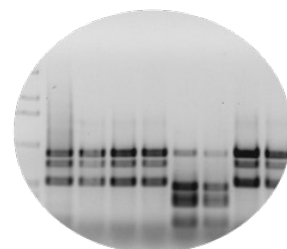
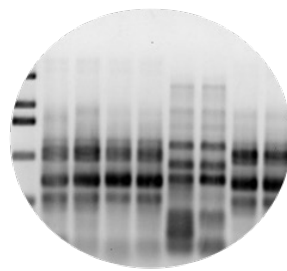
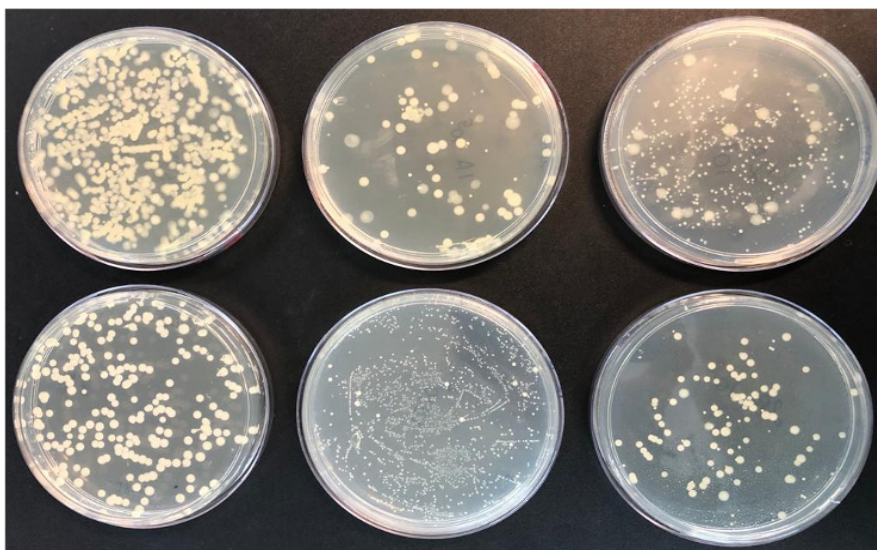


Avaliação da qualidade de inoculantes à base de *Bacillus* para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema *on farm*



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

2 FOME ZERO
E AGRICULTURA
SUSTENTÁVEL



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
238**

**Avaliação da qualidade de
inoculantes à base de *Bacillus* para
promoção de crescimento de plantas
produzidos em sistema *on farm***

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Christiane Abreu de Oliveira-Paiva
Ariana Elisei Vilela
Eliane Aparecida Gomes
Victor Lorrán Mendes Pires
Sylvia Moraes de Sousa Tinoco
Fernando Hercos Valicente

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2022*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Maria Marta Pastina

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
*Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso
Campanha, Roberto dos Santos Trindade e
Maria Cristina Dias Paes.*

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Márcio Augusto Pereira do Nascimento

Foto da capa
Ubiraci Gomes de Paula Lana

1ª edição
Publicação digital (2022)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Avaliação da qualidade de inoculantes à base de *Bacillus* para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema *on farm* / Ubiraci Gomes de Paula Lana... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2022.

27 p. : il. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 238).

1. Inoculante. 2. Bactéria. 3. Microbiologia do solo. 4. Insumo. I. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. II. Oliveira-Paiva, Christiane Abreu de. III. Vilela, Ariana Elisei. IV. Gomes, Eliane Aparecida Pires, Victor Lorrain Mendes. VI. Tinoco, Sylvia Moraes de Sousa. VII. Valicente, Fernando Hercos. VIII. Série.

CDD 631.46 (21. ed.)

Sumário

Resumo05

Abstract.....07

Introdução.....08

Material e Métodos09

Resultados e Discussão12

Conclusões.....21

Referências22

Leitura Recomendada.....27

Avaliação da qualidade de inoculantes à base de *Bacillus* para promoção de crescimento de plantas produzidos em sistema *on farm*

Ubiraci Gomes de Paula Lana¹

Christiane Abreu de Oliveira-Paiva²

Ariana Elisei Vilela³

Eliane Aparecida Gomes⁴

Victor Lorrán Mendes Pires⁵

Sylvia Morais de Sousa Tinoco⁶

Fernando Hercos Valicente⁷

RESUMO - Nos últimos anos, o mercado e a demanda por insumos biológicos têm crescido exponencialmente no Brasil, seguindo uma tendência mundial. Com isso, diversos produtores rurais têm fabricado em suas fazendas insumos microbiológicos para aplicação direta nas lavouras, prática conhecida como produção *on farm*. Enquanto os produtos comerciais precisam seguir processos rígidos para produção, registro e comercialização, na produção *on farm* ainda não existe nenhuma obrigatoriedade quanto ao controle de qualidade e fiscalização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de inoculantes à base de *Bacillus*, destinados à promoção de crescimento de plantas, produzidos em sistema *on farm*. As amostras foram caracterizadas quanto a parâmetros físico-químicos, diluídas e plaqueadas em meio de cultura, permitindo a obtenção de colônias isoladas e morfológicamente distintas, indicando contaminação. Análises moleculares de 41

1 Ubiraci Gomes de Paula Lana - Químico, DCs em Genética Molecular, Analista da Embrapa Milho e Sorgo.

2 Christiane Abreu de Oliveira-Paiva - Eng. Agrôn., DCs em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

3 Ariana Elisei Vilela - Eng. Agrôn., DCs em Fitopatologia, Bolsista DTI na Embrapa Milho e Sorgo.

4 Eliane Aparecida Gomes - Bióloga, DSc em Genética e Melhoramento, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

5 Victor Lorrán Mendes Pires - Bolsista IC na Embrapa Milho e Sorgo.

6 Sylvia Morais de Sousa Tinoco - Bióloga, DCs em Genética e Biologia Molecular, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

7 Fernando Hercos Valicente - Eng. Agrôn., DCs em Entomologia/Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

isolados baseadas no sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* revelaram a presença de quatro gêneros diferentes e indicaram que mais de 90% dos isolados pertencem a espécies potencialmente patogênicas. Apenas quatro isolados foram identificados como *B. megaterium* e apresentaram o mesmo perfil genético da cepa CNPMS B119, que compõe um produto comercial desenvolvido para solubilização e mineralização de fósforo do solo. Assim, as amostras avaliadas de inoculantes a base de *Bacillus* produzidos em sistema *on farm* para promoção de crescimento de plantas apresentam elevado índice de contaminação por diferentes espécies bacterianas, com potencial risco para saúde humana e/ou de animais.

