



**EFEITO DA VINHAÇA, MELAÇO, XAROPE DE MILHO E
MACADÂMIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE BACTÉRIAS EDÁFICAS
UTILIZADAS NA AGRICULTURA**

MARIA ELÍZIA PACHECO FERREIRA

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE, SEGURANÇA ALIMENTAR
E AMBIENTAL NO AGRONEGÓCIO

**EFEITO DA VINHAÇA, MELAÇO, XAROPE DE MILHO E
MACADÂMIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE BACTÉRIAS EDÁFICAS
UTILIZADAS NA AGRICULTURA**

MARIA ELÍZIA PACHECO FERREIRA

Tese apresentada para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

São Paulo

2024

MARIA ELIZIA PACHECO FERREIRA

**EFEITO DA VINHAÇA, MELAÇO E XAROPE DE MILHO E
MACADÂMIA SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE BACTÉRIAS EDÁFICAS
UTILIZADAS NA AGRICULTURA**

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e
Sanidade no Agroecossistema.

Orientador: Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

SÃO PAULO
2024

Eu, Maria Elízia Pacheco Ferreira, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico, repositório institucional ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte. Declaro também que os dados contidos nesta tese são inéditos e autênticos, portanto, sem fraudes e/ou derivações de plágio e que tenho pleno conhecimento do Código de Ética e dos Procedimentos referentes à proteção da integridade científica do Instituto Biológico.

Assinatura: _____ Data ____/____/____

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Instituto Biológico
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Ferreira, Maria Elízia Pacheco

Efeito da Vinhaça, Melaço, Xarope de Milho e Macadâmia sobre a proliferação de bactérias edáficas utilizadas na agricultura. / Maria Elízia Pacheco Ferreira. - São Paulo, 2024.

96 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA.2024T.MF01

Tese (Doutorado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

Linha de pesquisa: Biodiversidade: caracterização, interações, interações ecológicas em agroecossistemas.

Orientador: Luís Garrigós Leite.

Versão do título para o inglês: Effect of Vinasse, Molasses, Corn Syrup and Macadamia Nuts on the proliferation of soil bacteria, some used in agriculture.

1. Actinobacteria 2. Biofertilizante 3. Bioinsumos 4. Subprodutos 5. Resíduos I. Ferreira, Maria Elízia Pacheco II. Leite, Luís Garrigós III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

IB/Bibl./2024/01

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Maria Elízia Pacheco Ferreira

Título: Efeito da Vinhaça, Melaço, Xarope de Milho e Macadâmia sobre a proliferação de bactérias edáficas utilizadas na agricultura.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Doutora em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 15/03/2024

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luís Garrigós Leite

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof. Dr. Fernando Berton Baldo

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Suzete Aparecida L. Deltefano

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof^a. Dr^a. Luciana aparecida Carlini Garcia

Instituição: Apta Regional

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

Prof. Dr. Pedro Henrique Riboldi Monteiro

Instituição: Divisão de Recursos Microbianos
DRM Unicamp

Julgamento: Aprovada

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico o título de Doutora que consegui aos amores da minha vida: Augustinho (esposo), Camila, Natália e Vítor (meus três lindos filhos), Vicente e Elízia (meus pais)

Pelo carinho e paciência que tiveram comigo nesses quatro longos anos e pelas muitas horas que lhes roubei durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, **Dr. Luís Garrigós Leite**, pelos ensinamentos e por ter sido tão dedicado, gentil e paciente durante a realização deste trabalho.
- A minha professora de estatística Dra. Luciana A. Carlini Garcia pelo auxílio durante a análise estatística do meu trabalho.
- Aos membros da banca Dr. Fernando Baldo, Dra. Suzete, Dra. Luciana Garcia e Dr. Pedro por ter me auxiliado na escrita da tese.
- A minha amiga Dra. Maria Del Pilar Rodriguez, pelo auxílio durante a análise biomolecular das Actinobactérias.
- As minhas grandes amigas estagiárias Aline Baisso e Nicolý Martins, que muito me ajudaram na realização dos experimentos que culminaram nesta tese. Sou muito agradecida a elas.
- A todos os pesquisadores do Instituto Biológico, pelo apoio e boa convivência.
- A todos os amigos e companheiros do Laboratório de Controle Biológico que conviveram comigo durante os longos anos, agradeço pela ajuda, paciência e compreensão.
- À Usina Abengoa e Usina São João por cederem as amostras de solo, potes de vinhaça e melação utilizados durante os experimentos.
- E finalmente, a toda a minha família: esposo, filhos, pais, irmãos, e aos verdadeiros amigos que sempre me incentivaram a trilhar novos caminhos e a não desistir dos meus sonhos.

Agradeço a Deus por fazer parte da história de todas estas pessoas!

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, também sendo financiado em parte pelo INCT”

“... Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

FERREIRA, Maria Elízia Pacheco. **Efeito da Vinhaça, Melaço, Xarope de Milho e Macadâmia sobre a proliferação de bactérias edáficas utilizadas na agricultura.** 2024. 96 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

O Brasil apresenta crescimento de produção e utilização de bioinsumos agrários, sendo alternativa de diminuição dos desafios da agricultura moderna. Os produtores agrários utilizam resíduo vinhaça e subproduto melaço das usinas sucroalcooleiras como fertilizantes de diversas culturas, devidos seus compostos orgânicos e nutrientes químicos. E os substratos xarope de milho e macadâmia também podem ser utilizados como fertilizantes, por serem ricos em carboidratos e nutrientes químicos. Tais substratos também podem ser eficientes para proliferação de bactéria edáfica, algumas sendo utilizadas como bioinsumos biofertilizadores e biocontroladores de pragas e patógenos agrários. O efeito dos substratos vinhaça, melaço, xarope de milho e macadâmia sobre a proliferação de bactérias edáficas e de bioinsumos agrários foi o destaque deste trabalho. Objetivos: (i) Avaliar o efeito da vinhaça, do xarope de milho e do melaço na proliferação de bactérias edáficas de solos superficiais e solos inferiores (50cm); (ii) Avaliar o efeito da vinhaça, xarope de milho, melaço e macadâmia sobre 15 espécies bacterianas (bioinsumos agrários da coleção de bactérias do Controle Biológico/IB). (iii) Realizar a identificação biomolecular de isolados bacterianos filamentosos proveniente de solos (isolados na Fase 1). (iv) Avaliar a eficiência do melaço (2%) sobre a proliferação de bactérias edáficas (solos superficiais e inferiores com diferente concentração de Oxigênio no procedimento metodológico). Metodologia- O presente trabalho foi dividido em 4 fases: Fase 1 – Análise quantitativa de UFC/g de solos superficiais e inferiores (50cm), tratados com H₂O, vinhaça, melaço, xarope de milho (6 amostras). Plaqueamento em 2, 15 e 30 dias; as placas contendo inóculos de solos inferiores foram colocadas dentro de potes com vela acesa (baixa concentração de O₂). Fase 2 – Análise quantitativa de UFC/ml de meio contendo bactérias (bioinsumos agrários - 15 espécies), inoculadas em meios puros, com vinhaça, melaço, xarope de milho e macadâmia (7%). Fase 3 – Sequenciamento biomolecular de 44 bactérias edáficas filamentosas (isoladas na fase 1). Fase 4 – Análise quantitativa de UFC/mL de meios puros e com melaço (2%) contendo bactérias edáficas (solos superiores e inferiores). Tubos contendo meio NB e bactérias de

solos superficiais foram colocados em agitadores; tubos contendo meio MRS/Caldo e bactérias de solos inferiores foram colocados dentro de potes de vidro contendo velas acesas. Nos plaqueamentos, as placas contendo inóculos de solos inferiores foram colocadas dentro de potes com vela acesa (baixa concentração de O₂). Resultados: Fase 1 – Nos solos superficiais: maior proliferação bacteriana no Tratamento xarope de milho; vinhaça apresentou média eficiência; melão apresentou baixa eficiência. Nos solos inferiores: Melão, Vinhaça e Xarope de milho apresentaram maior eficiência do que o Tratamento Controle. Fase 2 – Macadâmia e vinhaça apresentaram eficiência para a proliferação da maioria dos bioinsumos agrários (sem diferença significativa com o controle). Melão e xarope de milho apresentaram baixa eficiência. Fase 3 – 27 inóculos - Actinobactérias dos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Brevibacterium* e *Dietzia*. Fase 4 - Melão não apresentou eficiência na proliferação das bactérias de solos superiores em alta concentração de Oxigênio. Conclusão: Vinhaça, Xarope de Milho, Melão e Macadâmia são proliferadores de algumas espécies bacterianas edáficas e bioinsumos agrários.

PALAVRAS-CHAVE: Actinobactéria. Biofertilizante. Bioinsumos. Subprodutos. Resíduos.

ABSTRACT

FERREIRA, Maria Elízia Pacheco. **Effect of Vinasse, Molasses, Corn Syrup and Macadamia Nuts on the proliferation of soil bacteria used in agriculture.** 2024. 96 f. Tese (Doutorado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2024.

Brazil presents growth in production and use of agricultural bio-inputs, providing an alternative to reducing the challenges of modern agriculture. Agricultural producers use vinasse residue and molasses by-product from sugar and alcohol plants as fertilizers for various crops, due to their organic compounds and chemical nutrients. And corn syrup and macadamia substrates can also be used as fertilizers, as they are rich in carbohydrates and chemical nutrients. Such substrates can also be efficient for the proliferation of soil bacteria, some being used as bioinputs, biofertilizers and biocontrollers for pests and agricultural pathogens. The effect of vinasse, molasses, corn syrup and macadamia substrates on the proliferation of soil bacteria and agricultural bioinputs was the highlight of this work. Objectives: (i) Evaluate the effect of vinasse, corn syrup and molasses on the proliferation of soil bacteria in surface soils and lower soils (50cm); (ii) Evaluate the effect of vinasse, corn syrup, molasses and macadamia nuts on 15 bacterial species (agrarian bioinputs from the Biological Control/IB bacteria collection). (iii) Perform biomolecular identification of filamentous bacterial isolates from soil (isolated in Phase 1). (iv) Evaluate the efficiency of molasses (2%) on the proliferation of soil bacteria (surface and lower soils with different concentrations of Oxygen in the methodological procedure). Methodology - The present work was divided into 4 phases: Phase 1 – Quantitative analysis of CFU/g of surface and lower soils (50cm), treated with H₂O, vinasse, molasses, corn syrup (6 samples). Plating in 2, 15 and 30 days; the plates containing inocula from inferior soils were placed inside pots with a lit candle (low O₂ concentration). Phase 2 – Quantitative analysis of CFU/ml of medium containing bacteria (agrarian bio-inputs - 15 species), inoculated in pure media, with vinasse, molasses, corn syrup and macadamia nuts (7%). Phase 3 – Biomolecular sequencing of 44 filamentous soil bacteria (isolated in phase 1). Phase 4 – Quantitative analysis of CFU/mL of pure media and with molasses (2%) containing soil bacteria (upper and lower soils). Tubes containing NB medium and surface soil bacteria were placed on shakers; tubes containing MRS/Broth medium and bacteria from lower soils were placed inside glass jars

containing lit candles. When plating, plates containing inocula from inferior soils were placed inside pots with a lit candle (low O₂ concentration). Results: Phase 1 – In surface soils: greater bacterial proliferation in the corn syrup treatment; vinasse showed average efficiency; molasses showed low efficiency. In the lower soils: Molasses, Vinasse and Corn Syrup showed greater efficiency than the Control Treatment. Phase 2 – Macadamia and vinasse were efficient for the proliferation of most agricultural bioinputs (without significant difference with the control). Molasses and corn syrup showed low efficiency. Phase 3 – 27 inocula - Actinobacteria of the genera *Streptomyces*, *Nocardia*, *Promicromonospora*, *Brevibacterium* and *Dietzia*. Phase 4 - Molasses was not efficient in the proliferation of bacteria from higher soils in high oxygen concentrations. Conclusion: Vinasse, Corn Syrup, Molasses and Macadamia are proliferators of some soil bacterial species and agricultural bio-inputs.

KEYWORDS: Actinobacteria. Biofertilizer. Bioinputs. By-products. Waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Distribuição percentual de diferentes classes de filo Actinobacteria (YADAV <i>et al.</i> , 2018)30
FIGURA 2	Tipo, número de esporos e seus arranjos (SILVA, 2010): A – Esporo único; B – Pares longitudinais; C – Cadeia longa de esporos; D – Esporos contidos dentro de esporângios; E – Esporos com arranjos simples; F – Esporos com arranjo verticilado33
FIGURA 3	Complexo Agroindustrial da Cana35
FIGURA 4	Cadeias de Produção do Etanol de 1 ^a e 2 ^a Geração35
FIGURA 5	Árvore da Noz Macadâmia (KAUCOFFEEMILL, 2015 apud FERREIRA, 2015)41
FIGURA 6	Carpelo, casca e amêndoa da noz macadâmia (INTERMAC, 2010 apud FERREIRA, 2015)41
FIGURA 7	Locais de coleta de amostras de solo do canavial próximo à Usina Abengoa.....50
FIGURA 8	Diluição seriada e plaqueamento das seis amostras de solos superficiais dos tratamentos controle, vinhaça, melão e xarope de milho (2 dias, 15 dias e 30 dias após a coleta)51
FIGURA 9	Diluição seriada e plaqueamento das seis amostras de solos inferiores dos tratamentos controle, vinhaça, melão e xarope de milho (2 dias, 15 dias e 30 dias após a coleta)52
FIGURA 10	Incubação de bactérias edáficas em condições de baixa concentração de oxigênio (vela acesa)53
FIGURA 11	Preparação do experimento para avaliação do efeito da vinhaça, xarope de milho, melão e macadâmia sobre as bactérias utilizadas na produção agrícola54
FIGURA 12	Característica morfológica de colônias de Actinomicetos.....55
FIGURA 13	Bactéria filamentosa (Actinobactéria).....55
FIGURA 14	Cultura de bactérias de solos inferiores em meio Caldo MRS puro e com melão.....57
FIGURA 15	Incubação das bactérias de solos inferiores, cultivadas em meio de cultura MRS puro e com Melão58
FIGURA 16	Diferenças entre os níveis de média dos tratamentos.....61
FIGURA 17	Interação Tempos (N1-2dias; N2-15dias; N3-30dias) x Tratamentos (Controle; Melão; Vinhaça; Xarope de Milho) em solos superficiais e em solos inferiores61
FIGURA 18	Diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos: 2 dias/15 dias/30 dias.....62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Gêneros bacterianos da família Bacillaceae - Reclassificação dos <i>Bacillus</i> (<i>B.</i>)23
TABELA 2	Classes, Ordens e Famílias pertencentes ao Filo Actinomycetota, também denominado Actinobactéria (YADAV <i>et al.</i> , 2018)29
TABELA 3	Antibióticos produzidos por Actinobactérias.....31
TABELA 4	Tratamentos das amostras de solos superficiais para isolamento de bactérias edáficas (alta concentração de oxigênio)51
TABELA 5	Tratamentos das amostras de solos inferiores (50cm) para isolamento de bactérias edáficas (baixa concentração de oxigênio)52
TABELA 6	Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solos superficiais e solos inferiores 6 amostras/4 Tratamentos.....60
TABELA 7	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bacillus subtilis</i>67
TABELA 8	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>67
TABELA 9	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Azospirillum brasilense</i>68
TABELA 10	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bacillus velezensis</i>68
TABELA 11	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Priestia aryabhatai</i>68
TABELA 12	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> Kurstaki (BtK)69
TABELA 13	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bacillus pumilus</i>69
TABELA 14	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bacillus licheniformis</i>69
TABELA 15	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Priestia megaterium</i>70
TABELA 16	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Pseudomonas putida</i>70
TABELA 17	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Pseudomonas fluorescens</i>70
TABELA 18	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Streptomyces violaceus</i>71
TABELA 19	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Saccharopolyspora spinosa</i>71
TABELA 20	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Chromobacterium subtsugae</i>71
TABELA 21	Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>72
TABELA 22	Identificação dos isolados usando o primer rRNA 16S, baseadas na análise BLAST do genbank74
TABELA 23	Média das Bactérias cultivadas em meios de cultura puro ou com Melaço (2%)77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Ágar Caseína Amido
ACCD	Aminociclopropano Carboxilato Desaminase
ACT	Aerated Compost Tea
APTA	Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
B	Boro
C	Carbono
Ca	Cálcio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cr	Crômio
CSIs	Indels de assinatura conservados
CTC	Capacidade de troca catiônica
Cu	Cobre
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EM	Microrganismos eficientes
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERGS	Energia Liberada por Grama de Solo)
F	Flúor
Fe	Ferro
H	Hidrogênio
HFCS	High Fructose Corn Syrup
I	Iodo
K	Potássio
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
N	Nitrogênio
Na	Sódio
Ng	Nanograma
NO ₃	Nitrato
O	Oxigênio
P	Fósforo
PGPR	Plant Growth-Promoting Rhizobacteria
PNSB	Bactéria púrpuras não sulfurosas
PSB	Bactéria púrpuras sulfurosas
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossômico
S	Enxofre
SCBCS	Sugar Cane Business Case Sustainability
Se	Selênio
Si	Silício
SO ₄	Sulfato
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por Mililitro
V	Vanádio
YMA	Yeast Manitol Agar
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2. OBJETIVOS: Geral e Específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Produção de Bioinsumos <i>On farm</i>.....	21
3.2. Bactérias Biocontroladoras e Biofertilizadoras utilizadas na Agricultura.....	22
3.2.1. <i>Bacillus</i> spp. e gêneros correlatos como agentes de controle biológico de pragas e patógenos	22
3.2.2. Bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR) - aeróbicas e microaerofílicas	26
3.2.3. Bactérias Actinomicetos (Actinobactérias)	28
3.3. Produtos utilizados em biofertilização de solo agrário – Vinhaça/ Melaço/ Xarope de milho	34
3.3.1. Vinhaça	34
3.3.2. Melaço	38
3.3.3. Xarope de Milho	40
3.3.4. Extrato de Macadâmia	41
3.4. Fatores que geram o equilíbrio ou desequilíbrio do solo	42
3.4.1. Compost Tea e Extrato de Composto - Receitas equilibradoras do solo	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1. Resíduos e subprodutos industriais na proliferação de bactérias do solo.....	49
4.2. Resíduos e subprodutos industriais no crescimento de bactérias em meio de cultura líquido	53
4.3. Bactérias filamentosas - Actinobactérias – isoladas do solo com resíduos e subprodutos industriais.....	55
4.4. Melaço na proliferação de bactérias em cultura líquida.....	56
4.5. Análise estatística	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
5.1. Resíduos e subprodutos industriais na proliferação de bactérias no solo.....	60
5.2. Resíduos e subprodutos industriais no crescimento de bactérias em cultura líquida.....	67

5.3. Bactérias filamentosas - Actinobactérias – isoladas do solo com resíduos e subprodutos industriais	74
5.4. Melaço na proliferação de bactérias em cultura líquida.....	76
6. CONCLUSÕES.....	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8. ANEXOS.....	91
8.1. Coloração de Gram.....	91
8.2. Meio de Cultura ACA (Ágar Amido Caseína)	91
8.3. Meio de Cultura YMA	91
8.4. Meio de Cultura MRS	92
8.5. Meio de cultura NFB	92
8.6. Procedimentos da análise molecular das bactérias filamentosas	93

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Agronegócio é um dos principais setores da economia brasileira que integra práticas urbanas e rurais. Historicamente o termo agronegócio é oriundo do vocábulo *Agribusiness*, idealizado pelos americanos John Davis e Ray Goldberg, professores da Universidade de Harvard no ano de 1957 (OLIVEIRA, 2011).

