
Amostra 22								
Aminoglicoside								
aph(6)-IId	Streptomycin		M28829	Escherichia coli				-
aph(3*)-Ib	Streptomycin		AF024602	Pseudomonas aeruginosa				Crítico
aph(3*)-Ib	Streptomycin		AF321551	Shigella flexneri				Médio
aph(3*)-Ib	Streptomycin		AF313472	Pseudomonas aeruginosa				Crítico
aph(3*)-Ib	Streptomycin		AF321550	Escherichia coli				-
Beta-lactam								
blaMIR-6	Amoxicillin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Ampicillin, Ampicillin+Clavulanic acid, Cefotaxime, Cefoxitin, Ceftazidime, Piperacillin, Piperacillin+Tazobactam, Ticarcillin, Ticarcillin+Clavulanic acid		JQ664733	Enterobacter cloacae	class C beta-lactamase MIR-6			Crítico
blaTEM-1A	Amoxicillin, Ampicillin, Cephalothin, Piperacillin, Ticarcillin		HM749966	Escherichia coli	TEM-1 beta-lactamase			-
Fosfomicin								
fosA	Fosfomicin		AEXB01000013	Enterobacter mori				Crítico
Phenicol								
floR	Chloramphenicol, Florfenicol		AF118107	Salmonella typhimurium	putative efflux protein Flor			Alto
Sulphonamide								
sul2	Sulfamethoxazole		AY034138	Vibrio cholerae	dihydropteroate synthase			-
Tetracycline								
tet(B)	Doxycycline, Tetracycline, Minocycline		AP000342	Murine mastadenovirus A	pol			-