Termos para indexação: Bioprodutos, bactérias, produção na fazenda, contaminação, risco

Quality evaluation of *Bacillus*-based inoculants for plant growth promotion produced on-farm system

ABSTRACT - In the last years, Brazil's market and demand for biological products have grown exponentially, following a worldwide trend. As a result, several farmers have been producing microbiological inputs for direct crop application, a practice known as on-farm production. While commercial products need to follow strict production, registration, and commercialization processes, there is no obligation regarding quality control and inspection for on-farm production. The objective of this work was to evaluate the microbiological quality of *Bacillus*-based inoculants for plant growth promotion produced on-farm system. The inoculant samples were characterized for physicochemical parameters, diluted, and plated on a solid medium, allowing the observation of morphologically distinct colonies, indicating contamination. Molecular analyzes of 41 isolates based on partial sequencing of the *16S rRNA* gene revealed the presence of four different genera and indicated that more than 90% of the isolates belonged to potentially pathogenic species. Only four isolates were identified as *B. megaterium* and showed the same genetic profile as the CNPMS B119 strain, which is the inoculum of a commercial product developed for solubilization and mineralization of soil phosphorus. Thus, the evaluated samples of *Bacillus*-based inoculants produced an on-farm system for plant growth promotion showed a high rate of contamination by different bacteria species, with potential risk to human and/or animal health.

Index Terms: Bioproducts, bacteria, on-farm production, contamination, risk

Introdução

O mercado de bioinsumos (defensivos biológicos e inoculantes) tem aumentado de maneira exponencial em todo o mundo. No Brasil, tem sido observado um constante ingresso de novos bioinsumos nacionais e importados no mercado agrícola, além do surgimento de novas empresas de pequeno e médio porte, de capital nacional, até grandes multinacionais (Embrapa, 2021a). Com isso, enquanto o incremento mundial da comercialização de bioinsumos está na ordem de 15% ao ano, somente na safra 2020/2021 a comercialização destes produtos no Brasil aumentou 37% em comparação com a safra anterior (Brasil, 2021; Venda..., 2021).

Avanços nas pesquisas sobre inoculantes têm gerado cada vez mais interesse agrônomo, uma vez que são tecnologias que podem melhorar a produtividade, diminuir os custos de produção e o impacto ao meio ambiente (Oliveira-Paiva et al., 2021). Recentemente, dois inoculantes à base de *Bacillus* com tecnologia Embrapa foram lançados no mercado nacional destinados à promoção de crescimento de plantas, registrados atualmente para as culturas do milho (*Zea mays* L.) e/ou da soja (*Glycine max* L.). O inoculante Auras® foi desenvolvido a partir da cepa *B. aryabhatai* CMAA 1363, pertencente à coleção de microrganismos da Embrapa Meio Ambiente, visando aumentar a resiliência e a capacidade de adaptação das plantas ao estresse hídrico (Kavamura et al., 2013; Embrapa, 2021b), e o BiomaPhos® que foi desenvolvido pela combinação das cepas *B. megaterium* CNPMS B119 e *B. subtilis* CNPMS B2084, pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Milho e Sorgo, para solubilização e mineralização de fósforo no solo (Oliveira-Paiva et al., 2009, 2020, 2021).

A produção comercial de inoculantes deve seguir rigorosos controles de qualidade, utilizando formulações que garantam, principalmente, a pureza, concentração e identidade dos microrganismos (Santos et al., 2019). Apesar disso, nos últimos anos, tem-se observado um crescente aumento da produção desses insumos microbiológicos nas propriedades rurais para consumo próprio, denominada de produção *on farm*, sem nenhum controle de qualidade obrigatório.

A produção *on farm* frequentemente é realizada a partir da multiplicação de produtos comerciais adquiridos no mercado, de modo que estudos sobre

a qualidade destes bioprodutos, seus impactos sobre o sistema de produção e riscos potenciais para a saúde pública são escassos, especialmente pelo receio dos produtores rurais em fornecer amostras para avaliação. Até então, as amostras avaliadas de insumos bacterianos produzidos em sistema *on farm* no Brasil têm demonstrado elevados índices de contaminação por microrganismos não alvo, incluindo patógenos com resistência a múltiplos antibióticos, com potencial risco para humanos, animais e plantas (Valicente et al., 2018; Lana et al., 2019; Bocatti et al., 2022).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de amostras de inoculantes produzidos em sistema *on farm* destinados à promoção de crescimento de plantas, supostamente preparados com *B. megaterium* e *B. subtilis* ou *B. arayabattai* como microrganismos-alvo.

O uso de insumos biológicos de qualidade representa uma contribuição para atingir a meta ODS 2.4, que visa garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que ajudem a manter os ecossistemas, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas, às condições meteorológicas extremas, secas, inundações e outros desastres, e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo.