Alguns estudos apontaram que o Brasil é um país que apresentou grande produção em várias culturas agrícolas no ano de 2021. As principais culturas agrícolas apontadas foram: soja, trigo, feijão, frutas, algodão, lenha em madeira em tora e milho. E além destas culturas na produção de café e cana-de-açúcar, o Brasil foi o líder mundial (EMBRAPA, 2022a):

Como aponta o terceiro levantamento da safra 2022/2023 realizado pela CONAB, o Brasil é o maior produtor mundial da cana-de-açúcar, com uma produtividade de 578.768,1 toneladas na safra 2021/2022 (área cultivada 8.345,0 hectares) com estimativa de 598.345,4 toneladas na safra 2022/2023 (área cultivada 8.307,3 hectares). Entre os maiores estados produtores sucroalcooleiros do Brasil estão São Paulo (308,1 milhões de toneladas), Goiás (71,1 milhões de toneladas) e Minas Gerais (68,4 milhões de toneladas) (CONAB, 2022).

Como já apontado, a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura de grande relevância na economia brasileira, sendo utilizada como alimento animal (forragem *in natura*), matéria prima para fabricação de alimentos, bebidas, biocombustíveis (como o etanol), bioplásticos, além de geração de energia produzida a partir do bagaço proveniente do seu processamento. Além disso, o cultivo de cana-de-açúcar é uma atividade de agronegócio de grande importância social, pois é responsável por grande geração de empregos formais. O complexo sucroalcooleiro foi responsável por 712.182 empregos formais do agronegócio brasileiro onde a estrutura produtiva contou com 389 unidades e mais de 1000 municípios com atividade vinculada à indústria sucroenergética no país (RAIS 2019; MAPA apud SIAMIG, 2021)

A produção do etanol gera alguns resíduos como a vinhaça e torta de filtro e alguns subprodutos como melaço que podem ser utilizados na fertilização do solo dos canaviais e de outras culturas vegetais. E no presente trabalho, está sendo analisado o efeito da vinhaça e do melaço sobre a proliferação bacteriana agrária.

Ao longo da história do cultivo da cana-de-açúcar, a colheita realizada através da queimada sempre trouxe grandes problemas ambientais, causados pela liberação de

substâncias tóxicas no ar, mortalidade de animais e microrganismos habitantes dos canaviais, além de gerar problemas de saúde aos trabalhadores e moradores da região. Em virtude de tais problemas, incluindo a escassez de mão-de-obra, a colheita de cana-de-açúcar de forma mecanizada iniciou em 1970, e foi promulgada pela Lei nº 11.241, em 19 de setembro de 2002, estipulou um cronograma gradativo de extinção das queimadas dos canaviais, que gradativamente iria introduzir a técnica da colheita mecanizada da cana-de-açúcar. No Estado de São Paulo, a lei determinava que as queimadas fossem banidas até o ano de 2021 em áreas mecanizáveis, e até 2031 em áreas não mecanizáveis. Contudo, em junho de 2007, foi assinado um protocolo de cooperação entre o governo do Estado de São Paulo e a União da Agroindústria de São Paulo – UNICA – denominado Protocolo Agroambiental, que visou a antecipação da eliminação das queimadas, que seriam banidas até o ano de 2017. O protocolo não tinha força de lei já que não substituiu a Lei Estadual nº 11.241, mas teve grande aceitação por parte dos canavieiros. (SÃO PAULO, 2002; JESUS e TORQUATO, 2014)

A mudança da técnica de colheita da cana trouxe benefícios ambientais e à saúde pública, além de garantir o aumento de um insumo valioso para a geração de eletricidade, já que permite a utilização das palhas e das pontas que anteriormente eram queimadas. Entretanto, o aumento expressivo da área cultivada, associado a monocultura da cana-de-açúcar e a proibição das queimadas dos canaviais tem gerado um aumento na ocorrência de ervas daninhas, fitopatógenos e insetos-pragas, alguns deles com grande potencial destrutivo e responsáveis pela diminuição da produtividade nos canaviais (V RIFIB, 2001).

Desde o final da Segunda Guerra Mundial, o controle de pragas na agricultura e na pecuária dependia principalmente da aplicação intensiva de inseticidas sintéticos. O mercado global de pesticidas ainda apresentava crescimento em cerca de 3,6% ao ano e avaliado em torno de US \$47 bilhões (BCC RESEARCH, 2010 apud RUIU; SATTA; FLORIS, 2013). Apesar da utilização dos pesticidas sintéticos ainda serem necessários para que os agricultores controlem as pragas e os fitopatógenos agrícolas, a utilização de bioinsumos como biocontroladores e biofertilizadores está aumentando no Brasil e no mundo.

A produção dos bioinsumos específicos ocorreu após estudos científicos que geraram a descoberta e a possibilidade de utilização progressiva de várias espécies microbianas entomopatogênicas, incluindo bactérias, vírus, protozoários, fungos, microsporídios, nematoides (VEJA; KAYA, 2012 apud RUIU; SATTA; FLORIS, 2013).

Segundo a Embrapa, a demanda por insumos biológicos, conhecidos como Bioinsumos, está em crescimento no Brasil, seguindo a tendência mundial, o que está gerando

o surgimento de empresas de pequeno, médio e grande porte. E a expansão do mercado de bioinsumos está sendo estimulada pela implantação do Programa Nacional de Bioinsumos e com isso nas propriedades agrícolas está acontecendo a produção dos bioinsumos para uso próprio, também conhecida como Produção *on farm*. Esta produção está contribuindo para a sustentabilidade e competitividade da agricultura brasileira, porque os bioinsumos produzidos por produtores *on farm* apresentam custos menores quando comparados aos bioinsumos comerciais. Entretanto, a maioria dos produtores desconhecem os protocolos adequados para produzir microrganismos em larga escala. A produção de bioinsumos *on farm* de má qualidade pode gerar problemas ao setor agrícola, à saúde humana e à contaminação ambiental (EMBRAPA, 2021).

Por isso, as organizações que realizam estudos científicos sobre microrganismos utilizados como biofertilizadores e biocontroladores de pragas e fitopatógenos (tais como Instituto Biológico, Instituto de Agricultura Biológica, Instituto Agrônômico, Embrapa, Universidades Públicas, entre outros) auxiliam a produção *on farm*, melhorando a qualidade dos bioinsumos, o que garante a diminuição dos prejuízos econômicos na agricultura, os impactos ambientais causados pelos agrotóxicos e os problemas de saúde humana gerados por microrganismos patogênicos.

Dentre as bactérias biocontroladores de pragas e fitopatógenos utilizadas por produtores *on farm*, as mais importantes pertencem aos Gêneros *Bacillus* e correlatos (gêneros que outrora faziam parte do gênero *Bacillus*).

De outro lado, insumos biofertilizantes da produção *on farm* são compostos por Bactérias Promotoras de Crescimento de Planta (BPCP), que estimulam o crescimento vegetal através de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, além de aumentar a resistência a doenças e aos estresses.

O solo é o maior reservatório de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, principalmente de bactérias, sendo que, menos de 1% são cultivados e caracterizados (HANDELSMAN, 2005).

Entretanto, segundo Martins e Campos (2011), a vinhaça (resíduo sucroalcooleiro) está sendo utilizada como fertilizante em culturas agrícolas, permitindo o aumento da comunidade biológica do solo (em função das altas taxas de matéria orgânica), que pode servir de bioindicadora para avaliação dos solos fertirrigados pela vinhaça, já que estes microrganismos são sensíveis às mudanças no ambiente.

Com o aumento gradativo da produção de álcool, alguns de seus resíduos como a vinhaça também tem apresentado crescimento, o que tem gerado grande preocupação, já que

podem se transformar em contaminantes de solos e lençóis freáticos, quando utilizados em doses elevadas e de maneira incorreta.

A cada litro de etanol produzido observa-se a produção de 10 a 15 litros de vinhaça, que até a década de 70 era descartada em rios e ribeirões próximos às usinas (OLIVEIRA, *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2013).

O melaço de cana (subproduto sucroalcooleiro) e xarope de milho também estão sendo utilizados como fertilizantes em solos agrícolas, em função das taxas de nutrientes presentes. Por ser uma ótima fonte de carboidratos, o Melaço da Cana tem a função de alimentar e estimular os microrganismos benéficos do solo, como as Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas “BPCP” (DANTAS, 2020).

E como atualmente a vinhaça, o xarope de milho e o melaço estão sendo muito utilizados como fertilizantes nos solos agrícolas, é importante verificar através de estudos acadêmicos, quais os microrganismos edáficos ou rizosféricos são compatíveis a eles.

Os produtos de macadâmia, utilizados para alimentação, cosméticos e fármacos são ricos de diversos nutrientes, tais como ácidos graxos, proteínas, carboidratos e vários elementos químicos. E os resíduos gerados no processo de extração de óleo de Macadâmia, pode ser um futuro fertilizante orgânico para diversas culturas agrárias, além de se apresentar muito importante para os microrganismos edáficos (LEMOS, 2023; FERREIRA, 2015).

Embora a agricultura convencional já indique a necessidade de diminuir a utilização de substâncias químicas nas lavouras (aumentando o uso dos bioinsumos), novas ideologias agrícolas (citadas pela Nova Ordem Alimentar) estão apontando que a agricultura convencional vem produzindo grande quantidade de alimentos, porém de baixa qualidade nutricional e baixa densidade. Por isso, esta nova filosofia sugere outras formas de fazer produção agrícola, que enfatizam a importância da análise do teor de Sólidos Solúveis Totais (SST) dos produtos agrários ou do solo (conhecida como Índice Refratométrico ou grau BRIX), objetivando equilibrar os fatores bióticos e abióticos do solo e gerar uma agricultura sustentável (GARCIA, 2022).

Diante destes fatos, o presente trabalho visou apontar a importância de realizar estudos científicos para que se conheça o efeito da vinhaça, do xarope de milho, do melaço e da macadâmia sobre bactérias edáficas e de bioinsumos agrários biocontroladores e biofertilizadores, além de identificar Actinobactérias isoladas das amostras de solos, visando com isso, auxiliar a produção agrícola (incluindo a produção *On farm*) a diminuir o uso de agroquímicos maléficis socioambientais, valorizando a agricultura sustentável.

2. OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar o efeito da Vinhaça, do Xarope de Milho, do Melaço de Cana e da Macadâmia sobre a comunidade de bactérias edáficas, algumas delas utilizadas pela produção agrícola, como bioinsumos biocontroladores (de pragas e fitopatógenos), biofertilizadores e decompositores de matéria orgânica.
- Identificar algumas linhagens bacterianas filamentosas (Filo Actinobacteria), isoladas das amostras de solos coletadas, no intuito de se encontrar novos bioinsumos que podem ser utilizados na produção agrícola (incluindo a produção *On farm*).

Específicos:

- Analisar quantitativamente a eficiência dos substratos Vinhaça, Xarope de Milho e Melaço de Cana como substâncias proliferadoras de bactérias edáficas, de solos superficiais e inferiores (50cm).
- Analisar quantitativamente o efeito dos substratos Vinhaça, Melaço, Xarope de Milho e Macadâmia (7%) sobre 15 linhagens (oriundas da coleção de bactérias André Tosello, Campinas/ SP) pertencentes à coleção do Laboratório de Controle Biológico/IB, utilizadas como bioinsumos agrários.
- Identificar, por métodos moleculares, bactérias filamentosas pertencentes ao Filo Actinobacteria, isoladas das amostras de solos (bactérias muito utilizadas na decomposição de matéria orgânica)
- Avaliar a eficiência do melaço de cana sobre a proliferação de bactérias de solos superficiais (utilizando metodologia de alta concentração de Oxigênio) e em solos inferiores - 50cm (utilizando metodologia de menor concentração de Oxigênio).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de Bioinsumos *On farm*

On farm é uma técnica de produção de bioinsumos (produção de insumos microbiológicos) que é realizada dentro da própria fazenda e que utilizam laboratórios exclusivos e específicos para cada produtor, de acordo com seu objetivo ou tipo de cultura. O termo *On farm* é oriundo da língua inglesa que significa: On – dentro; Farm – Fazenda. Esta técnica substitui agrotóxicos por bioinsumos, diminuindo desvantagens tais como, perigos para saúde humana, contaminação ambiental, geração de insetos resistentes, entre outras. Mas São Paulo é um estado que já apresenta produção *on farm*.

A demanda de bioinsumos no Brasil está crescendo, sobretudo nas propriedades produtoras de grãos da região centro-oeste e em Minas Gerais. No sul do Brasil, o Paraná é o estado que apresenta maior demanda de bioinsumos, sendo também solicitados em Santa Catarina e Rio Grande do Sul. E no nordeste os bioinsumos são utilizados em pomares de frutas da região de Petrolina/Juazeiro (Pernambuco e Bahia) e MATOPIBA: estados Maranhão, Tocantins, Piauí, Bahia (EMBRAPA, 2021).

Os produtores *on farm* fabricam e utilizam nas suas fazendas microrganismos biofertilizantes e biocontroladores de pragas e patógenos vegetais. Como os bioinsumos produzidos pelas empresas disponíveis no mercado apresentam alto custo, a produção *on farm* vem crescendo, já que apresenta menor custo.

Embora a produção *On farm* seja muito importante para a agricultura e que tem potencial para contribuir para a sustentabilidade e competitividade da agricultura brasileira, algumas vezes a produção se apresenta precária e ineficiente, resultando em produtos sem concentrações adequadas, baixa qualidade e ocorrendo proliferação de contaminantes que resulta em produtos com baixa ou nenhuma eficiência, inclusive com risco de patogenicidade a humanos, animais e plantas (EMBRAPA, 2021). E por isso, segue abaixo 3 indicações da Embrapa para realização da produção *On farm* quali-quantitativamente adequada:

- Permitir a 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 pelo Ministério
- Necessidade de cadastro de estabelecimento produtor de bioinsumos junto ao Mapa
- Necessidade de um responsável técnico habilitado para a produção de bioinsumos nas fazendas

Os produtores *on farm* têm produzido muitos bioinsumos contendo bactérias do gênero *Bacillus* e Correlatos (gêneros que outrora faziam parte do gênero *Bacillus*), gêneros de bactérias Diazotróficas e Actinobactérias (bactérias filamentosas).

3.2. Bactérias Biocontroladoras e Biofertilizadoras utilizadas na Agricultura

A atual tendência de reduzir o consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos responsáveis por causar danos ao meio ambiente, às comunidades macro e microbiológicas e ao próprio ser humano tem aumentado o interesse dos produtores rurais a utilizarem estratégias de controle biológico de pragas e doenças, além da utilização de microrganismos com capacidade de produzir metabólitos secundários promotores de crescimento vegetal e decompositores de matéria orgânica.

Bactérias do gênero *Bacillus* spp. e dos gêneros correlatos são muito utilizadas no controle de pragas e fitopatógenos (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010). Já as bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) são utilizadas como biofertilizadoras (MOREIRA, *et al.*, 2010). Além disso, as bactérias do grupo Actinobacteria têm sido muito utilizadas como decompositoras de matéria orgânica, produtoras de húmus, biorremediadoras de contaminantes químicos e produtoras de antibióticos (OLIVEIRA, 2003)

Os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência são as *Pseudomonas* do grupo fluorescentes (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e representantes da família *Enterobacteriaceae* (CAMPOS SILVA *et al.*, 2008 apud LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010)

3.2.1. *Bacillus* spp. e gêneros correlatos como agentes de controle biológico de pragas e patógenos

Bactérias do gênero *Bacillus* são muito utilizadas como agentes de controle biológico.