Material e Métodos

Amostragem dos produtos *on farm* e avaliação de propriedades físico-químicas

Quatro amostras de inoculantes líquidos produzidos no estado de São Paulo em sistema *on farm* foram recebidas sob refrigeração em novembro de 2021, sendo duas amostras supostamente preparadas com *B. megaterium* e *B. subtilis* (denominadas 1A e 2A) e duas com *B. arayabattai* (1B e 2B) como microrganismos-alvo. Para fins comparativos, foram utilizados os inoculantes comerciais BiomaPhos® (*B. megaterium* CNPMS B119 e *B. subtilis* CNPMS B2084), com concentração mínima de 4×10^9 UFC mL⁻¹, e Auras® (*B. arayabattai* CMAA 1363), com concentração mínima de 1×10^8 UFC mL⁻¹, de

acordo com os fabricantes. As amostras e os inoculantes comerciais foram avaliados quanto à cor, ao pH (Digimed DM-22, Brasil) e à condutividade elétrica (Digimed DM-3P, Brasil).

Concentração celular e isolamento de morfotipos

Sob condições assépticas em câmara de fluxo laminar, diluições seriadas foram realizadas em solução de NaCl 0,85% (m/v) estéril e alíquotas das diluições 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} foram espalhadas sob a superfície do meio de cultura Luria Bertani (LB) sólido (peptona 10 g L⁻¹, extrato de levedura 5 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, ágar 15 g L⁻¹; pH final 7,0), em triplicata e incubadas a 28 °C por 24 horas para contagem das unidades formadoras de colônias e análise molecular de morfotipos.

Identificação molecular de microrganismos

Um total de 41 colônias isoladas foram aleatoriamente selecionadas entre as quatro amostras de produtos *on farm*. Como controle, foram selecionadas seis colônias de cada inoculante comercial. Para a extração de DNA, os isolados foram inoculados em 2 mL de meio de cultura LB distribuídos em tubos cônicos de 15 mL. As amostras foram crescidas a 28 °C por 24 horas sob agitação de 150 rpm, centrifugadas a 14.000 x g e o sobrenadante foi descartado. A extração de DNA genômico das células bacterianas foi realizada com o kit "Wizard® Genomic DNA Purification" (Promega, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, EUA) e as amostras foram diluídas para concentração de 10 ng µL⁻¹.

As reações de PCR foram preparadas com os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al., 1999) para amplificação da região 16S rDNA. As reações foram elaboradas num volume final de 20 µL, contendo 30 ng de DNA; tampão de reação 1X (Invitrogen, EUA); dNTPs 125 µM; dimetilsulfóxido (DMSO) 4% (v/v); primers a 0,5 µM cada e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) com uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 57 °C por 30

segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) por uma hora a 100 V em tampão TAE 1X (Tris-base 40 mM; ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM). O gel foi corado com solução de Gel Red (Biotium, EUA), visualizado sob luz UV e fotografado no equipamento L-PIX Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia, Brasil). Para a purificação dos fragmentos de DNA amplificados foram adicionados 2 µL da enzima Exo-Sap (GE HealthCare, EUA) em 10 µL do produto da reação de PCR. Em seguida, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e 80 °C por 15 minutos.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados 4 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de primers 515 F (5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA -3') ou 1492 R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') (Turner et al., 1999) a 10 µM, 0,5 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, EUA), 1,75 µL do tampão de sequenciamento 2X (Applied Biosystems, EUA) e 2,75 µL de água ultrapura. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador a 96 °C por 1 minuto, 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes. Após o término da reação, foram adicionados 60 µL de etanol absoluto e 5 µL de EDTA 125 mM. As amostras foram homogeneizadas e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Logo depois, as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 70% (v/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 x g por 10 minutos e o etanol foi descartado. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos, ressuspensas com 10 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, EUA) e desnaturadas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram analisadas no sequenciador de DNA modelo ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystem, EUA), e as sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, EUA). Os microrganismos presentes nas amostras foram identificados por comparação das sequências obtidas com o banco de dados público de sequências de DNA do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) por meio do algoritmo *blastn*.

Análise do perfil genético de isolados de *Bacillus* por ARDRA e ERIC-PCR

Produtos de amplificação da região 16S rDNA com os primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al., 1999) das colônias identificadas como *Bacillus*, tanto nas amostras *on farm* como aquelas do controle, foram digeridos com enzima *Taq* I (Thermo Fisher, EUA) a 65 °C por 2 horas.

Adicionalmente, as amostras de DNA de *Bacillus* foram amplificadas com primers ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGG3') (Versalovic et al., 1991). A reação foi realizada num volume final de 20 µL contendo 20 ng de DNA; 1 X tampão de reação (Invitrogen, EUA); MgCl₂ 2,5 mM; dNTP 250 µM; primer 0,5 µM cada; DMSO 5% (v/v) e 1,5 U Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, EUA). A amplificação foi realizada no termociclador Veriti (Applied Biosystems, EUA) com os seguintes ciclos: 95 °C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 45 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos, e um final extensão de 72 °C por 10 minutos. Por fim, as amostras destinadas para comparação do perfil genético (ARDRA-digestão com *Taq* I e ERIC-PCR) foram analisadas por eletroforese em 1,0% (m/v) de gel de agarose corado com GelRed (BioLum, EUA) após a corrida, conforme recomendação do fabricante.

Resultados e Discussão

Propriedades físico-químicas e concentração celular de amostras

As amostras produzidas em sistema *on farm* apresentaram coloração entre bege e levemente amarelada. O pH das amostras variou entre 5,0 e 5,8, enquanto a condutividade elétrica variou de 2,0 a 3,3 mS cm⁻¹. Entre os inoculantes comerciais utilizados como controles, o BiomaPhos® apresentou aspecto bege escuro, pH igual a 6,4, e condutividade elétrica igual a 2,4 mS cm⁻¹, enquanto o produto Auras® apresentou coloração preta, pH 5,5 e condutividade elétrica de 13,5 mS cm⁻¹ (Figura 1).

As amostras 1A e 2A, supostamente preparadas com *B. megaterium* e *B. subtilis*, apresentaram valores de pH menor que o produto comercial. Durante o processo fermentativo, vários fatores precisam ser monitorados e/ou controlados, incluindo parâmetros físicos como tempo, temperatura, pressão, velocidade de agitação e vazão de gases e líquidos; químicos, como pH, acidez, sólidos solúveis e oxigênio dissolvido; além de parâmetros biológicos, como medida de crescimento microbiano e avaliação de contaminação (Hautrive, 2021). Além disso, cada espécie/cepa pode ter condições diferenciadas de crescimento, sendo recomendado o crescimento separado, de modo que a mistura dos isolados ocorra apenas na formulação final.

As amostras 1B e 2B, supostamente preparadas com *B. arayabattai*, apresentaram valores de condutividade elétrica muito menor que o controle, indicando a ausência de componentes iônicos utilizados na formulação do bioproduto comercial. A formulação é a última etapa do processo de produção comercial, antecedendo o envase. Dependendo da apresentação desejada, são escolhidos diferentes adjuvantes, como adesivos, aglutinantes, emulsificantes, conservantes, molhantes, protetores e outros, que têm papel importante na ação, conservação e estabilidade dos bioprodutos (Soares, 2006).

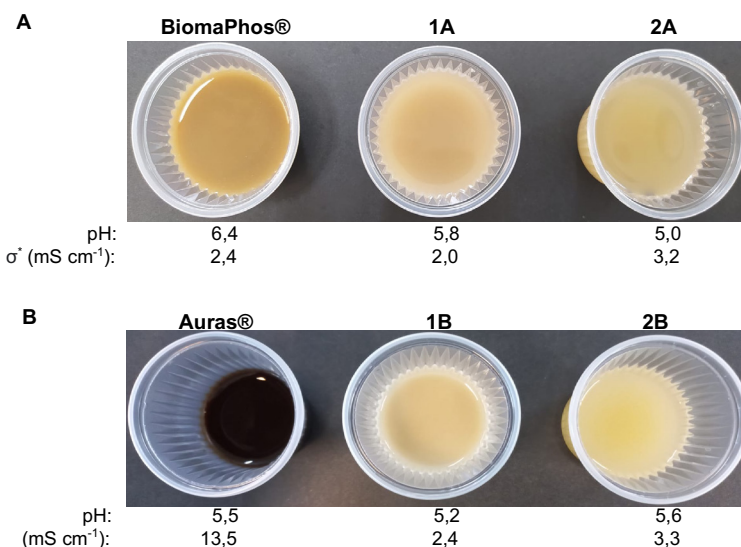


Figura 1. Propriedades físico-químicas de amostras de inoculantes à base de *Bacillus* produzidas em sistema *on farm*. **(A)** Multiplicação com foco em *B. megaterium* e *B. subtilis* (amostras 1A e 2A). **(B)** Multiplicação com foco em *B. arayabattai* (amostras 1B e 2B). As primeiras amostras em cada linha referem-se aos produtos comerciais utilizados como controles. σ' : condutividade elétrica.

A concentração celular nas amostras *on farm* variou entre $1,0 \times 10^{11}$ e $1,0 \times 10^{12}$ UFC mL⁻¹, concentrações superiores aos inoculantes comerciais, BiomaPhos® (*B. megaterium* e *B. subtilis*) e Auras® (*B. arayabattai*), iguais a $0,8 \times 10^{11}$ e $0,9 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, respectivamente (Figura 2). A concentração celular é um parâmetro importante para eficiência de um insumo microbiológico, uma vez que a dose recomendada para sua utilização será baseada neste parâmetro. Baixas ou elevadas concentrações de um determinado produto podem, por exemplo, impactar negativamente a produtividade das culturas. Entretanto, a concentração celular não pode ser utilizada como parâmetro único de qualidade, uma vez que não permite a discriminação entre os microrganismos de interesse e contaminantes com morfologia semelhante.

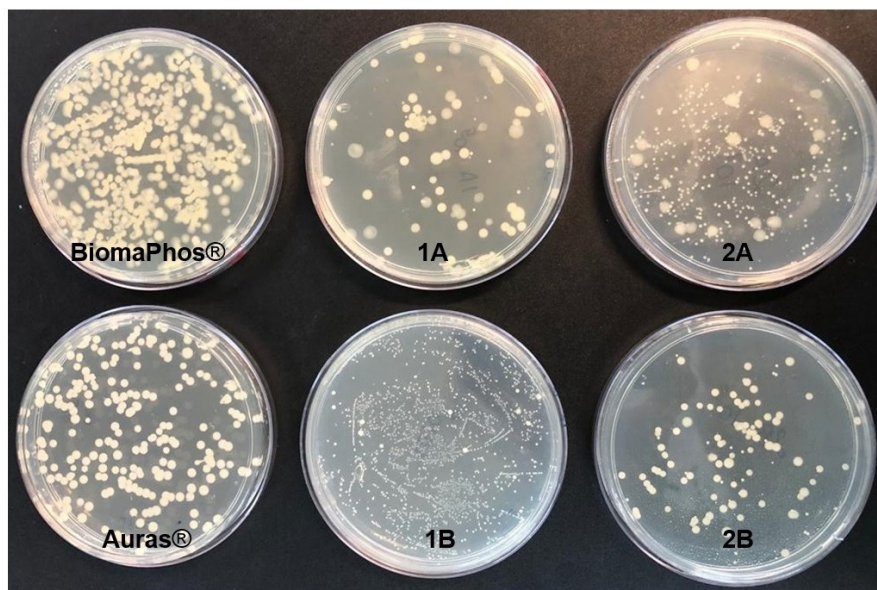


Figura 2. Aspecto das colônias bacterianas presentes em amostras de inoculantes à base de *Bacillus* destinados à promoção de crescimento de plantas, diluídas em solução de NaCl 0,85% (m/v) e crescidas em meio Luria Bertani (LB). As identificações 1A e 2A referem-se às amostras produzidas em sistema *on farm* com foco na multiplicação de *B. megaterium* e *B. subtilis*, enquanto 1B e 2B são amostras com foco na multiplicação de *B. arayabhattai*. A primeira placa em cada linha horizontal refere-se ao produto comercial utilizado como controle.