As bactérias eram classificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* quando produziam endósporos e apresentavam duas fases principais durante o seu ciclo de vida: Fase de Crescimento vegetativo (onde a bactéria se multiplica através de bipartição); Fase de esporulação, onde ocorria a diferenciação da bactéria em esporos, estrutura capaz de resistir a condições desfavoráveis de sobrevivência, germinando e iniciando seu ciclo vegetativo quando colocada em meio dotado de nutrientes necessários (MONNERAT; PRAÇA, 2006).

Entretanto na década de 1990 surgiram na literatura novos gêneros originários de estudos filogenéticos intraespecíficos a partir de espécies que integravam o gênero

Bacillus. Estes estudos que se basearam na comparação da sequência do RNA ribossomal 16S propuseram novos gêneros e famílias bacterianas bacilares e produtores de endósporos que passaram a ser conhecidos como Gêneros Correlatos, tais como *Brevibacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Alicylobacillus* spp., *Halobacillus* spp., *Aneurinibacillus* spp., *Virgibacillus* spp., *Gracilibacillus* spp., *Salibacillus* spp., *Amphibacillus* spp. e *Lysinibacillus* spp., (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015).

Nesta época, a semelhança das bactérias do gênero *Bacillus* e dos Correlatos era vista como a capacidade de produzir endósporos na presença de oxigênio.

Entretanto, novos estudos biomoleculares de Gupta *et al.* (2020), realizados em mais de 300 espécies de bactérias da família Bacillaceae, apontaram novas identificações bacterianas baseadas nos CSIs (Indels de assinatura conservados) em sequências de proteínas. Os polimorfismos Indels (CSIs) em sequências de proteínas apontaram as variações de comprimento geradas por inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos em uma sequência de DNA. E tais estudos propuseram que muitas bactérias do gênero *Bacillus* deveriam ser excluídas deste gênero e fariam parte de 17 novos gêneros pertencentes à família Bacillaceae (*Alteribacter*; *Ectobacillus*; *Evansella*; *Ferdinandcohnia*; *Gottfriedia*; *Heyndrickxia*; *Lederbergia*; *Litchfieldia*; *Margalitia*; *Niallia*; *Priestia*; *Robertmurraya*; *Rossellomorea*; *Schinkia*; *Siminovitchia*; *Sutcliffiella*; *Weizmannia*). E com base nos resultados deste estudo, mais de 100 espécies de *Bacillus* foram reclassificadas como pertencentes a outros seis gêneros já existentes e pertencentes à família Bacillaceae (*Alkalihalobacillus*, *Cytobacillus*, *Metabacillus*, *Mesobacillus*, *Neobacillus* e *Peribacillus*).

E os critérios usados no passado que atribuíam a todas as espécies dos Gêneros *Bacillus* e dos Correlatos a característica aerobiótica, além da capacidade de formar endósporos deixaram de ser características obrigatórias destes gêneros.

Segue abaixo algumas bactérias antes pertencentes ao gênero *Bacillus* que foram reclassificadas para novos gêneros.

Tabela 1 – Gêneros bacterianos da família Bacillaceae - Reclassificação dos *Bacillus* (B.)

Gêneros Família Bacillaceae	Espécies bacterianas identificadas	Reclassificação bacteriana
<i>Alteribacter</i> (Al.)	<i>B. aurantiacus</i> <i>B. natronophilus</i> <i>B. populi</i>	<i>Al. aurantiacus</i> <i>Al. natronophilus</i> <i>Al. populi</i>
<i>Ectobacillus</i> (Ec.)	<i>B. funiculus</i> <i>B. panaciterrae</i> <i>B. antri</i>	<i>Ec. funiculus</i> <i>Ec. panaciterrae</i> <i>Ec. antri</i>
<i>Evansella</i> (Ev.)	<i>B. cellulolyticus</i> <i>B. caseinolyticus</i> <i>B. polygona</i>	<i>Ev. cellulolyticus</i> <i>Ev. caseinolyticus</i> <i>Ev. polygona</i>

<i>Ferdinandcohnia</i> (F.)	<i>B. humi</i> <i>B. aciditolerans</i> <i>B. onubensis</i>	<i>F. humi</i> <i>F. aciditolerans</i> <i>F. onubensis</i>
<i>Gottfriedia</i> (G.)	<i>B. luciferensis</i> <i>B. acidiceler</i> <i>B. solisilvae</i>	<i>G. luciferensis</i> <i>G. acidiceler</i> <i>G. solisilvae</i>
<i>Heyndrickxia</i> (H.)	<i>B. oleronius</i> <i>B. sporothermodurans</i>	<i>H. oleronius</i> <i>H. sporothermodurans</i>
<i>Lederbergia</i> (Le.)	<i>B. galactosidilyticus</i> <i>B. lentus</i>	<i>Le. galactosidilyticus</i> <i>Le. lentus</i>
<i>Litchfieldia</i> (Li.)	<i>B. alkalitelluris</i> <i>B. salsus</i>	<i>Li. alkalitelluris</i> <i>Li. salsus</i>
<i>Margalitia</i> (M.)	<i>B. shackletonii</i> <i>B. camelliae</i>	<i>M. shackletonii</i> <i>M. camelliae</i>
<i>Niallia</i> (N.)	<i>B. circulans</i> <i>B. endozanthoxylicus</i> <i>B. nealsonii</i> <i>B. taxi</i>	<i>N. circulans</i> <i>N. endozanthoxylicus</i> <i>N. nealsonii</i> <i>N. taxi</i>
<i>Priestia</i> (P.)	<i>B. megaterium</i> <i>B. abyssalis</i> <i>B. aryabhatai</i> <i>B. endophyticus</i> <i>B. filamentosus</i> <i>B. flexus</i> <i>B. korensis</i>	<i>P. megaterium</i> <i>P. abyssalis</i> <i>P. aryabhatai</i> <i>P. endophyticus</i> <i>P. filamentosus</i> <i>P. flexus</i> <i>P. korensis</i>
<i>Robertmurraya</i> (Rob.)	<i>B. siralis</i> <i>B. korlensis</i> <i>B. kyonggiensis</i> <i>B. massilione galensis</i>	<i>Rob. siralis</i> <i>Rob. korlensis</i> <i>Rob. kyonggiensis</i> <i>Rob. massilione galensis</i>
<i>Rossellomorea</i> (Ros.)	<i>B. aquimaris</i> <i>B. enclensis</i> <i>B. marisflavi</i> <i>B. vietnamensis</i>	<i>Ros. aquimaris</i> <i>Ros. enclensis</i> <i>Ros. marisflavi</i> <i>Ros. vietnamensis</i>
<i>Schinkia</i> (Sc.)	<i>B. azotoformans</i> <i>B. oryztterrae</i>	<i>Sc. azotoformans</i> <i>Sc. oryztterrae</i>
<i>Siminovitchia</i> (Si.)	<i>B. fordii</i> <i>B. fortis</i> <i>B. terrae</i>	<i>Si. fordii</i> <i>Si. fortis</i> <i>Si. terrae</i>
<i>Sutcliffeiella</i> (Su.)	<i>B. cohnii</i> <i>B. halmपालus</i> <i>B. horikoshii</i>	<i>Su. cohnii</i> <i>Su. halmपालus</i> <i>Su. horikoshii</i>
<i>Weizmannia</i> (W.)	<i>B. coagulans</i> <i>B. acidiproducens</i> <i>B. gingsengihumi</i>	<i>W. coagulans</i> <i>W. acidiproducens</i> <i>W. gingsengihumi</i>
<i>Alkalicoccus</i> (A.)	<i>B. chagannorensis</i> <i>B. daliensis</i> <i>B. urumqiensis</i>	<i>A. chagannorensis</i> <i>A. daliensis</i> <i>A. urumqiensis</i>
<i>Salibacterium</i> (Sa.)	<i>B. ailingensis</i> <i>B. salarius</i>	<i>S. ailingensis</i> <i>S. salarius</i>
<i>Caldalkalibacillus</i> (C.)	<i>B. mannanylitycus</i>	<i>C. mannanylitycus</i>
<i>Caldibacillus</i> (Ca.)	<i>B. hisashii</i> <i>B. thermoamylovorans</i>	<i>Ca. hisashii</i> <i>Ca. thermoamylovorans</i>
<i>Salisediminibacterium</i> (S.)	<i>B. beveridgei</i> <i>B. selenitireducens</i>	<i>S. beveridgei</i> <i>S. selenitireducens</i>

Fonte: Gupta *et al.*, 2020

Bacillus megaterium e *Bacillus aryabhatai* são bactérias muito utilizadas pelos produtores *on farm* e que deixaram de fazer parte do gênero *Bacillus* e passaram a fazer parte

do novo gênero *Priestia*. Por isso, elas também são consideradas bactérias de gênero Correlato.

Muitas formulações à base de isolados de *Bacillus* spp. e seus correlatos têm sido utilizadas como biopesticidas, agentes promotores de crescimento vegetal além de antagonistas de fitopatógenos (embora os inóculos contendo *Bacillus thuringiensis* ainda sejam os mais utilizados). O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos ocorre devido aos mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis. (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Algumas espécies como o *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus licheniformis* são utilizadas como agentes de controle biológico de fitopatógenos e fitonematoides, produzindo metabólitos que promovem a antibiose (PHAE; SHODA, 1991; ZHAO; ZHOU; HAN, 2017).

Segundo Phae e Shoda (1991), mais de 60 tipos de antibióticos são sintetizados por *B. subtilis*, incluindo a Bacitracina (também produzida pelo *B. licheniformis*). Por isso, *Bacillus subtilis* é uma espécie muito utilizada como agente antimicrobiano, devido a sua capacidade de produzir substâncias antibióticas denominadas Lipopeptídeos, que representam uma classe de surfactantes microbianos que promovem antagonismo contra diversos fitopatógenos. Além do *B. subtilis*, outras espécies bacterianas também são capazes de produzir os lipopeptídeos, como o *Bacillus thuringiensis* e o *Bacillus licheniformis* e o *Brevibacillus brevis*. (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004; ZHAO; ZHOU; HAN, 2017).

Vários trabalhos relataram a ação nematicida de diferentes espécies de *Bacillus* e seus correlatos, tais como *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus laterosporus*, *Bacillus circulans* (atualmente identificado como *Niallia circulans*), *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Lysinibacillus sphaericus* e *Bacillus licheniformes*. E por isso, muitas delas estão sendo utilizadas como agentes de controle de diferentes espécies de nematoides (CARNEIRO *et al.*, 1998; JONATHAN *et al.*, 2000; KEMPSTER *et al.*, 2001).

A produção de esporos pelas bactérias do gênero *Bacillus* e alguns gêneros Correlatos promove o aumento da resistência aos fatores adversos e são interessantes para a formulação de inoculantes comerciais, atualmente muito utilizados por produtores *On farm*, visto que estes microrganismos podem ser armazenados por um longo período e podem permanecer mais tempo no solo, além de produzir antibióticos que inibem fitopatógenos

3.2.2. Bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR) - aeróbicas e microaerofílicas

Diazotróficas são bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N_2), ou seja, elas são capazes de transformar o nitrogênio de uma forma não disponível (N_2) em uma forma disponível (amônio, ou seja, NH_4^+). As bactérias Diazotróficas podem ser de vida livre, estar associadas a espécies vegetais ou estabelecer simbiose com leguminosas. (MOREIRA *et al.*, 2010).

As bactérias denominadas Rizóbios são bactérias rizosféricas do solo que possuem habilidade para induzir a formação de nódulos nas raízes e, em alguns casos no caule, de plantas leguminosas, onde convertem o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pela planta hospedeira. Por isso, são consideradas simbióticas facultativas com plantas leguminosas. Fazem parte deste grupo os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (MOREIRA *et al.*, 2010; NEVES; RUMJANEK in MELO; AZEVEDO, 1998).

Já as bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser agrupadas em três categorias: organismos rizosféricos, endofíticos facultativos e endofíticos obrigatórios. Na primeira categoria estão todas as espécies que colonizam as raízes superficialmente. Os microrganismos endofíticos facultativos são aqueles capazes de colonizar raízes interna e externamente e o terceiro grupo, tido como de maior importância, os que colonizam o interior de raízes e também a parte aérea das plantas não leguminosas (SALA; SILVEIRA; CARDOSO in SILVEIRA; FREITAS, 2007)

No Brasil, estudos acerca da importância das bactérias diazotróficas como fixadoras de Nitrogênio, iniciaram em 1953, pela pesquisadora Johanna Dobreiner, com bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos. A partir daí diversas bactérias diazotróficas foram descobertas, tais como: *Azotobacter chroococcum*, *Beijerinckia fluminensis*; *Azotobacter paspali*, *Dexia* spp.; *Paenibacillus azotofixans* (Diazotróficas de vida livre); *Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp. (Diazotróficas associativas); *Herbaspirillum* spp. e *Burkholderia* spp. (Diazotróficas endofíticas) (MOREIRA *et al.*, 2010).

Segundo Moreira *et al.* (2010) bactérias diazotróficas associativas, consideradas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR), assumem papel importante na interação com raízes de plantas e ciclagens de nutrientes, entre outros. Os principais gêneros destes microrganismos são: *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* spp., *Dexia* spp., *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp., *Gluconacetobacter* spp.,

Azoarcus spp. Todos estes gêneros eram pertencentes ao Filo Proteobacteria, mas atualmente foram reclassificados como Filo *Pseudomonadota*, exceto *Azotobacter* e *Burkholderia*).

Moreira *et al.* (2010) também aponta que algumas bactérias de formato bacilar Gram+ também são fixadoras de nitrogênio (consideradas como promotoras de crescimento vegetal), muito utilizadas como inóculos bacterianos na Produção *On farm*: gêneros *Paenibacillus* e *Bacillus* (Filo Firmicutes) tais como *B. megaterium* (atual *Priestia megaterium*), *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. circulans* (atual *Niallia circulans*), *B. brevis* (atual *Brevibacillus brevis*), *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. marisflavi* e *B. alkalidiazotrophicus*.

Diversos gêneros de bactérias bacilares Gram-, pertencentes à família Enterobacteriaceae (Filo Proteobacteria) também são diazotróficos associativos, tais como: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Pantoea* (reclassificada Filo *Pseudomonadota*) e *Serratia*. Algumas espécies destes gêneros apresentam grande interesse na área médica (MOREIRA, *et al.*, 2010).

O uso de bactérias benéficas de vida livre como um importante insumo agrícola requer a seleção de rizobactérias competentes com propriedades promotoras do crescimento das plantas. Os gêneros *Bacillus* (Filo Firmicutes) *Pseudomonas* (Filo Proteobacteria), *Enterobacter* (Filo Proteobacteria), *Acinetobacter* (Filo Proteobacteria), *Burkholderia* (Filo Proteobacteria), *Arthrobacter* (Filo Actinomycetota) e *Paenibacillus* (Filo Firmicutes reclassificado em 2021 como Filo Bacilota) são os gêneros bacterianos mais comuns presentes na rizosfera e que têm sido usados como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas- PGPR (SHANG & LIU, 2020/ WANG *et al.*, 2019a/ ZI *et al.*, 2020 apud WANG *et al.*, 2021).

Como aponta o livro “Bacterial Practices in Agriculture” (ÇIĞ *et al.*, 2021), os microrganismos associados às plantas, auxiliares do equilíbrio do solo e promotores da saúde e nutrição das plantas (auxiliando os ciclos de carbono e demais nutrientes) estão sendo muito importantes para permitir a sustentabilidade agrícola.

As bactérias benéficas, de vida livre, rizosfera e colonizadoras de raízes que estimulam o crescimento das plantas, aumentando o rendimento e reduzindo o estresse são consideradas rizobactérias promotoras de crescimento das plantas (PGPR). Tais bactérias agem de forma direta e indireta. Realizam a fixação biológica de Nitrogênio, solubilização e mineralização de Fósforo orgânico/inorgânico, Potássio, Zinco e Ferro. Além disso, as PGPR apresentam capacidade de produzir metabólitos como sidóforo, amônia, ácido salicílico e fitohormônios como ácido indolacético, citoquininas, giberelinas. Já as bactérias

biocontroladoras agem por mecanismos de produção de glucanases, quitinases, antibióticos, pigmentos fluorescentes/cianetos, e indução sistêmica. (ÇIĞ *et al.*, 2021).

Outros estudos apontam que as bactérias PGPR atuam como promotoras de crescimento da planta, mas também restringe e inibe o crescimento de patógenos, protegendo a planta através da produção de antibióticos, produtos químicos antifúngicos e inseticidas (DENNIS *et al.*, 2010/GARCÍA-SALAMANCA *et al.*, 2012 apud WANG *et al.*, 2021).

Do ponto de vista de aproveitamento de oxigênio livre, os microrganismos podem ser classificados como aeróbios, anaeróbios, microaerofílicos ou facultativos. São aeróbios quando necessitam de oxigênio; anaeróbios quando se desenvolvem na ausência de oxigênio e facultativo quando podem viver em condições aeróbias ou anaeróbias. Os microaerofílicos são os microrganismos cujo crescimento é melhor numa pressão reduzida de oxigênio (1% a 15%). Esta tolerância bastante limitada ocorre provavelmente devido à sua sensibilidade aos radicais superóxidos ou peróxidos, que são produzidos em concentrações letais quando em condições de altas concentrações de oxigênio. As bactérias aeróbias, por produzirem maior quantidade de ATP, se multiplicam mais rapidamente que as anaeróbias (CARVALHO, 2010)

Segundo a Dra. Elaine Ingham (microbiologista norte-americana responsável pelo Compost Tea), os microrganismos aeróbicos são sinônimo de bom e os anaeróbicos são sinônimos de ruim”. Entretanto, estas informações necessitam de fundamento científico, visto que muitas bactérias que fazem parte do grupo E.M. (Microrganismos Eficazes do solo), tais como PSB (Bactérias Púrpuras Sulfurosas solubilizadoras de Fosfato) ou PNSB (Bactérias Púrpuras não solubilizadoras de Fosfato) e Bactérias Fotossintéticas Roxas (Púrpuras fotossintéticas), muito eficientes, benéficas e úteis na produção agrícola podem ser aeróbicas, anaeróbicas ou microaerofílicas (GARCIA, 2019)

. Segue abaixo alguns gêneros bacterianos que contêm espécies diazotróficas aeróbicas ou microaerofílicas: *Azotobacter* spp.; *Azospirillum* spp.; *Aquaspirillum* spp.; *Azotococcus* spp.; *Azomonas* spp.; *Beijerinckia* spp.; *Campylobacter* spp.; *Derxia* spp.; *Methylococcus* spp.; *Methylomonas* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Burkholderia* spp. (MOREIRA *et al.*, 2010; NEVES; RUMJANEK in MELO; AZEVEDO, 1998).

3.2.3. Bactérias Actinomicetos (Actinobactérias)

Bactérias Actinomicetos (também conhecidas como Actinobactérias) são bactérias filamentosas Gram+, a maioria aeróbicas, porém algumas microaerofílicas ou anaeróbicas. São pertencentes ao Filo Actinomycetota (também denominado Filo

Actinobacteria), formadoras de esporos e micélios, cujas pseudohifas são de pequeno diâmetro (0,5 a 1,0 μm). A princípio, a formação de estruturas filamentosas (pseudohifas e esporos) acarretou a classificação inicial como fungos. Entretanto, a partir da década de 1950, ocorreram estudos que geraram conhecimentos acerca de suas estruturas genéticas, citomorfológicas e composições químicas celulares, retirando-as do reino Fungi e transportando-as ao Reino Monera (atualmente denominado Reino Bactéria do Domínio Bactéria), devido a presença de estruturas procarióticas. Na parede celular de suas células existe a presença de Peptidoglicanos, que explica a vulnerabilidade aos antibióticos. (WOSTEN; WILLEY, 2000)

Segundo YADAV *et al.* (2018), de acordo com a mais recente atualização, o filo passou a contar com 6 classes (Actinobacteria, Acidimicrobiia, Coriobacteriia, Nitriliruptoria, Rubrobacteria e Thermoleophilia), 29 ordens, 67 famílias, 391 gêneros e 3.900 espécies.

Tabela 2 – Classes, Ordens e Famílias pertencentes ao Filo Actinomycetota, também denominado Actinobactéria (YADAV *et al.*, 2018)

CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	ESPÉCIE	
Acidimicrobiia	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	7	7	
		Iamiaeceae	2	2	
		Microthrixaceae	1	2	
Actinobacteria	Acidothermales	Acidothermaceae	1	1	
	Actinomycetales	Actinomycetaceae	8	76	
	Actinopolysporales	Actinopolysporaceae	2	15	
		Mzabimycetaceae	2	2	
	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	9	67	
	Catenulesporales	Actinospicaceae	2	4	
		Catenulesporaceae	1	7	
	Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	2	127	
		Dietziaceae	1	14	
		Gordoniaceae	3	45	
		Mycobacteriaceae	2	189	
		Nocardiaceae	4	177	
		Segniliparaceae	1	2	
		Tsukamurellaceae	1	12	
		Williamsiaceae	1	11	
		Corynebacteriales	2	3	
		Frankiales	Cryptosporangiaceae	2	7
			Frankiaceae	2	17
	Motilibacteraceae		1	2	
	Sporichthyaceae		1	2	
	Geodermatophilales	Geodermatophilaaceae	3	35	
	Glycomycetales	Glycomycetaceae	5	25	
	Jiangellales	Jiangellaceae	3	10	
	Kineosporiales	Kineosporiaceae	6	24	
		Beutenbergiaceae	4	5	
		Bogoriellaceae	2	12	

	Micrococcales	Brevibacteriaceae	3	41	
		Cellulomonadaceae	7	40	
		Demequinaceae	2	20	
		Derma bacteraceae	4	26	
		Derma coccaceae	10	22	
		Dermatophilaceae	6	8	
		Intrasporangia ceae	21	75	
		Jonesiaceae	1	3	
		Microbacteriaceae	58	332	
		Micrococca ceae	22	202	
		Promicromonospora ceae	8	36	
		Rarobacteraceae	1	2	
		Ruaniaceae	2	2	
		Sanguibacteraceae	1	7	
		Timonella	1	1	
		Micromonosporales	Micromonospora ceae	31	263
		Nakamurellales	Nakamurella ceae	1	5
Propionibacteriales	Nocardioida ceae	14	172		
	Propionibacteria ceae	18	53		
Pseudonocardiales	Pseudonocardia ceae	34	308		
Streptomycetales	Streptomyceta ceae	5	1006		
	Nardiopsa ceae	11	73		
Streptosporangiales	Streptospora ngia ceae	15	131		
	Thermomonospora ceae	5	97		
Coriobacteria	Coriobacteriales	Atopobiaceae	3	12	
		Coriobacteria ceae	5	11	
	Eggerthellales	Eggerthella ceae	10	21	
Nitriliruptoria	Egibacterales	Egibaceraceae	1	1	
	Egicoccales	Egicocca ceae	1	1	
	Euzebyales	Euzebyaceae	1	1	
	Nitriliruptorales	Nitriliruptora ceae	1	1	
Rubrobacteria	Gaiellales	Gaiella ceae	1	1	
	Rubrobacteriales	Rubrobacteria ceae	1	8	
Thermoleophilia	Solirubrobacterales	Conexibacteraceae	1	2	
		Parviterribacteraceae	1	2	
		Patulibacteraceae	1	5	
		Solirubrobacteria ceae	1	5	
	Thermoleophilales	Thermoleophila ceae	1	2	
6 CLASSES	29 ORDENS	67 FAMÍLIAS	391 GÊNEROS	3.900 ESPÉCIES	

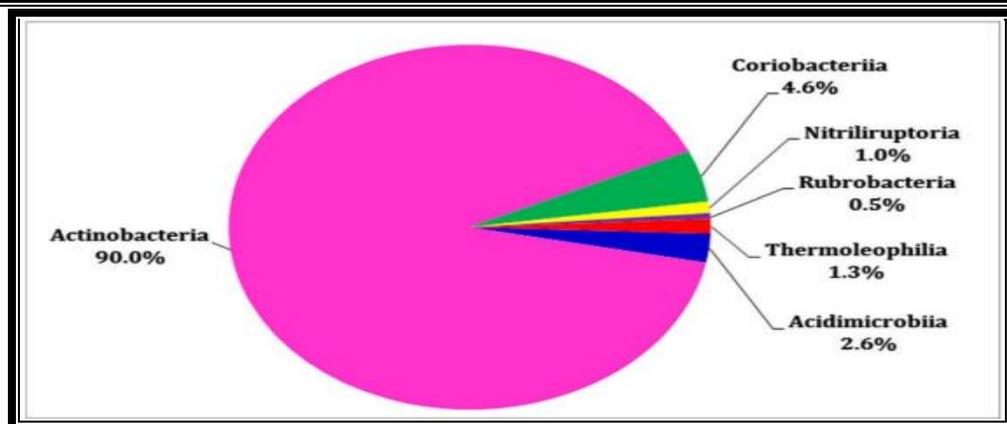


Figura 1 - Distribuição percentual de diferentes classes de Filo Actinomycetota (YADAV *et al.*, 2018)

Como indicado na Tabela 2 e Figura 1, a maior porcentagem das bactérias filamentosas do filo Actinomycetota fazem parte da Classe Actinobactéria (90%). E de todas as famílias desta classe, a Streptomycetaceae é a que apresenta a maior quantidade de espécies (5 gêneros e 1006 espécies), sendo que o Gênero *Streptomyces* faz parte deste grupo de actinobactérias.

As Actinobactérias são bactérias cosmopolitas, encontradas em vários habitats, tais como: água, pedra, produtos alimentícios, tecidos animais e tecidos vegetais. Porém, o principal hábitat é o solo (KUMAR; JADEJA, 2016).

Segundo YADAV *et al.* (2018) as actinobactérias rizosféricas estão entre os filos mais dominantes na natureza e são de grande importância econômica para os seres humanos devido às suas contribuições significativas para os sistemas do solo. Vários gêneros pertencentes ao filo Actinomycetota (também denominado Actinobacteria) são apontados como importantes microrganismos do bioma edáfico, tais como *Acidimicrobium*, *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Bifidobacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium*, *Pseudonocardia*, *Rhodococcus*, *Sanguibacter* e *Streptomyces*.

As actinobactérias são grandes produtoras de antibióticos (cerca de 50% dos antibióticos conhecidos) e outros metabólitos bioativos e apresenta ampla diversidade morfológica, com alto teor de Guanina + Citosina (G+C) em seus genomas (KUMAR; JADEJA, 2016).

A maioria dos antibióticos produzidos por Actinobactérias são oriundos do gênero *Streptomyces*. Segue abaixo alguns dos antibióticos produzidos por Actinobactérias (OLIVEIRA, 2018):

Tabela 3 – Antibióticos produzidos por Actinobactérias

Bactéria	Antibiótico	Bactéria	Antibiótico
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomicina	<i>Verrucosipora</i> sp.	Abissomicina
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Cloranfenicol	<i>Streptomyces orientalis</i>	Vancomicina
<i>Streptomyces fradiae</i>	Neomicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Canamicina
<i>Streptomyces noursei</i>	Nistatina	<i>Streptomyces fradiae</i>	Fosfomicina
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tetraciclina	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	Ribostamicina
<i>Streptomyces vinaceus</i> e <i>Streptomyces capreolus</i>	Viomicina	<i>Streptomyces roseosporus</i>	Daptomicina
<i>Streptomyces erythreus</i>	Eritromicina	<i>Streptomyces platensis</i>	Platensimicina
<i>Streptomyces lincolnensis</i>	Licomicina	<i>Amycolatopsis rifamicina</i>	Rifamicina
<i>Streptomyces nodosus</i>	Anfotericina B	<i>Micrononospora purpurea</i>	Gentamicina
<i>Streptomyces niveus</i>	Novobiocina

Como já apontado, tais bactérias filamentosas são componentes importantes da microbiota do solo, especialmente em condições de pH elevado, temperatura elevada ou estresse hídrico. As Actinobactérias são os únicos microrganismos capazes de utilizar quitina, celulose e hemicelulose (classe de diversos polissacarídeos que, em parte, estão ligados por pontes de hidrogênio à celulose), presentes no solo (NICOLAU, 2016).

E segundo Otori (2014) as Actinobactérias fazem parte do terceiro filo bacteriano de maior concentração nos solos de canaviais fertirrigados por Vinhaça (cerca de 6% das bactérias observadas). Por isso, pode-se constatar que tais bactérias são beneficiadas pela utilização da Vinhaça como biofertilizante.

O gênero *Streptomyces* é um dos grupos bacterianos dominantes em solos de superfície: Actinomicetos Gram-positivos, heterotróficos, aeróbios, sendo 5 a 20% das bactérias cultiváveis do solo. Atuando frequentemente na biodegradação de substâncias e na decomposição de matéria orgânica do solo, são bactérias que têm a função de agir sobre os ciclos de nutrientes. Tais bactérias são produtoras de Geosmina, responsável pelo odor da terra. Também são produtoras de antibióticos (SHARMA, 2005 apud NICOLAU, 2016).

Além de ser o principal produtor de antibióticos, o gênero *Streptomyces* produz compostos antitumorais (actinomicina; mitomicina; antraciclina; bleomicina; pentostatina; resistomicina, utilizados em tratamento de câncer) (AFTAB; ZECHEL; SAJID, 2015). Também são produtores de enzimas de uso industrial, sendo que algumas enzimas apresentam capacidade de degradar compostos celulolíticos do solo, tornando tais bactérias importantes degradadoras de matéria orgânica e formadoras de húmus (PADILHA, 1998 apud OLIVEIRA, 2003).

Segundo Goth *et al.* (1999 apud OLIVEIRA, 2003), os gêneros *Nocardia* e *Rhodococcus* são importantes bactérias edáficas, também degradadoras de matéria orgânica e capazes de decompor compostos químicos ambientalmente prejudiciais.

Segundo Sharma (2005 apud NICOLAU, 2016) *Frankia* é outro gênero bacteriano (Gram + e aeróbico), pertencente ao grupo Actinobactéria, que realiza a fixação de Nitrogênio em simbiose com plantas não-leguminosas (bactéria Diazotrófica), sendo importante em solos superficiais.

As Actinobactérias fazem parte dos E.M. (Microrganismos Eficientes), presentes no solo, os quais controlam fungos e bactérias patogênicas e também aumentam a resistência das plantas (ANDRADE, 2020).

Segundo Schrijver & Mot (1999 apud OLIVEIRA, 2003), muitas destas bactérias filamentosas são importantes degradadoras de pesticidas, sendo pertencentes aos

seguintes gêneros: *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*; *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*; *Micromonospora*; *Nocardioides*; *Streptomyces*.

Para promover a identificação das Actinobactérias, deve-se realizar análises das características morfológicas das colônias, do formato microscópico das bactérias, além das suas características químicas e moleculares. Segue abaixo alguns critérios utilizados:

- Ramificação do micélio sobre o substrato
- Formação de micélio aéreo
- Fragmentação do micélio ou produção de esporos
- Tipos e números de esporos e seus arranjos:
 - Esporos únicos (Ex. Gênero *Micromonospora*)
 - Pares longitudinais (Ex. Gênero *Microbispora*)
 - Cadeia de esporos (Ex. Gênero *Streptomyces* - longa cadeia)
 - Esporos contidos dentro de esporângios (Ex. Gêneros *Actinoplanes*)
 - Esporos com arranjo simples
 - Esporos com arranjo verticilado

E a coloração da massa bacteriana (esporos, micélios) e do substrato devido a produção de pigmentos em diferentes meios de cultura são características culturais e coloniais de grande valor na taxonomia. Além disso, os testes bioquímicos, análise de degradação de substratos, produção de antibióticos, testes fisiológicos e composição da parede celular (açúcar e lipídeo) são itens utilizados para a identificação dos gêneros e espécies das Actinobactérias (WILLIAN *et al.*, 1989 apud SILVA, 2010).

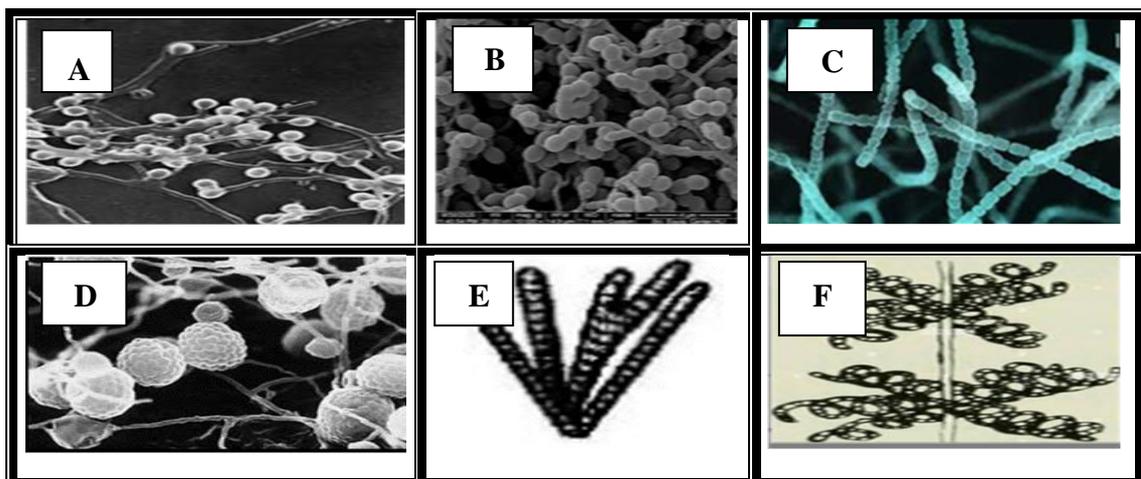


Figura 2 – Tipo, número de esporos e seus arranjos (SILVA, 2010): A- Esporo único; B- Pares longitudinais; C- Cadeia longa de esporos; D- Esporos contidos dentro de esporângios; E- Esporos com arranjos simples; F- Esporos com arranjo verticilado.

Fontes: Imagem A- http://www.nih.gov/saj/DigitalAtlas/section_4/section_4.htm;

Imagem B- <https://www.nature.com/articles/s41429-021-00470-x>;

Imagem C- <https://simple.wikipedia.org/wiki/Streptomyces>;

Imagens D/E/F- <https://www.intechopen.com/chapters/49873>

3.3. Produtos utilizados em biofertilização de solo agrário – Vinhaça/ Melaço/ Xarope de milho

O solo é o maior reservatório de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis, principalmente de bactérias, sendo que menos de 1% são cultivados e caracterizados (HANDELSMAN, 2005).