Isolamento bacteriano e identificação molecular

O plaqueamento para isolamento em meio de cultura indicou diferentes morfotipos de colônias (Figura 2), sugerindo a ocorrência de contaminantes, pois muitas delas diferiram das colônias típicas de *Bacillus*. Comparações das sequências parciais do genes *16S rDNA* das amostras com sequência depositadas no GenBank permitiram a identificação dos isolados bacterianos com similaridade e cobertura maiores que 99%. Entre os 41 isolados bacterianos, 37 (90%) tiveram similaridade com espécies relatadas como potencialmente patogênicas para humanos e animais (Tabelas 1 e 2), indicando que os contaminantes foram mais agressivos no crescimento nas condições de cultivo utilizadas pelos produtores rurais. Não foram observados contaminantes nos inoculantes comerciais.

Tabela 1. Identificação molecular baseada no sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* de isolados bacterianos presentes em amostras de inoculantes produzidos em sistema *on farm* com foco na multiplicação de *Bacillus megaterium* e *B. subtilis*, e potencial risco como patógeno humano e/ou animal.

Amostra	Frag. (pb)	Provável espécie	Cob. (%)	Ident. (%)	Acesso GenBank	Potencial patógeno humano e/ou animal	Referência
1A.1	907	<i>Bacillus megaterium</i>	100	99,89	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
1A.2	902	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	100	99,78	KX611356.1	Sim	Xie et al. (2018)
1A.3	907	<i>B. megaterium</i>	100	99,89	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
1A.4	902	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.5	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.6	902	<i>K. quasipneumoniae</i>	100	99,67	CP014696.2	Sim	Xie et al. (2018)
1A.7	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.8	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.9	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.10	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.11	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1A.12	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2A.1	907	<i>B. megaterium</i>	100	99,89	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
2A.2	907	<i>B. megaterium</i>	100	99,89	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
2A.3	907	<i>E. faecalis</i>	99	99,78	MT158605.1	Sim	Golob et al. (2019)
2A.4	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2A.6	896	<i>Lactococcus garvieae</i>	99	99,78	LC145570.1	Sim	Choksi et al. (2017)
2A.7	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2A.8	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2A.10	902	<i>E. faecalis</i>	100	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2A.11	896	<i>L. garvieae</i>	99	99,78	LC145570.1	Sim	Choksi et al. (2017)
2A.12	896	<i>L. garvieae</i>	99	99,78	LC145570.1	Sim	Choksi et al. (2017)
CA.1	897	<i>B. megaterium</i>	100	99,78	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
CA.2	897	<i>B. megaterium</i>	100	99,78	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
CA.3	897	<i>B. megaterium</i>	100	99,78	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
CA.4	897	<i>B. megaterium</i>	100	99,78	CP009920.1	Não	Velloso et al. (2020)
CA.5	888	<i>B. subtilis</i>	100	100	OM061702.1	Não	Spears et al. (2021)
CA.6	888	<i>B. subtilis</i>	100	100	OM061702.1	Não	Spears et al. (2021)

*Frag: fragmento de DNA sequenciado em pares de bases; Cob: cobertura - percentual da sequência de interesse alinhada a uma sequência depositada no GenBank; Ident: identidade máxima obtida com as maiores pontuações de alinhamento. Os isolados foram numerados utilizando-se a numeração da amostra recebida no laboratório seguida do número da colônia isolada. Por exemplo, o isolado 1A.5 é o 5º isolado da amostra 1A. Os códigos CA.1 a CA.6 referem-se às colônias sequenciadas do inoculante comercial BiomaPhos® produzido com *Bacillus megaterium* CNPMS B119 e *B. subtilis* CNPMS B2084.

Tabela 2. Identificação molecular baseada no sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* de isolados bacterianos presentes em amostra de inoculantes produzidos em sistema *on farm* e comercial com foco na multiplicação de *Bacillus aryabhattai* e potencial risco como patógeno humano e/ou animal.

Amostra	Frag. (pb)	Provável espécie	Cob (%)	E-value	Ident (%)	Acesso GenBank	Potencial patógeno humano e/ou animal	Referência
1B.3	901	<i>Enterococcus faecalis</i>	100	0,0	99,78	NR_115765	Sim	Golob et al. (2019)
1B.4	901	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,78	NR_115765	Sim	Golob et al. (2019)
1B.5	901	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,78	NR_115765	Sim	Golob et al. (2019)
1B.7	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1B.8	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1B.9	902	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	100	0,0	99,67	CP014696.2	Sim	Xie et al. (2018)
1B.10	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1B.11	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
1B.12	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2B.1	907	<i>K. pneumoniae</i>	100	0,0	99,78	CP040993.1	Sim	Xie et al. (2018)
2B.2	907	<i>K. pneumoniae</i>	100	0,0	99,78	CP040993.1	Sim	Xie et al. (2018)
2B.3	901	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,78	NR_115765	Sim	Golob et al. (2019)
2B.4	907	<i>K. pneumoniae</i>	100	0,0	99,78	CP040993.1	Sim	Xie et al. (2018)
2B.5	901	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,78	NR_115765	Sim	Golob et al. (2019)
2B.7	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2B.9	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
2B.10	902	<i>K. quasipneumoniae</i>	100	0,0	99,67	CP014696.2	Sim	Xie et al. (2018)
2B.11	902	<i>K. pneumoniae</i>	100	0,0	99,67	MN999954.1	Sim	Xie et al. (2018)
2B.12	902	<i>E. faecalis</i>	100	0,0	99,89	MN372133.1	Sim	Golob et al. (2019)
CB.1	902	<i>Bacillus aryabhattai</i>	100	0,0	100	OU707431.1	Não	Kavamura et al.(2013)
CB.2	902	<i>B. aryabhattai</i>	100	0,0	100	OU707431.1	Não	Kavamura et al.(2013)
CB.3	902	<i>B. aryabhattai</i>	100	0,0	100	OU707431.1	Não	Kavamura et al.(2013)
CB.4	902	<i>B. aryabhattai</i>	100	0,0	100	OU707431.1	Não	Kavamura et al.(2013)
CB.5	902	<i>B. aryabhattai</i>	100	0,0	100	OU707431.1	Não	Kavamura et al.(2013)
CB.6	902	<i>B. aryabhattai</i>	100	0,0	100	OU707431.1	Não	Kavamura et al.(2013)