Muitas bactérias edáficas de vida livre, associadas às raízes dos vegetais (rizosféricas) ou colonizadoras de tecidos vegetais (endofíticas) possuem habilidade de promover crescimento vegetal, auxiliando a produção agrícola. Muitos produtos utilizados na agricultura, tais como fertilizantes químicos e agrotóxicos podem gerar malefícios ao meio ambiente e ao microbioma edáfico, além de apresentar alto custo. Por isso, a busca pelo desenvolvimento de produtos que possam substituir tais substâncias químicas agrárias podem auxiliar a agricultura sustentável (inclusive dos produtores *On farm*). As bactérias do microbioma edáfico podem utilizar resíduos e subprodutos agroindustriais renováveis, de baixo custo e ricos de nutrientes químicos tais como a vinhaça e o melaço de cana-de-açúcar (DALSASSO, 2019)

Além da vinhaça e do melaço de cana, outros produtos, ricos em nutrientes, podem ser utilizados na produção agrária, tais como o xarope de milho e o extrato de macadâmia, embora ainda existam poucos estudos acerca destes produtos na produção agrícola. Por isso, será importante a realização de tais experimentos científicos, no intuito de testar a eficiência do xarope de milho e o extrato de macadâmia para a produção agrícola.

3.3.1. Vinhaça

As usinas de açúcar e álcool são responsáveis pelo beneficiamento da cana-de-açúcar. No território brasileiro existem aproximadamente 428 usinas beneficiadoras, distribuídas em 23 Estados brasileiros. O Estado de São Paulo possui cerca de 172 unidades, o que equivale a 40,1% do total nacional (NOVACANA, 2023).

A produção do etanol, considerado um biocombustível favorável ao meio ambiente, iniciou-se na década de 70 com a criação do Proálcool, cujo objetivo era garantir a oferta de combustível renovável, reduzindo assim a dependência da importação do petróleo pelo país (MOURA *et al.*, 2004). Sua produção tem se expandido desde então, atingindo 26,5 bilhões de litros produzidos durante a safra 2022/2023 (CONAB, 2022).

O Complexo Agroindustrial da Cana-de-açúcar gera diversos resíduos e subprodutos, como mostra a Figura 3.

Fonte: <https://www.ilos.com.br/web/tag/cana-de-acucar/>

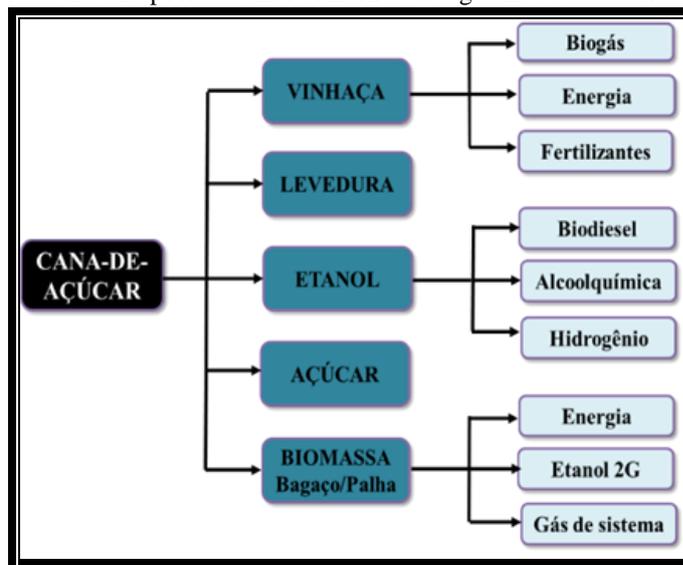


Figura 3 – Complexo Agroindustrial da Cana

Como no Brasil, a produção de etanol, realizada pelas usinas de beneficiamento da cana-de-açúcar tem aumentado, a preocupação ambiental pelo uso incorreto da vinhaça (resíduo deste beneficiamento) vem aumentando, visto que para cada litro de etanol produzido, são gerados 10 a 15 litros de vinhaça. Até a década de 70 a vinhaça era descartada em rios e ribeirões próximos às usinas. Atualmente, é muito utilizada como fertilizante nos solos de diversas culturas, sobretudo em canaviais (OLIVEIRA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013).

O Etanol da cana-de-açúcar pode ser produzido a partir da calda da cana, denominado Etanol 1ª Geração, ou a partir do bagaço da cana, denominado Etanol 2ª Geração, como mostra a Figura 4. A utilização do bagaço da cana é uma nova estratégia das usinas sucroalcooleiras que, além de promover o aumento da produtividade e do lucro, garante a diminuição da geração dos resíduos da cana-de-açúcar, o que minimiza os problemas ambientais (NOVO, 2016)

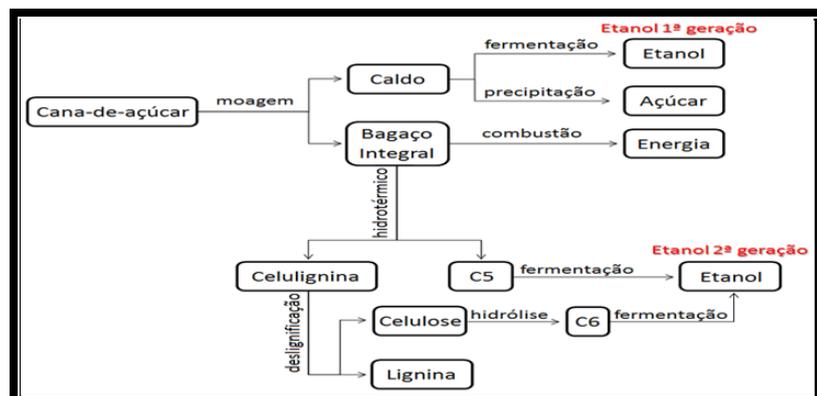


Figura 4 - Cadeias de Produção do Etanol de 1ª e 2ª Geração (Fonte: NOVO, 2016)

A vinhaça, quando descartada de maneira incorreta, pode contaminar o solo e o lençol freático. Porém, quando utilizada e descartada adequadamente, pode ser empregada como fertilizante, pois é rica em nutrientes orgânicos e inorgânicos, além de ser promotora de crescimento vegetal e proliferadora microbiana. Além da vinhaça, a torta de filtro (outro resíduo da produção de etanol) também pode ser utilizada na fertilização do solo dos canaviais e de outras culturas vegetais.

A vinhaça, atualmente utilizada frequentemente como fertilizante no agronegócio, é produzida na ordem de 300 bilhões de litros por ano no Brasil (USP, 2018 apud DALSSASSO, 2019).

A matéria orgânica, K, N, Ca e Mg são os principais componentes químicos da vinhaça, sendo o K o elemento mineral mais importante para o aproveitamento agrícola do resíduo. Portanto, a vinhaça é fonte de nutrientes, matéria orgânica e água e seu uso pode contribuir para o aumento da produtividade agrícola, com efeitos nos atributos químicos, físicos e biológicos do solo (PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013). A vinhaça possui pH entre 3,5 e 5, alta carga orgânica e apresenta coloração marrom escura devido à presença de melanoidinas (compostos químicos que são formados quando açúcar e aminoácidos se combinam a temperatura em torno de 100°C), além de um odor característico. Sua composição é bastante variável, e em geral se encontram nutrientes como o nitrogênio, fósforo e potássio (HOARAU *et al.*, 2018 apud DALSSASSO, 2019).

O e-book *Cana-de-açúcar e seus impactos* (FONTANETTI; BUENO, 2017) aponta visão acadêmica e importantes informações sobre os produtos do Setor Sucroalcooleiro e seus resíduos (como a vinhaça), os quais interferem positiva e negativamente sobre as características do solo, das águas superficiais dos lençóis freáticos bem como sobre a fauna, a flora e os microrganismos. Segue abaixo algumas importantes informações acerca da vinhaça apontadas por tal e-book.

A vinhaça é um resíduo que pode contaminar corpos d'água. O descarte no solo é uma alternativa menos poluente, mas não existem impactos danosos, quando as aplicações são inferiores a 300m³/ha. A fertirrigação por vinhaça no estado de São Paulo atende a norma técnica P4.231/2006 (Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola) da CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). As normas exigem que se mantenha a concentração de Potássio pré-estipulada (5% da capacidade de troca catiônica) em função do solo e produção agrária; além disso, os tanques de armazenamento e drenos devem ser impermeabilizados para impedir a contaminação de solos e água (MORINI *et al.* in FONTANETTI; BUENO, 2017).

A utilização da vinhaça auxilia a produção agrária, aumentando a lucratividade, reduzindo os custos dos adubos químicos, evitando seu depósito inapropriado no ambiente, evitando contaminação de solo e água. É possível que tal utilização da vinhaça auxilia também na redução de mudança climática, acidificação do solo e impactos de toxicidade aos humanos e aos animais. E em 2011 a SCBS (Sugar Cane Business Case Sustainability) desenvolveu e patenteou a vinhaça em pó, produto que gera menor contaminação de solo e água. Estudos apontaram que a aplicação da Vinhaça na dose de 30 m³/ha concentrada na linha da cana promoveu aumento nas concentrações de Cl⁻, NO₃⁻, Ca⁺², Mg⁺² e SO₄⁻² (e as soluções foram coletadas pelos extratores a 0,80 m de profundidade), além de aumento no pH, aumento na fertilidade do solo e na produtividade (CHRISTOFOLETTI *et al.* in FONTANETTI; BUENO, 2017).

As principais substâncias químicas presentes na vinhaça são: a matéria orgânica na forma de ácidos orgânicos; os íons potássio, cálcio e magnésio (de maiores concentrações); os sais de sulfato, cloreto, fosfato, fósforo e nitrato (de média concentração) além dos nutrientes metálicos Cu, Cr, Zn, Ni (em menor concentração e com potencial tóxico para organismos aquáticos). A vinhaça apresenta pH ácido (3,5 a 4,5); condutividade elétrica elevada, teores de matéria orgânica (DBO e DQO) altos. Por isso, a adequada utilização pode aumentar a fertilidade do solo, enquanto que a inadequada utilização pode causar desequilíbrio iônico. O emprego da vinhaça aumenta as populações microbianas do solo, e embora o pH da vinhaça seja ácido, ela neutraliza a acidez do solo graças a atividade microbiológica sobre a decomposição da matéria orgânica. Entretanto, aplicação de vinhaça em níveis elevados saliniza o solo, graças ao Potássio e outras bases trocáveis (Ca, Na e Mg), provocando lixiviação para camadas inferiores, além de prejudicar a absorção pelas plantas (SOTO; BASSO; KIANG in FONTANETTI; BUENO, 2017).

Os metais presentes na composição da Vinhaça (Cu, Cr, Ni, Zn) apresentam toxicidade para organismos aquáticos. E estudos realizados com alguns invertebrados como as minhocas (*Eisenia andrei*), colêmbolos (*Folsomia candida*), enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) e ácaros (*Hypoaspis aculeifer*) apontaram que a taxa de reprodução de alguns organismos invertebrados foi diminuída quando expostos à vinhaça (SOUZA *et al.* in FONTANETTI; BUENO, 2017).

As informações acerca da Vinhaça, apontadas pelo e-book, deixou claro que a Vinhaça, produzida a partir da Cadeia de Produção Agroindustrial do Etanol e que faz parte do Complexo Sucroalcooleiro, pode apresentar grandes benefícios ao ser utilizada como fertirrigadora de solos (quando utilizada de forma responsável e em doses adequadas),

umentando a produtividade e a lucratividade dos canaviais e de outras culturas. Entretanto, quando utilizada de forma inadequada, em altas doses ou armazenada e descartada de forma irresponsável, pode se tornar um grande contaminante ambiental, com possibilidade de promover mortalidade de seres vivos, tornar lençóis freáticos e águas superficiais inadequadas para consumo humano.

Dependendo da quantidade de vinhaça aplicada ela pode atuar como poluente ou como condicionador benéfico do solo, sendo consenso entre os autores, que a aplicação adequada da vinhaça deve considerar as características químicas e físicas do solo, além de aspectos como o histórico de aplicação dos resíduos, a intensidade do cultivo na área agrícola e a proximidade de nascentes de água. (PRADO; CAIONE; CAMPOS, 2013)

E com relação ao bioma do solo, segundo o estudo realizado por Omori (2014), em solos de canaviais fertirrigados por vinhaça, foram observados 11 filos bacterianos diferentes, sendo que os três filos de maior representação foram Proteobacteria atual Pseudomonadota (31%), Acidobacteria (28%) e Actinobacteria (6%), sendo que outros filos menos frequentes também foram caracterizados, tal como o Firmicutes (3%), no qual são encontradas bactérias dos gêneros *Bacillus* e correlatos (como *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Lysinibacillus*), muito utilizadas como agentes de controle biológico de pragas, promotoras de crescimento de vegetais e antagonistas de fitopatógenos.

Um estudo realizado por Martins *et al.* (2016) apontou que a vinhaça pode ser utilizada como meio de cultura para proliferação de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*. Durante a proliferação do gênero *Azospirillum* em meios contendo vinhaça houve alteração do pH da vinhaça. A multiplicação de tais bactérias em meio contendo Vinhaça proporcionou um aumento dos valores de pH destes meios, que passaram de um pH ácido, próximo a 5,0, para valores de pH básicos. E como um dos problemas da aplicação da vinhaça em solos agrícolas é a acidificação destes solos, devido a acidez da vinhaça, desta forma a multiplicação de bactérias diazotróficas neste resíduo poderia amenizar este problema, já que as mesmas proporcionam um aumento dos valores de pH da vinhaça.

3.3.2. Melaço

O melaço, é um produto orgânico, subproduto industrial da produção do etanol da cana-de-açúcar (produzido a partir da cristalização do açúcar), possui alta concentração de carbono fermentável, além de alta disponibilidade e baixo custo. Cada tonelada de cana processada pela indústria sucroalcooleira no Brasil gera cerca de 40 a 60 kg de melaço (BRASILEIROS, 2017 apud DALSSASSO, 2019).

Cerca de 18 milhões de toneladas de melação de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil pelo setor sucroalcooleiro. Por seu baixo custo, alta disponibilidade e alto teor de açúcares fermentáveis, esta matéria-prima vem sendo empregada como substrato para diferentes tipos de fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2009/SAHU, 2018 apud DALSSASSO, 2019).

O melação é utilizado como fertilizante agrícola, além de auxiliar na proliferação de bactérias (através do açúcar), multiplicando os nutrientes do solo e proporcionando maior qualidade e quantidade na agricultura. Seu uso no agronegócio pode diminuir a utilização de fertilizantes químicos, o que pode auxiliar na proteção das plantas, do microbioma e do meio ambiente. Na fruticultura, o melação é aplicado para tornar os frutos maiores, mais saborosos e com maior qualidade. Para o controle de pragas, o melação atrai pragas e mariposas pelo açúcar e, após elas ingerirem essa mistura, acabam morrendo. (MELAÇÃO DE CANA, 2023)

No início o melação era o nutriente preferido de quem fazia “Compost Tea”, porém após algum tempo houve exclusão do uso do melação no Compost Tea, já que tal produto seria responsável pela proliferação de bactérias indesejáveis (patogênicas), além de agir contra fungos agrários. Porém, não existem estudos científicos que comprovem tal informação (GARCIA, 2019)

O Melação contém os seguintes ingredientes: Água; Lipídios; Carboidratos (sacarose, glicose, frutose); Cálcio; Ferro; Magnésio; Fósforo; Potássio; Sódio; Zinco; Cobre; Manganês; Selênio; Tiamina (Vitamina B1); Riboflavina (Vitamina B2); Niacina (Vitamina B3); Ácido Pantotênico (Vitamina B5); Vitamina B6; Colina (Vitamina B8); Ácidos Graxos (USDA, 2019a).

A atividade de água (Aa) é um parâmetro muito importante para o desenvolvimento dos microrganismos denominados osmofílicos. São tolerantes ao açúcar e necessitam de ambiente com baixa Aa, como produtos com teores significativos de açúcar, para se desenvolver. Certos microrganismos osmofílicos podem estar presentes no mel, nos corpos das abelhas, no néctar, nas áreas de extração e armazenamento do mel, além do solo (WHITE JÚNIOR, 1978). Por isso, algumas bactérias osmofílicas presentes no solo podem se adaptar ao melação de cana-de-açúcar.

Segundo Delgado (1975 apud FELTRIN *et al.*, 2000), o Melação de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentescíveis e muitos minerais que faz com que seja considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias ácido lácticas pertencentes a

família Lactobacillaceae (tais como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) algumas utilizadas na produção vegetal.

Algumas bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* são regenerativas e fazem parte do grupo de bactérias E.M. (Microorganismos Eficientes), que produzem ácido láctico que controla alguns microrganismos nocivos como o *Fusarium*, além de produzirem substâncias orgânicas, hormônios e vitaminas, além de liberar nutrientes úteis às plantas. Tais substâncias melhoram as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (ANDRADE, 2020).

3.3.3. Xarope de Milho

Xarope de Milho, também conhecido como isoglucose ou HFCS (High Fructose Corn Syrup) é um líquido doce e pegajoso, aditivo alimentar usado amplamente na indústria para adoçar diversos tipos de alimentos. Também denominado Xarope de Alta Frutose e Xarope de Glicose, é um produto feito a partir de amido de milho, e é composto principalmente de glicose. A frutose é um açúcar natural, presente nas frutas, no mel e em alguns vegetais. Já o xarope de alta frutose (xarope de milho ou xarope de glicose) é um açúcar artificial, obtido através da síntese de amido de milho, e que contém uma grande quantidade de maltose (dissacarídeo). (MARCELINO, 2021).

Os nutrientes presentes em Xarope de Milho são: Sódio; Potássio; Carboidratos; Açúcar; Cálcio; Ferro; Magnésio; Fósforo; Zinco; Cobre; Manganês; Selênio; Tiamina (Vitamina B1); Riboflavina (Vitamina B2); Niacina (Vitamina B3); Ácido Pantotênico (Vitamina B5); Vitamina B-6; Colina (Vitamina B8) (USDA, 2019b).

Segundo PELCZAR *et al.* (1996 apud PORTO, 2000) o alimento pode se tornar um substrato para microrganismos, se apresentar condições favoráveis, e devido suas características de composição e processamento, o xarope de milho pode ser contaminado principalmente por microrganismos osmofílicos (mesmo que não patogênicos). Experimentos microbiológicos em ambientes de produção e armazenamento de Xarope de Milho apresentaram contaminação microbiana osmofílica (PORTO, 2000).

Embora o Xarope de Milho ainda não seja considerado como biofertilizante, suas características químicas podem auxiliar na produção agrária, visto que algumas bactérias osmofílicas edáficas podem se adaptar ao Xarope de Milho. E por este motivo, o presente estudo pode apontar um novo substrato agrário.

3.3.4. Extrato de Macadâmia

Macadâmia (também conhecida como noz-macadâmia ou noz-de-Queensland) é um fruto extraído de uma árvore originária da Austrália, da família Proteaceae, a qual apresenta quatro espécies, com destaque para *Macadamia integrifolia* e *Macadamia tetraphylla*. No Brasil, os principais estados produtores são: São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia, mas grande parte de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, sul de Minas Gerais, leste do Mato Grosso do Sul e oeste do Paraná apresentam disponibilidade climática favorável ao cultivo da Macadâmia (SCHNEIDER *et al.*, 2012).



Figura 5 - Árvore da Noz Macadâmia (KAUCOFFEEMILL, 2015 apud FERREIRA, 2015)

A noz-de-Macadâmia é utilizada para alimentação, além de ser usada para fins paisagísticos, produção de óleo, cosméticos e fármacos (DIERBERGER; MARINO NETTO, 1985/DIERBERGER *et al.*, 1986/ PIMENTEL, 2007 apud SCHNEIDER *et al.*, 2012).

Os frutos da Macadâmia são muito ricos em Ácidos Graxos (gorduras saudáveis); Proteínas; Carboidratos (Sacarose, frutose, glicose, lactose, maltose e amido); vários nutrientes (Ferro, Potássio, Sódio, Zinco, Cobre, fósforo, Cálcio e Magnésio, Manganês, Selênio); várias vitaminas tais como: Vitaminas C (Ácido Ascórbico), Vitamina B1 (Tiamina), Vitamina B2 (Riboflavina), Vitamina B3 (Niacina), Vitamina B5 (Ácido Pantotênico), Vitamina B6, Vitamina B9 (Folato), Vitamina E (alfa-tocoferol); Fitoesteróis (Campesterol, Beta-sitosterol); vários Aminoácidos (Triptofano, Treonina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Cisteína, Fenilalanina, Tirosina, Valina, Arginina, Histidina, Alanina, Ácido Aspártico, Ácido Glutâmico, Glicina, Prolina, Serina (LEMOS, 2023; USDA, 2019c).

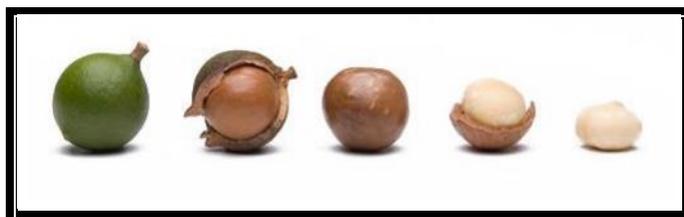


FIGURA 6 - Carpel, casca e amêndoa da noz macadâmia (INTERMAC, 2010 apud FERREIRA, 2015)

Muitas indústrias realizam o processo de extração de óleo vegetal e comercializam, mas como a maioria das atividades industriais há geração de resíduos. Assim, o resíduo tem sido descartado pelas indústrias a céu aberto ou, raramente, em aterros sanitários, e, com isso, grande quantidade de nutrientes, que poderiam ser reciclados, não são aproveitados. O resíduo gerado no processo de extração do óleo de Macadâmia, denominado de biomassa da macadâmia, pode ser aplicado como fertilizante orgânico para diversas culturas agrárias, além de se apresentar muito importante para os microrganismos edáficos (FERREIRA, 2015).

3.4. Fatores que geram o equilíbrio ou desequilíbrio do solo

Como já apontado, o solo é a maior fonte bacteriana, muitas delas denominadas “Microrganismos Regenerativos”, produtoras de substâncias orgânicas úteis às plantas, podendo produzir hormônios e vitaminas, melhorando as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. Tais bactérias fazem parte do grupo E.M. (Microrganismos Eficientes), encontradas naturalmente em solos férteis e em plantas. Os Actinomicetos (bactérias filamentosas), os *Lactobacillus* e *Pediococcus* (produtoras de ácido láctico) e as Bactérias Fotossintéticas são as bactérias E.M. que auxiliam o equilíbrio do bioma edáfico (ANDRADE, 2020):

- ✓ Actinomicetos: controlam fungos e bactérias patogênicas e também aumentam a resistência das plantas.
- ✓ Bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus* e *Pediococcus*): produzem ácido láctico que controla alguns microrganismos nocivos como o *Fusarium*. Pela fermentação da matéria orgânica não curtida liberam nutrientes às plantas.
- ✓ Bactérias fotossintéticas: utilizam a energia solar em forma de luz e calor. Também utilizam substâncias excretadas pelas raízes das plantas na síntese de vitaminas e nutrientes, aminoácidos, ácidos nucleicos, substâncias bioativas e açúcares, que favorecem o crescimento das plantas. Aumentam as populações de outros microrganismos eficazes, como os fixadores de nitrogênio, os Actinomicetos e os fungos micorrízicos.

A composição, abundância e estruturas das comunidades microbianas no ecossistema do solo são afetadas por fatores ambientais como pH, temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes do solo, bem como práticas de gerenciamento agrícola como lavoura, rotação de culturas, fertilização e aplicação de pesticidas (CHEN *et al.*, 2021).

Resíduos de pesticidas podem provocar desequilíbrio da diversidade microbiana do solo, além do uso prolongado de fertilizantes químicos em sistemas agrícolas convencionais que podem gerar efeitos adversos substanciais na qualidade do solo, causando redução nas atividades biológicas do solo, perda de matéria orgânica do solo e deterioração da estrutura do solo e reciclagem de nutrientes (FANG *et al.* 2018/ GARCIA-DELGADO *et al.*, 2019/ BRONICK & LAL, 2005/ ZHAO *et al.*, 2016 apud CHEN *et al.*, 2021)

Estudos apontaram que as atividades enzimáticas também estão associadas às condições de equilíbrio e desequilíbrio do solo, algumas hidrolases foram avaliadas como índices de ciclos de determinados nutrientes: Fosfatase/ciclo de Fósforo (P); Sulfatase/ciclo de Enxofre (S), β -glicosidase/ciclo de Carbono (C), Urease/ciclo de Nitrogênio. Por isso, essas enzimas catalisam diferentes substratos, liberando formas inorgânicas disponíveis de fosfatos, sulfatos, amônia e carboidratos que servem como fontes de energia essenciais para as plantas e organismos do solo. Devido a sua resposta às mudanças nas condições do solo, as enzimas do solo funcionam como indicadores de qualidade do solo e podem ser usadas para monitorar a saúde do solo em sistemas de manejo agrícola (DAI *et al.*, 2018 e XIAN *et al.*, 2015 apud CHEN *et al.*, 2021).

As raízes das plantas liberam diferentes metabólitos como ácidos orgânicos, aminoácidos, sacarídeos, fenólicos, flavonoides e terpenoides na rizosfera, o que leva à multiplicação de microrganismos ao redor da zona radical. E estas substâncias liberadas pela planta influenciam toda a microbiota ao redor do solo próximo, o que influencia na variação da diversidade bacteriana no solo da rizosfera de diferentes plantas (ÇAKMAKÇI in ÇIĞ *et al.*, 2021).

Experimentos realizados por Wang *et al.* (2021) apontaram que os nutrientes com maior influência na diversidade bacteriana do solo são: Nitrogênio, Carbono orgânico e Potássio. Eles são os maiores indicadores de qualidade do solo e do cultivo sustentável. Os experimentos apontaram também que o Nitrogênio é um nutriente com maior efeito sobre a diversidade bacteriana em nível de gênero. Já o Carbono, Potássio, água e pH foram positivamente correlacionados com os gêneros *Pedobacter* (gênero de bactérias Gram- em forma de bastonete e anteriormente conhecida como *Flavobacterium*) e *Mucilaginibacter* (gênero de bactérias Gram - imóveis, em forma de bastonete, produtoras de exopolissacarídeos que apresenta potencial de biorremediação). Ambos os gêneros são pertencentes ao Filo Bacteroidota.

Outros experimentos realizados também apontaram que os gêneros *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* e *Methylosinus* (Gêneros bacterianos pertencentes ao Filo

Proteobacteria e reclassificados em 2021 como Filo Pseudomonadota) e também se associaram significativamente com o teor de nitrogênio no solo (IKEDA *et al.*, 2014 apud WANG *et al.*, 2021).

Estudos apontaram também que a condutividade elétrica, o pH e o teor de água no solo exibiram correlação forte com bactérias pertencentes aos filios Actinobacteria e Proteobacteria, (O'BRIEN *et al.*, 2019 apud WANG *et al.*, 2021). Lembrando que muitos gêneros bacterianos pertencentes ao Filo Proteobacteria foram reclassificados como Filo Pseudomonadota.

Solos ácidos apresentam menores taxas de concentração de Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio e apresentam aumento da concentração de Ferro, Níquel, Cobre, Zinco, Manganês e Alumínio, podendo aumentar sua solubilidade e causar toxicidade (NATH, 2014 apud ÇAKMAKÇI in ÇIĞ *et al.*, 2021).

Assim foi constatado que a diversidade bacteriana rizosférica está relacionada com elementos ambientais, condutividade elétrica. E os elementos do solo na rizosfera da planta também podem ser ajustados através da mudança da diversidade de rizobactérias além da fertilização química.

O enriquecimento do solo com matéria orgânica, Potássio e Fósforo apresentaram correlação positiva com alguns gêneros bacterianos, tais como: *Myxococcota*, *Latescibacterota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexi*, *Deinococcota*, *Bdellovibrionota*, *Patescibacteria* (WU *et al.*, 2021 apud ÇAKMAKÇI in ÇIĞ *et al.*, 2021)

Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria (atual Pseudomonadota), Bacteroidetes são os filios dominantes em todos os sistemas de consórcio que apresentaram relação positiva com Nitrogênio, matéria orgânica do solo e Fósforo total disponível. Já para as bactérias fixadoras de Nitrogênio os fatores mais importantes que afetam a abundância e a diversidade são: Matéria orgânica do solo, NH₄, Nitrogênio e Fósforo (ÇAKMAKÇI in ÇIĞ *et al.*, 2021).

Estudos apontaram correlações positivas entre algumas bactérias, por exemplo *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, ambas pertencentes ao atual Filo Pseudomonadota (GAFUR&SULTANA, 2013 apud ÇAKMAKÇI in ÇIĞ *et al.*, 2021).

Estudo liderado pela Embrapa (2022b), em parceria com a empresa Revbio (Paulínia, SP), demonstrou que é possível alterar a microbiologia da rizosfera e da porção aérea de plantas cultivadas em solos agrícolas degradados por meio da transferência de microrganismos das plantas de uma área biologicamente mais equilibrada para outras áreas desequilibradas, técnica denominada “Transplante Biológico”.

Tal estudo, coordenado pelo pesquisador da Embrapa André May, realizou a coleta de microrganismos endofíticos e rizosféricos de culturas agrícolas com grande equilíbrio biótico e que apresentavam grande produtividade de variadas culturas comerciais, onde plantas e genomas microbianos apresentavam interações perfeitas de acordo com a gestão ambiental. Em seguida os microrganismos foram transplantados para áreas agrícolas desequilibradas, o que gerou aumento de produtividade entre 10% e 30% em condições reais de cultivo, incluindo uma melhoria no desempenho da resistência a pragas e doenças em algumas das áreas de cultivo, com redução do uso de pesticidas em algumas situações (EMBRAPA, 2022b).

Os microrganismos extraídos das plantas doadoras (utilizando substratos especialmente preparados) foram estabilizados como pós solúveis e aplicados de duas formas: tratamento de sementes e pulverização foliar, dependendo da cultura.

O estudo da Embrapa acima citado concluiu que a planta tratada apresenta um comportamento metabólico totalmente diferente, o vigor da planta aumenta, as folhas ficam mais verdes, a área foliar aumenta, o que se reflete na produtividade.

3.4.1. Compost Tea e Extrato de Composto - Receitas equilibradoras do solo

Compost Tea é um extrato líquido de compostagem que contém todos os nutrientes solúveis, orgânicos e inorgânicos, e uma grande porção de organismos, como bactérias, fungos, protozoários e nematóides, que estão presentes na compostagem (INGHAM, 1999 apud INGHAM, 2005).

Compost Tea (Chá de compostagem - “Extrato de água fermentado de compostagem”) é um processo de “fermentação a frio”, que permite o crescimento dos organismos extraídos do composto. Tal técnica utilizada pela Agricultura Biológica, foi desenvolvida e divulgada pela Dra. Elaine Ingham, pesquisadora da Oregon State University, sendo que tal doutora continua realizando cursos acerca desta técnica agrícola. Segundo ela, o chá de compostagem apresenta uma antiga história, tendo sido produzido desde o Império Romano, por produtores que faziam chá composto, chá de esterco e chás de plantas de várias maneiras, atualmente tendo modificações nos processos de produção. Mas, na produção do chá, a aerobiose já era um item necessário para evitar o crescimento de microrganismos patogênicos, os quais poderiam trazer prejuízos agrícolas, problemas ambientais e perigos à saúde animal e humana. Uma das principais ideias acerca desta metodologia agrícola é que a

maioria das flores e vegetais crescem melhor em solos com biomassa bacteriana e fúngica aeróbica balanceada (protegendo as plantas das doenças presentes nos ecossistemas degradados por pesticidas e fertilizantes). E segundo ela, o produto final da decomposição anaeróbica também pode conter álcool, fenóis, ácidos orgânicos e proteínas que são tóxicos para os tecidos vegetais, e por este motivo a autora aponta a importância da aerobiose. (INGHAM, 2005)

No Manual escrito por Ingham (2005) a autora aponta que esta técnica de produção de Compost Tea sempre teve a função de agregar microrganismos e micronutrientes nos solos agrários, permitindo maior eficiência da agricultura sustentável, melhorando as culturas agrárias e aumentando a sanidade das plantas contra doenças e pragas. Ela comenta que o chá é um líquido fermentado que concentra bactérias, fungos, protozoários e nematoides em uma forma líquida facilmente absorvida. E quando é aplicado nas folhagens, aumenta a atividade biológica na camada superficial da folha, aumentando o tempo de abertura dos estômatos da planta, proporcionando maior absorção de nutrientes.

Outros comentários da autora indicam que ACT (Aerated Compost Tea) é um extrato aquoso de composto aerificado, fabricado sem uso de calor, que permite que organismos benéficos cresçam em números elevados. E por isso, o produtor deve se certificar que o composto contém os organismos extremamente importantes, além dos nutrientes que serão utilizados pelos microrganismos como alimentos. E para obter todos os benefícios possíveis do chá composto, o processo de fermentação deve ser aeróbico, porque em condições anaeróbicas, os nutrientes são perdidos por volatilização, onde os principais nutrientes são convertidos em formas gasosas com condições de oxigênio reduzido. Por isso, segundo a autora, o mal cheiro pode ser o resultado da anaerobiose: “...quando você sente o cheiro de amônia, ovo podre, vinagre, pútrido ou azedo, o pH está caindo, o álcool está sendo produzido e N, S e P são perdidos como gases”. Ela também aponta no manual escrito que para realizar a aplicação do Compost Tea, existem duas maneiras diferentes: como irrigação no solo ou como pulverização foliar (INGHAM, 2005).

Segue abaixo a metodologia utilizada para a produção do Compost Tea (VELAZCO, 2020)

- a) Recolher uma amostra de solo (de até 5 cm de profundidade) ou matéria orgânica retirada de composteira e/ou húmus (podendo ser também adicionado Bokashi, produto que contém microrganismos E.M)
- b) Colocar a amostra em uma sacola permeável (1 galão)

- c) Pegar um recipiente que comporta cerca de 5 galões de água e enchê-lo com 3/4 de água purificada (de preferência tratada com ácido húmico antes de ser utilizada na produção Compost Tea)
- d) Colocar 1 colher de Melaço (alimento para bactérias) dentro da água e misturá-lo (embora atualmente a Dra. Ingham não aconselhe a colocação do melaço)
- e) Colocar a sacola com a amostra de solo/húmus dentro do recipiente contendo água e melaço
- f) Colocar um equipamento aerificador dentro do recipiente contendo a água e a sacola de solo/húmus, no intuito de oxigenar o líquido e retirar os microrganismos benéficos da sacola (deixando por 24 a 36 horas para proliferação bacteriana)
- g) Após 24/36 horas, colocar o líquido contendo as bactérias já proliferadas dentro de tanque contendo água purificada (cerca de 300 galões), espalhando-a no solo e/ou nas culturas agrícolas (folhas e raízes).