*Frag: fragmento de DNA sequenciado em pares de bases; Cob: cobertura - percentual da sequência de interesse alinhada a uma sequência depositada no GenBank; Ident: identidade máxima obtida com as maiores pontuações de alinhamento. Os isolados foram numerados utilizando-se a numeração da amostra recebida no laboratório seguida do número da colônia isolada. Por exemplo, o isolado 1B.5 é o 5º isolado da amostra 1B. Os códigos CB.1 a CB.6 referem-se às colônias sequenciadas do inoculante comercial Auras® produzido com *Bacillus aryabhattai* CMAA 1363.

Um total de 26 colônias (63%) foram identificadas como *Enterococcus faecalis*, frequentemente presente na microbiota intestinal de seres humanos e animais e amplamente distribuída no ambiente (Biavasco et al., 2007; Campos et al., 2013).

Diversos isolados de *E. faecalis* têm sido relatados como responsáveis por bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites em humanos, apresentando inclusive resistência a múltiplos antibióticos (Cauwerts et al., 2007; Golob et al., 2019). Além disso, quase 20% dos isolados foram identificados como *Klebsiella pneumoniae* ou *K. quasipneumoniae*, bactérias Gram-negativas patogênicas capazes de causar infecções graves em humanos, também com capacidade em adquirir resistência significativa a diversos antibióticos. O espectro de infecção é amplo, incluindo infecções do trato urinário e infecções do trato respiratório (Chew et al., 2021). Os demais contaminantes foram identificados como *Lactococcus garvieae* (7%). As espécies de *Lactococcus* têm sido tradicionalmente reconhecidas como organismos de baixa virulência que causam infecções oportunistas em humanos. Entretanto, nos últimos anos, um número cada vez maior de patologias em humanos associadas a *L. garvieae* têm sido relatadas, incluindo endocardite, abscesso hepático, diverticulite, peritonite e mesmo septicemia (Choksi et al., 2017).

Em função destes riscos, as amostras de inoculantes produzidas *on farm* neste estudo não foram testadas quanto à eficiência na promoção de crescimento de plantas. Apenas quatro colônias das amostras *on farm* foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, provavelmente *B. megaterium*, presentes nas amostras 1A e 2A, desenvolvidas com foco na multiplicação de *B. megaterium* e *B. subtilis* (Tabela 1). Já nas amostras com foco na multiplicação de *B. arrayabhatii*, 1B e 2B, somente foram observados isolados contaminantes (Tabela 2).

Estudos sobre inoculantes produzidos *on farm* e seus impactos sobre os sistemas de produção e os riscos potenciais para a saúde pública são escassos. No entanto, nossos achados corroboram estudos anteriores que revelaram baixa concentração ou ausência dos microrganismos-alvo (Valicente et al., 2018; Lana et al., 2019; Bocatti et al., 2022). Além disso, também tem sido relatada alta prevalência de contaminantes nas amostras, sendo vários

potencialmente patogênicos para humanos e/ou animais (Lana et al., 2019; Santos et al., 2020; Bocatti et al., 2022).

Assim como outros produtos utilizados na agricultura, a qualidade do produto biológico é essencial para que possa promover os efeitos desejados. O controle de qualidade de insumos microbiológicos deveria ser uma etapa fundamental do processo de produção, seja em laboratórios, biofábricas *on farm* ou nas empresas de grande porte (Monnerat et al., 2020). O controle de qualidade visa avaliar as características de bioprodutos sob diferentes aspectos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia (Yousten, 1984; OECD, 2013).

O efeito negativo de bioinsumos de baixa qualidade vai além do risco à qualidade dos produtos agrícolas, das lavouras e do meio ambiente, pois os benefícios podem não ser alcançados com seu uso. A falta de efeito por não conter o microrganismo-alvo ou mesmo apresentar baixa concentração pode colocar em dúvida tecnologias consolidadas que são importantes para a sustentabilidade de sistemas de produção agrícola brasileiros (Bocatti et al., 2022). Além disso, o excesso de contaminantes presentes em produtos de baixa qualidade pode levar a desequilíbrios ecológicos no solo não previstos, pois a maioria destes microrganismos não faz parte da microbiota nativa dos solos brasileiros.

Caracterização molecular dos isolados de *Bacillus*

O perfil genético das quatro cepas de *Bacillus* isoladas das amostras *on farm*, produzidas com foco na multiplicação de *B. megaterium* e *B. subtilis*, foi comparado com as cepas *B. megaterium* CNPMS B119 e *B. subtilis* CNPMS B2084 presentes no produto comercial BiomaPhos® (Lana et al., 2020). Resultados baseados em ARDRA e ERIC-PCR mostraram perfis idênticos com a cepa *B. megaterium* B119, indicando que o produto comercial BiomaPhos® foi utilizado como inóculo (Figura 3).

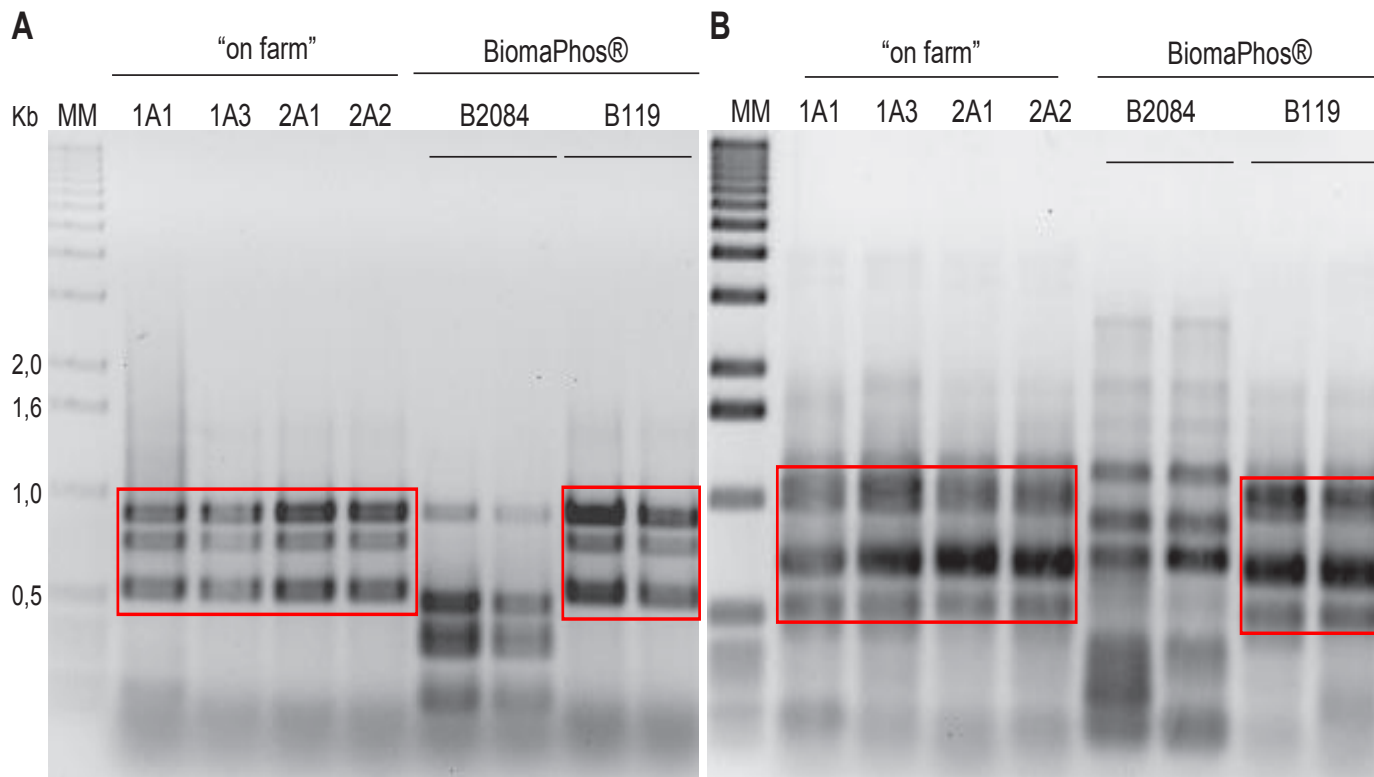


Figura 3. Comparação do perfil genético de cepas de *Bacillus* presentes em amostras *on farm* (1A1, 1A3, 2A1 e 2A2) com aquelas presentes no produto comercial BiomaPhos® (CNPMS B119 e CNPMS B2084) obtida por: **(A)** análises de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) e **(B)** sequências consenso repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR). MM: 1 Kb Ladder (Invitrogen, EUA). Os retângulos em vermelho destacam os perfis idênticos das cepas presentes em amostras *on farm* com a cepa *Bacillus megaterium* CNPMS B119.

Em geral, a multiplicação de microrganismos no sistema *on farm* não observa as premissas contidas na Lei nº 13.123/2015 (Brasil, 2015) e no seu Decreto Regulamentador nº 8.772/2016 (Brasil, 2016), que estabelecem que o acesso ao patrimônio genético brasileiro será realizado mediante cadastro, autorização ou notificação, e serão submetidos a fiscalização, restrições e repartição de benefícios nos termos e nas condições estabelecidas na legislação. Assim, desde 2015, as pesquisas com patrimônio genético brasileiro, assim como o desenvolvimento de produtos com a biodiversidade nacional necessitam de registro das atividades de acesso em um cadastro eletrônico, denominado Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético - S e G. As infrações contra a Lei nº 13.123/2015 estão apresentadas nos artigos 78 a 91 do Decreto nº 8.772/2016, cujas penalidades cabíveis variam desde advertência e apreensão das amostras de patrimônio genético até multa, que pode chegar a dez milhões de reais.

De acordo com Embrapa (2021a), três princípios básicos deveriam ser observados na produção *on farm* de bioinsumos: (1) permissão de multiplicação apenas de microrganismos que constam das listas oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), ou com especificação de referência, e que sejam adquiridos em bancos de germoplasma reconhecidos como oficiais; (2) necessidade de cadastro de estabelecimento produtor de bioinsumos no Mapa e (3) necessidade de um responsável técnico habilitado para a produção de bioinsumos nas fazendas. Juntamente com o atendimento à legislação e às boas práticas de produção, estas recomendações permitiriam aumentar a qualidade, segurança e eficácia dos bioprodutos *on farm* utilizados no Brasil.

Conclusões

As amostras de inoculantes avaliadas produzidas com *Bacillus* em sistema *on farm*, destinados ao uso como promotores de crescimento de plantas, estão altamente contaminadas com microrganismos não-alvo, com potencial risco para saúde humana, animal e ao meio ambiente. O atendimento à legislação, além de ações rígidas de controle de qualidade e fiscalização, são fundamentais para a segurança e eficácia dos bioinoculantes utilizados no Brasil.

Referências

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDS-FJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLI, G.; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3307-3319, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02239-06>.

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, p. 267-280, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00649-2>.

BRASIL. Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016. Regulamenta a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 12 maio 2016. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/decreto/d8772.htm. Acesso em: 13 mar. 2022.

BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1º, a alínea j do Artigo 8º, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto no 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 14 maio 2015. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2015/lei/l13123.htm. Acesso em: 13 mar. 2022.