Mas, segundo Garcia (2019), tal Chá de Composto Ativamente Aerado (AACT) é contra indicado para o crescimento de fungos, porque as condições que favorecem o crescimento de fungos em meio artificial aquoso não favorecem o crescimento de bactérias e vice versa, não podendo colocar fungos e bactérias em um mesmo fermentador: bactérias aceitam cardápios mais simples, com bastante agitação e muita aeração; fungos necessitam de cardápios mais complexos, com pouca agitação e pouca aeração.

O Dr. Garcia (2019) aponta alguns conceitos indicados pela Dra. Elaine Ingham, mas que para ele são conceitos equivocados, tais como: “...os microrganismos aeróbicos são sinônimo de bom e os anaeróbicos são sinônimos de ruim”. Entretanto, ele comenta que muitas bactérias que fazem parte do grupo E.M. (Microrganismos Eficazes do solo), tais como PSB (Bactérias Púrpuras Sulfurosas solubilizadoras de Fosfato) ou PNSB (Bactérias Púrpuras não solubilizadoras de Fosfato) e Bactérias Fotossintéticas Roxas (Púrpuras fotossintéticas), que são muito eficientes, benéficas e úteis na produção agrícola, podem ser aeróbicas, anaeróbicas ou microaerofílicas. Embora a maioria das bactérias utilizadas na agricultura sejam aeróbicas, algumas bactérias promotoras de crescimento vegetativo são microaerofílicas (necessitando de baixa concentração de Oxigênio).

E além da questão da aerobiose/anaerobiose, acima citada, o Dr. Garcia (2019) também aponta outro conceito, para ele, equivocado: ele comenta que no início o melaço era o nutriente preferido de quem fazia “Compost Tea”, e que após algum tempo a Dra. Elaine passou a desaconselhar o uso do melaço, apontando que não seria bom colocar o melaço no

Compost Tea, pois tal produto seria responsável pela proliferação de bactérias indesejáveis (patogênicas), além de agir contra fungos agrários. Entretanto, o Dr. Garcia comenta que o melão é um bom substrato para o cultivo de algumas bactérias benéficas, presentes no solo.

E para confirmar o comentário do Dr. Garcia sobre a importância do Melão, Andrade (2020) aponta que bactérias ácido lácticas pertencentes a família Lactobacillaceae (tais como *Lactobacillus* e *Pediococcus*), são consideradas regenerativas e que fazem parte do grupo de bactérias E.M. (Microrganismos Eficientes), as quais produzem ácido láctico que controla alguns microrganismos nocivos como o *Fusarium*, além de produzirem substâncias orgânicas, hormônios e vitaminas liberando também nutrientes úteis às plantas. Tais substâncias melhoram as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (ANDRADE, 2020).

Por tudo isso, Dr. Garcia sugere algumas alterações de substâncias presentes no Compost Tea, além de modificações na metodologia de produção do composto a ser utilizado na Agricultura Sustentável (denominado Extrato de Composto):

- Substâncias a serem acrescentadas no Compost Tea – Melão - 1 a 2%; fertilizante orgânico Hidrolisado de peixe - 2mL/L; Humatos (Ácidos Húmicos) Solúveis 1 g/L; Extrato de Kelp 1g/L
- Produção de fungos – cardápios mais complexos, com pouca agitação e pouca aeração
- Produção de Bactérias microaerofílicas (Promotoras de Crescimento Vegetal) – cardápios simples, pouca agitação e pouca aeração
- Produção de Bactérias aeróbicas agrárias – cardápios simples, com muita agitação e muita aeração

Para Garcia (2019), o Extrato de Composto é infinitamente superior ao chamado AACT (Compost Tea Aerado e Ativado).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi distribuído em quatro etapas.

1. Avaliação do efeito dos resíduos e subprodutos industriais Vinhaça, Xarope de Milho e Melão de Cana, avaliados na proliferação de bactérias em solos da superfície e inferiores (50cm), de um campo de cana-de-açúcar;
2. Avaliação do efeito dos substratos Vinhaça, Melão, Xarope de Milho e Macadâmia (7%) sobre 15 isolados de bactérias;
3. Identificação por métodos moleculares de bactérias filamentosas pertencentes ao Filo Actinobacteria, isoladas das amostras de solos (bactérias muito utilizadas na decomposição de matéria orgânica);
4. Avaliação da eficiência do melão de cana sobre a proliferação de bactérias de solos superficiais (utilizando metodologia de alta concentração de Oxigênio) e de solos inferiores - 50cm (utilizando metodologia de menor concentração de Oxigênio).

Os experimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Controle Biológico do Instituto Biológico, localizado no Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Agropecuária (CAPSA), e o sequenciamento na Unidade Laboratorial de Referência em Biologia Molecular Aplicada - ULRBMA (IB/SP).

4.1. Resíduos e subprodutos industriais na proliferação de bactérias do solo

Na Fase 1, os resíduos industriais Vinhaça, Xarope de Milho e Melão de Cana foram avaliados na proliferação de bactérias em solos da superfície e inferiores (50cm), de um campo de cana-de-açúcar. Para esse estudo, foram realizados dois tipos diferentes de experimentos com amostras de solos superficiais e de solos inferiores (50 cm). Para cada tipo de experimento, foram considerados 4 tratamentos representados por três diferentes resíduos e subprodutos industriais Vinhaça, Xarope de Milho e Melão, e pela Água (Controle).

Para cada tratamento foram estabelecidas seis repetições representadas por seis pontos em uma área de cana de açúcar pertencente a Usina do grupo Abengoa, São João da Boa Vista, SP., sendo cada repetição representada por duas amostras de solo coletadas na camada superficial e inferior, respectivamente, de uma área de cana-de-açúcar, distanciada em 1.000 metros uma da outra, pertencente à usina do grupo Abengoa, em São João da Boa Vista, SP.



Figura 7 – Locais de coleta de amostras de solo do canavial próximo à Usina Abengoa

De cada ponto de amostragem (repetição), foram coletadas duas amostras de solo em duas profundidades diferentes, superficial e inferior (50 cm abaixo da superfície), no intuito de isolar bactérias edáficas. As amostras coletadas, contendo 1000 gramas cada, foram levadas para o laboratório de Controle Biológico onde foram distribuídas em 4 potes de vidro. (e em cada pote foi colocado um dos substratos, e em um deles foi colocado somente água).

Cada amostra de solo que foi distribuída em quatro potes de vidro foi umedecida com 25 mL de uma solução contendo água mais 70% de cada um dos substratos (17,5 ml) vinhaça, xarope de milho e melão, sendo usado água para controle. Os potes foram incubados em BOD a 26°C por 30 dias. Para o experimento com solos superficiais, os potes foram mantidos semi-abertos, contendo tela, enquanto que para os solos inferiores, os potes foram mantidos fechados com tampas de rosca, no intuito de gerar baixa concentração de oxigênio no seu interior.

As avaliações foram realizadas após 2, 15 e 30 dias (Tabela 4 e Tabela 5), com base no plaqueamento e contagem das colônias das bactérias.

Para o plaqueamento das bactérias, foram utilizados dois diferentes meios de cultura: para os solos superficiais o meio de cultura utilizado foi o Ágar Nutriente – NA (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1917), encubado sob alta concentração de oxigênio; enquanto que dos solos inferiores o meio de cultura utilizado foi MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960; fórmula em anexo 8.4), encubado sob baixa concentração de oxigênio. Por isso, algumas bactérias isoladas são aeróbicas, enquanto outras podem ser aeróbicas facultativas ou microaerofílicas (dependentes de baixa concentração de oxigênio - de 1% a 15%). Assim, o experimento com solos superficiais visou isolar bactérias aerofílicas enquanto que o experimento com solos inferiores visou isolar bactérias aeróbicas facultativas ou microaerofílicas.

▪ **Amostras coletadas de solo superficial**

Para cada tempo de avaliação (2, 15 e 30 dias), 10 gramas de solo de cada tratamento foi colocado em um recipiente contendo 90 mL de água autoclavada, e submetido a diluição seriada até 10^{-10} . Para cada diluição, uma alíquota de 100µL foi semeada em placa de Petri contendo meio de cultura NA. As placas foram então seladas com parafilme ou filme de PVC e incubadas a 26°C por aproximadamente 72 horas, em BOD. Em seguida foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo (Figura 8).

Tabela 4 – Tratamentos das amostras de solos superficiais para isolamento de bactérias edáficas (alta concentração de oxigênio)

Solos superficiais		Plaqueamento das Amostras 1a – 2a – 3a – 4a – 5a – 6a		
		2 dias (N1)	15 dias (N2)	30 dias (N3)
Tratamento 1 (T1) Solo + H ₂ O 250 g de solo + 25 mL de H ₂ O (Controle)				
Tratamento 2 (T2) Solo + Vinhaça 250 g de solo + 17,5 mL de Vinhaça / 7,5 mL de H ₂ O				
Tratamento 3 (T3) Solo + Melaço 250 g de solo + 17,5 mL de Melaço/7,5 mL de H ₂ O				
Tratamento 4 (T4) Solo + Xarope de Milho 250 g de solo + 17,5 mL de Xarope de Milho/ 7,5 mL de H ₂ O				

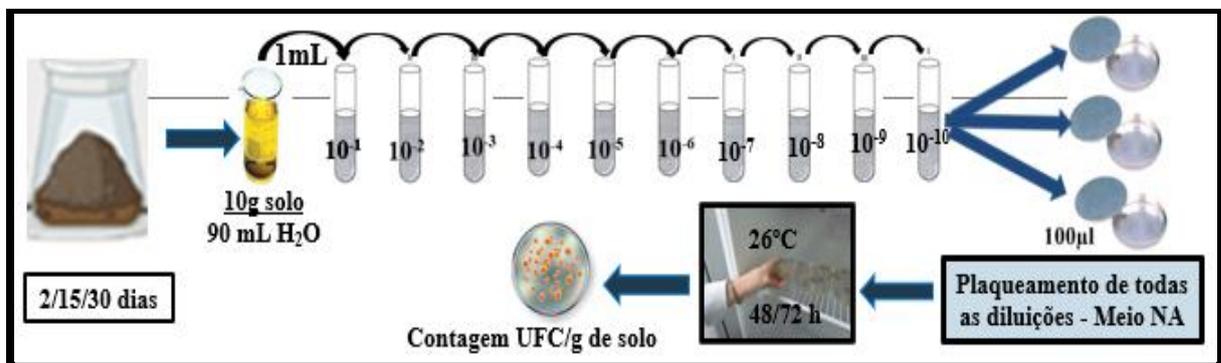


Figura 8 – Diluição seriada e plaqueamento das seis amostras de solos superficiais dos tratamentos controle, vinhaça, melaço e xarope de milho (2 dias, 15 dias e 30 dias após a coleta)

▪ **Amostras coletadas de solo inferior a 50 cm de profundidade**

A metodologia usada para contagem das bactérias das amostras de solo inferior foi a mesma já descrita acima, porém a diluição obtida foi plaqueada em placas de Petri contendo meio de cultura MRS (100 μ L). As placas não foram seladas com filme PVC e foram colocadas dentro de um recipiente de vidro com tampa contendo uma vela acesa (por cerca de 1 minuto). E em seguida, o recipiente de vidro contendo as placas de Petri foi colocado em BOD a 26°C por cerca de quatro dias. Posteriormente, foi realizada a contagem das UFC/g de solo (Tabela 5, Figura 9, Figura 10).

Tabela 5 – Tratamentos das amostras de solos inferiores (50cm) para isolamento de bactérias edáficas (baixa concentração de oxigênio)

Solos inferiores		Plaqueamento das Amostras 1b – 2b – 3b – 4b – 5b – 6b		
		2 dias (N1)	15 dias (N2)	30 dias (N3)
Tratamento 5 (T5) Solo + H ₂ O 250 g de solo + 25 mL de H ₂ O (Controle)				
Tratamento 6 (T6) Solo + Vinhaça 250 g de solo + 17,5 mL de Vinhaça / 7,5 mL de H ₂ O				
Tratamento 7 (T7) Solo + Melaço 250 g de solo + 17,5 mL de Melaço/7,5 mL de H ₂ O				
Tratamento 8 (T8) Solo + Xarope de Milho 250 g de solo + 17,5 mL de Xarope de Milho/ 7,5 mL de H ₂ O				

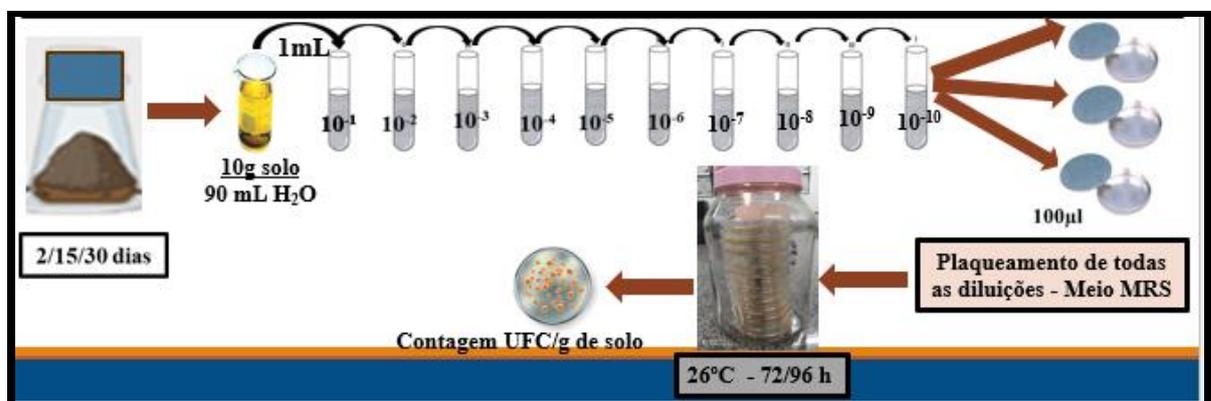


Figura 9 – Diluição seriada e plaqueamento das seis amostras de solos inferiores dos tratamentos controle, vinhaça, melaço e xarope de milho (2 dias, 15 dias e 30 dias após a coleta)



Figura 10 – Incubação de bactérias edáficas em condições de baixa concentração de oxigênio (vela acesa)

4.2. Resíduos e subprodutos industriais no crescimento de bactérias em meio de cultura líquido

Na Fase 2, quinze isolados de bactérias da coleção André Tosello, Campinas/SP, foram submetidas aos quatro tratamentos citados acima (Fase1), incluindo ainda o tratamento macadâmia. No tratamento controle foi utilizado apenas meio de cultivo.

Os substratos vinhaça, melão, xarope de milho e macadâmia foram avaliados como suplementos para a proliferação de 15 bactérias utilizadas por agricultores, inclusive na produção *on farm*, depositadas na coleção de bactérias do Laboratório de Controle Biológico/IB.

- *Bacillus subtilis*
- *Azospirillum brasilense*
- *Saccharopolyspora spinosa*
- *Bacillus amyloliquefaciens*
- *Chromobacterium subtsugae*
- *Bacillus thuringiensis* (BTK)
- *Bacillus megaterium* (atual *Priestia megaterium*)
- *Bradyrhizobium japonicum*
- *Bacillus pumilus*
- *Bacillus aryabhattai* (atual *Priestia aryabhattai*)
- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Bacillus licheniformis*
- *Streptomyces*
- *Bacillus velezensis*

A princípio cada bactéria foi inoculada dentro de tubo Falcon (50 mL) contendo 30 mL de meio de cultura específico listados abaixo (meios de cultura sem ágar)

- *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *S. spinosa* - Meio de Cultura Nutrient Broth (NB) - NA sem adição de ágar (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1917)
- *Bradyrhizobium* – Meio de cultura YMA com vermelho congo (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN e HOBEN, 1984)
- *Azospirillum* – Meio de Cultura NFB (DOBEREINER *et al.*, 1995)

Os frascos foram incubados à temperatura ambiente por 96 horas, sob agitação de 200 rpm, por quatro dias. Posteriormente, 1 mL do caldo de crescimento bacteriano foi colocado em quatro tubos Falcon com 9 mL do meio de cultura específico, onde foram adicionados 7% de um dos quatro substratos (autoclavados). Em um tubo foi colocado somente o meio de cultura sem a adição dos substratos (tratamento controle). Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por cinco dias em agitador orbital a 200 rpm. Após este período foram efetuadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-10}) e plaqueamentos ($100\mu\text{L}$) em placas de Petri com os meios de cultura acima mencionados (contendo Ágar), para contagem das células (UFC/mL). Tais placas de Petri, foram incubadas em BOD a 26°C por quatro a cinco dias. Foram realizadas seis repetições (Figura 11).