BRASIL. Ministério da Pecuária, Agricultura e Abastecimento. **Brasil deve ser destaque mundial no uso de bioinsumos nos próximos anos**. Brasília, DF, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noti->

cias/brasil-deve-ser-destaque-mundial-no-uso-de-bioinsumos-nos-proximos-anos. Acesso em: 11 jan. 2022.

CAMPOS, A. C. F. B.; SOUZA, N. R.; SILVA, P. H. C. da; SANTANA, A. P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 5, p. 575-580, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000500004>.

CAUWERTS, K.; DECOSTERE, A.; GRAEF, E. M. de; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p. 395-399, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450701589167>.

CHEW, K. L.; OCTAVIA, S.; LAI, D.; LIN, R. T. P.; TEO, J. W. P. Genomic characterization of *Klebsiella quasipneumoniae* from clinical specimens in Singapore. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 8, e0041221, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00412-21>.

CHOKSI, T. T.; DADANI, F. Reviewing the emergence of *Lactococcus garvieae*: a case of catheter associated urinary tract infection caused by *Lactococcus garvieae* and *Escherichia coli* coinfection. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2017, article 5921865, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/5921865>.

EMBRAPA. **Produção de microrganismos para uso próprio na agricultura (on-farm):** esclarecimentos oficiais. Brasília, DF, 2021a. 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. Acesso em: 11 jan. 2022.

EMBRAPA. **Bactéria encontrada no mandacaru vira bioproduto que promove tolerância à seca em plantas.** Brasília, DF, 2021b. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/60941801/bacteria-encontrada-no-mandacaru-vira-bioproduto-que-promove-tolerancia-a-seca-em-plantas>. Acesso em: 7 mar. 2022.

GOLOB, M.; PATE, M.; KUŠAR, D.; DERMOTA, U.; AVBERŠEK, J.; PAPIĆ, B.; ZDOVC, I. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. **BioMed**

Research International, v. 9, article 2815279, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/2815279>.

HAUTRIVE, T. P. **Ciência e tecnologia de alimentos**. Florianópolis: Insular, 2021. (Atualidades, v. 1).

KAVAMURA, V.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L. da; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. de. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>.

LANA, U. G. de P.; TAVARES, A. N. G.; AGUIAR, F. M.; GOMES, E. A.; VALICENTE, F. H. **Avaliação da qualidade de biopesticidas à base de *Bacillus thuringiensis* produzidos em sistema “on farm”**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2019. (Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 191).

LANA, U. G. de P.; RODRIGUES, M. E. G. de M.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; SOUSA, S. M. de; TAVARES, A. N. G.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A. Polyphasic characterization of *Bacillus* strains isolated from maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 19, e1190, 2020. DOI: <https://doi.org/10.18512/rbms2020v19e1190>.

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

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development . **Test 122: determination of pH, acidity and alkalinity**. Paris, 2013. 6 p. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264203686-en>.

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, p. 1782-1787, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.012>.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; COTA, L. V.; SANTOS, F. C. dos; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; OLIVEIRA, M. C.; MATTOS, B. B.; ALVES, V. M. C.; RIBEIRO, V. P.; VASCO JÚNIOR, R. **Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *Bacillus megaterium* (CNPMS B119) na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020. 18 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 260).

OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; BINI, D.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SANTOS, F. C. dos; COTA, L. V.; SOUSA, S. M. de; ALVES, V. M. C.; LANA, U. G. de P.; SOUZA, F. F. de. **Inoculante à base de bactérias solubilizadoras de fosfato nas culturas do milho e da soja (BiomaPhos®): dúvidas frequentes e boas práticas de inoculação**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2021. 17 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 252).

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**, v. 9, article 205, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.

SANTOS, A. F. de J.; DINNAS, S. S. E.; FEITOZA, A. F. A. Qualidade microbológica de bioprodutos comerciais multiplicados *on farm* no Vale do São Francisco: dados preliminares. **Encilopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, p. 429-443, 2020.

SOARES, C. M. S. Produção, formulação e aplicação de bactérias. In: OLIVEIRA-FILHO, E. C.; MONNERAT, R. G. (ed.). **Fundamentos para a regulação de semioquímicos, inimigos naturais e agentes microbiológicos de controle de pragas**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2006. p. 219-238.

SPEARS, J. L.; KRAMER, R.; NIKIFOROV, A. I.; RIHNER, M. O.; LAMBERT, E. A. Safety assessment of *Bacillus subtilis* MB40 for use in foods and dietary supplements. **Nutrients**, v. 13, n. 3, article 733, 2021. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fnu13030733>.

TURNER, S.; PRYER, K. M.; MIAO, V. P. W.; PALMER, J. D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.

46, n. 4, p. 327-338, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>.

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***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 20 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 239).

VELLOSO, C. C. V.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; GOMES, E. A.; LANA, U. G. de P.; CARVALHO, C. G. de; 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, f157, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa157>.

VENDA de insumos biológicos aumenta 37% no País. Rio de Janeiro: Sociedade Nacional de Agricultura, 2021. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/venda-de-insumos-biologicos-aumenta-37-no-pais/>. Acesso em: 14 mar. 2022.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093%2Fnar%2F19.24.6823>.

XIE, Y.; TIAN, L.; LI, G.; QU, H.; SUN, J.; LIANG, W.; LI, X.; WANG, X.; DENG, Z.; LIU, J.; OU, H. Y. Emergence of the third-generation cephalosporin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to the acquisition of a self-transferable bla (DHA-1)-carrying plasmid by an ST23 strain. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 838-844, 2018. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080%2F21505594.2018.1456229>.

YOUSTEN, A. A. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. **Advances in Biotechnology Processes**, v. 3, p. 315-343, 1984.

Literatura Recomendada

ABREU, C. S. de; FIGUEIREDO, J. E. F.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. de A.; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4238/gmr16019294>.

RIBEIRO, V. P.; MARRIEL, I. E.; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; MATTOS, B. B.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A.; GOMES, E. A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49S, p. 40-46, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>.

Embrapa

Milho e Sorgo



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