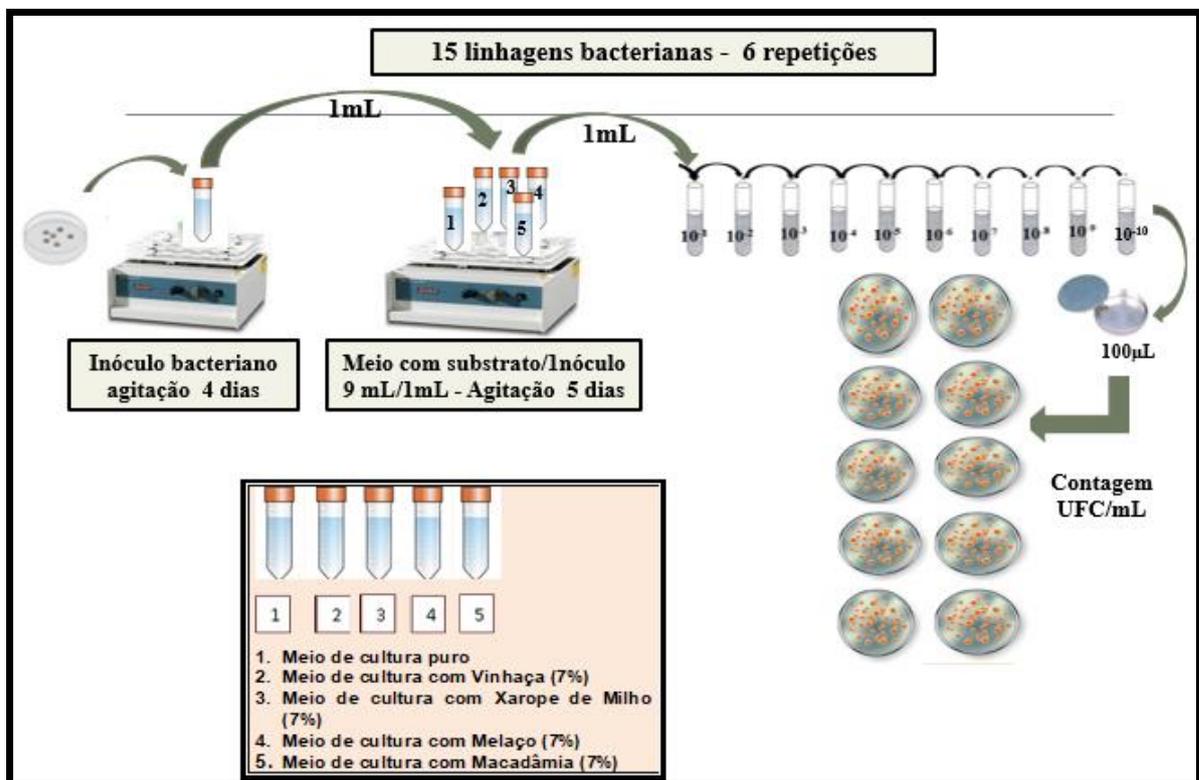


Figura 11 – Preparação do experimento para avaliação do efeito da vinhaça, xarope de milho, melaço e macadâmia sobre as bactérias utilizadas na produção agrícola

4.3. Bactérias filamentosas - Actinobactérias – isoladas do solo com resíduos e subprodutos industriais

Na Fase 3, algumas bactérias filamentosas isoladas das amostras de solos da Fase 1 foram identificadas por meio de sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal.

Algumas colônias bacterianas crescidas em placas de Petri, isoladas durante a Fase 1, apresentaram características morfológicas de Actinobactérias (similares a pequenas colônias fúngicas), como aponta a Figura 12.



Figura 12 – Característica morfológica de colônias de Actinomicetos.

Foto: Raquel Garibaldi Damasceno

<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/18934/000730906.pdf?sequence=1>

Tais colônias foram purificadas e microscopicamente analisadas para confirmar se eram filamentosas, utilizando a Coloração de Gram. Todas as bactérias com estrutura filamentososa, como mostra a figura 13, foram apontadas como possíveis Actinobactérias, as quais foram semeadas em meio de cultura ACA (FRIGHETTO & VALARINI, 2000 apud OLIVEIRA, 2003).

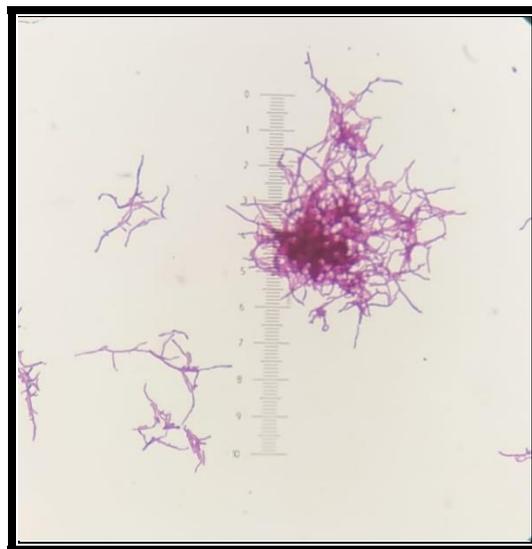


Figura 13 – Bactéria filamentososa (Actinobactéria)

A identificação das bactérias filamentosas similares a Actinobactérias, por meio do sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal, foi realizada no Laboratório de Referência em Biologia Molecular Aplicada do Instituto Biológico com a colaboração da Dra. Maria Del Pilar Rodriguez

Segue abaixo os procedimentos realizados para o sequenciamento das bactérias filamentosas (os detalhes dos procedimentos estão apontados no “Anexos 8.6”).

1. Extração de DNA – realizado pelo protocolo do método CTAB (ROMANO & BRASILEIRO, 1999)
2. Análise quantitativa do DNA – realizada após a extração do DNA bacteriano, utilizando o equipamento nanodrop (padronizadas para uma concentração de 100 ng/ μ L).
3. Amplificação do gene 16S RNA ribossomal por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase).
4. Purificação dos produtos amplificados por precipitação com PEG 6000 (SCHMITZ; RIESNER, 2006).
5. Sequenciamento do gene 16S RNA ribossomal empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems).
6. Análises das sequências nucleotídicas do gene 16S RNA ribossomal foram realizadas utilizando-se programa Bioedit versão 7.2 Windows, sendo comparadas com linhagens do banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências do banco de dados que resultaram em similaridade igual ou acima de 98,50% com a sequência analisada foram alinhadas no programa CLUSTAL W, pacote do programa Bioedit (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994).
7. Amplificação e sequenciamento com a utilização de *primers* específicos – para as amostras que não puderam ser identificadas pelo gene 16S RNA ribossomal, será realizado um segundo procedimento de amplificação (PCR) e sequenciamento utilizando-se *primers* específicos, sendo selecionados de acordo com o gênero identificado anteriormente com o sequenciamento do gene rRNA 16s.

4.4. Melaço na proliferação de bactérias em cultura líquida

Na Fase 4, o efeito do melaço foi avaliado em experimentos com algumas bactérias dos solos superficiais (alta concentração de oxigênio) e solos inferiores (menor concentração de oxigênio).

Para analisar o efeito do Melaço sobre as bactérias edáficas, dez colônias (isoladas do solo superficial) e dez colônias (isoladas do solo inferior /50cm) que cresceram em meios NA e MRS, respectivamente, utilizando duas metodologias com diferentes concentrações de oxigênio, foram testadas individualmente em meios de cultura NB e MRS caldo, contendo melaço (2%) e em meio não contendo melaço.

Primeiramente, as colônias foram semeadas e purificadas em placa de Petri contendo meio de cultura e em seguida foram preparados os inóculos contendo colônia bacteriana dos solos superficiais e inferiores. Para isso, a colônia bacteriana de solos superficiais foi colocada em tubo contendo 10 mL de meio de cultura NB (*Nutrient Broth* - NA sem adição de ágar) e a colônia bacteriana de solos inferiores foi colocada em tubo contendo 10 mL de meio de cultura MRS. Os tubos contendo NB foram colocados no agitador 200 rpm durante 7 dias em temperatura ambiente (mantendo a oxigenação). Já os tubos contendo MRS permaneceram fechados em BOD durante 7 dias, sem agitação, em temperatura 26°C (diminuindo a oxigenação).

Após 7 dias, 1mL do inóculo (meio de cultura NB/bactéria de solo superior) foi colocado em 2 tubos com 9mL de meio NB, um deles contendo melaço (2%), os quais foram colocados no equipamento de agitação durante 1 semana (garantindo alta concentração de oxigênio).

Enquanto que 1 mL do inóculo (meio MRS Caldo/bactéria de solo inferior) foi colocado em duas garrafas tipo Schott, contendo meio MRS Caldo, uma delas contendo melaço (2%). E ambas as garrafas tipo Schott foram colocadas dentro de um pote de vidro, contendo vela acesa, como mostra a Figura 14 (garantindo baixa concentração de oxigênio). Os potes foram colocados em BOD a 26°C durante 1 semana.



Figura 14 – Cultura de bactérias de solos inferiores em meio Caldo MRS puro e com melaço

Após 1 semana os inóculos foram diluídos serialmente e plaqueados em meios NA (bactérias de solos superiores) e MRS (bactérias de solos inferiores). As placas contendo NA foram colocadas em BOD a 26°C. E as placas de Petri contendo meio MRS (sem fechamento de plástico filme) foram colocadas dentro de um pote de vidro contendo vela acesa por cerca de 1 minuto (Figura 15) e colocadas em BOD a 26°C. Após 4 dias foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) das amostras, comparando-as, no intuito de confirmar a ação benéfica do melão sobre cada bactéria experimentada.



Figura 15 – Incubação das bactérias de solos inferiores, cultivadas em meio de cultura MRS puro e com Melão

4.5. Análise estatística

Os experimentos foram realizados com delineamento casualizado, onde os resultados das Fases 1, 2 e 4, foram avaliados através da análise estatística (RStudio). Em tais fases, a diferença significativa dos resultados foi avaliada através do teste de comparação múltipla Tukey (95%), comparando as médias das unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC). E na Fase 2 também foi utilizado o teste de comparação múltipla Dunnett (95%), no qual houve comparação dos resultados entre o tratamento controle e os demais tratamentos.

O teste estatístico “Bartlett-Test” foi utilizado para analisar a homogeneidade ou heterogeneidade de variâncias, enquanto que o “Shapiro-Test” foi utilizado para analisar a normalidade ou anormalidade dos resíduos. Quando tais testes apontam P-value < 0,05, é necessário realizar os testes de comparação múltipla com Escala Logarítmica (Log), com o objetivo de estabilizar as variâncias e os resíduos, obtendo homogeneidade e normalidade.

Na Fase 1 foram analisados resultados de quatro tratamentos (controle, vinhaça, melão e xarope de milho), em seis repetições (amostras de solos superficiais e inferiores) e em três períodos (2 dias, 15 dias e 30 dias).

Na Fase 2 foram analisados resultados de cinco tratamentos (controle, vinhaça, melão, xarope de milho e macadâmia), em seis repetições (15 linhagens bacterianas agrárias)

Na fase 4 foram analisados resultados de dois tratamentos (controle e melão), em dez repetições com bactérias aeróbicas e em dez repetições com bactérias aeróbicas facultativas/microaerofílicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resíduos e subprodutos industriais na proliferação de bactérias no solo

Os testes bioestatísticos apontaram heterogeneidade de variâncias dos solos superficiais (Bartlett-Test / P-value 2,2e-16) e dos solos inferiores (Bartlett-Test / P-value 2,2e-16), além de anormalidade dos resíduos dos solos superficiais (Shapiro-Test /P-value 3,767e-13) e dos solos inferiores (Shapiro-Test /P-value 6,558e-14), onde ambos os testes apontaram P-value < 0,05. Por isso, foi realizada a análise estatística com escala logarítmica (Tukey95-log), com o objetivo de estabilizar as variâncias e obter normalidade e homogeneidade.

Para os solos superficiais, xarope de milho aumentou significativamente a população média de bactérias resultante das três avaliações, em relação a testemunha. Já para os solos inferiores, os três compostos melaço, vinhaça e xarope de milho aumentaram significativamente a população média de bactérias em relação as respectivas testemunhas (Tabela 6).

Tabela 6 – Média das Unidades Formadoras de Colônias por grama de solos superficiais e solos inferiores - 6 amostras/4 Tratamentos

Bactérias isoladas de amostras de Solos superficiais – Teste Tukey95(Log)				
Tratamentos	UFC/g x 10⁶ 2 dias – (N1)	UFC/g x 10⁶ 15 dias – (N2)	UFC/g x 10⁶ 30 dias – (N3)	Média geral UFC/g x10⁶ (N1+N2+N3)
Xarope de Milho	7,40 ab	34,32 a	119,87 a	31,22 a
Vinhaça	11,28 a	8,96 ab	9,47 b	9,85 b
Controle (H ₂ O)	11,72 a	6,63 ab	6,80 b	8,08 b
Melaço	2,30 b	2,23 b	1,80 c	2,16 c
	F-value: 3,711 Pr: 0,0285	F-value: 4,548 Pr: 0,0138	F-value: 35,15 Pr: 3,63e-08	F-value: 9,279 Pr: 1,16e-08
Bactérias isoladas de amostras de Solos inferiores (50cm) – Teste Tukey95(Log)*				
Tratamentos	UFC/g x 10⁶ 2 dias - (N1)	UFC/g x 10⁶ 15 dias - (N2)	UFC/g x 10⁶ 30 dias - (N3)	Média geral UFC/g x10⁶ (N1+N2+N3)
Melaço	0,51 a	3,09 a	2,49 a	1,58 a
Vinhaça	0,92 a	1,22 a	1,81 a	1,27 a
Xarope de Milho	1,09 a	1,1 a	0,64 ab	0,92 a
Controle (H ₂ O)	0,2 a	0,36 a	0,10 b	0,19 b
	F-value: 1,572 Pr: 0,227	F-value: 2,2364 Pr: 0,1154	F-value: 6,231 Pr: 0,003665	F-value: 3,234 Pr: 0,00292

Dos solos superficiais, a análise estatística realizada, demonstrou diferença significativa entre os tratamentos, exceto entre “vinhaça e controle”. E dos solos inferiores, a

análise estatística realizada, demonstrou diferença significativa entre os tratamentos “xarope e controle”, “vinhaça e controle” e “melaço e controle” (Figura 16).

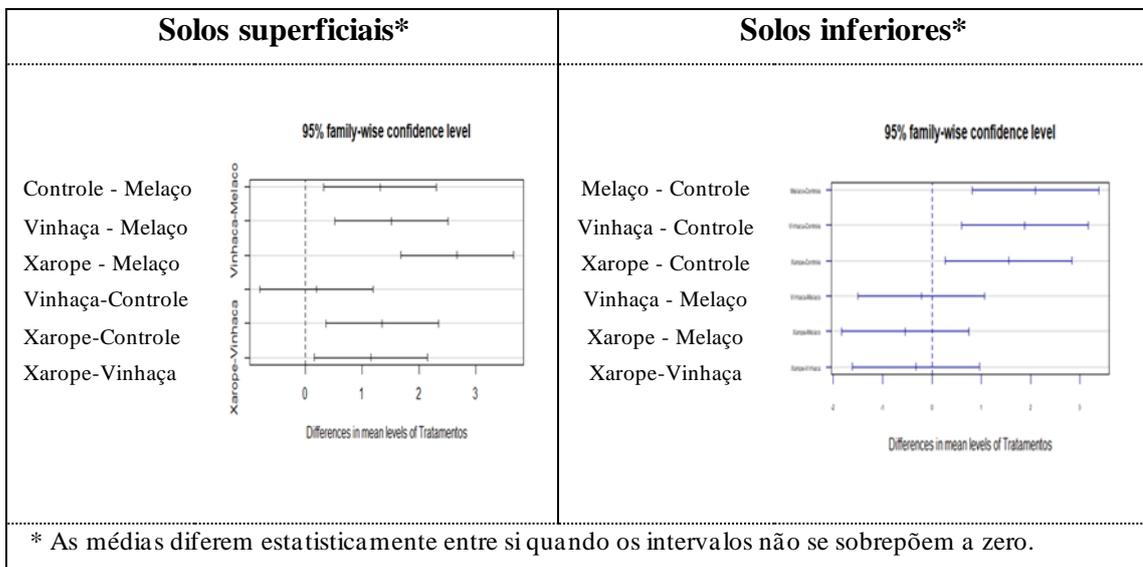


Figura 16 – Diferenças entre os níveis de média dos tratamentos.

Nos solos superficiais a análise estatística também apontou interação significativa somente entre tempos dentro do tratamento xarope de milho (P-value: 7,07e-05), o que indica que o xarope de milho no solo superficial atua com maior eficiência em 30 dias. E nos solos inferiores (50cm) a análise estatística apontou que não houve interação significativa (P-value: 0,4108740) entre tratamentos e tempos (Figura 17).

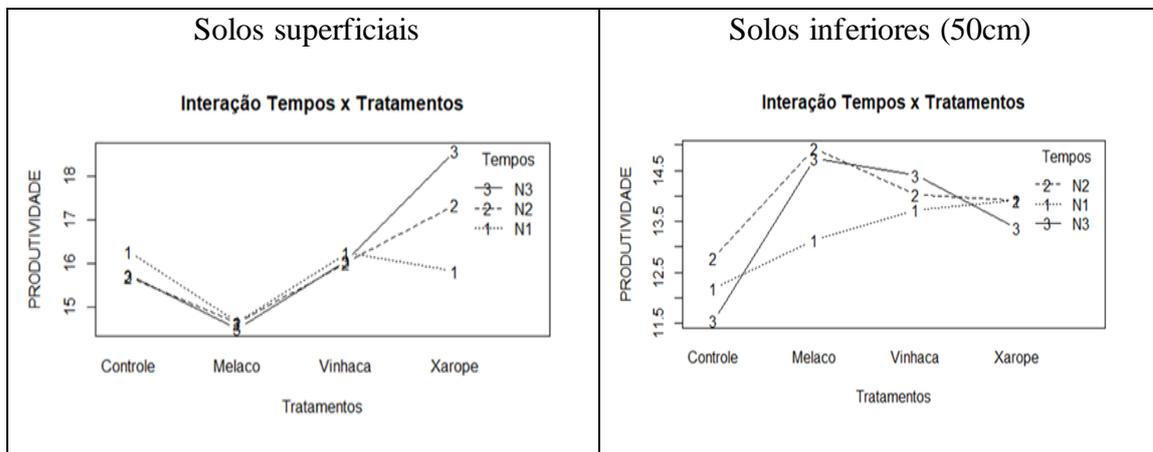


Figura 17 – Interação Tempos (N1-2dias; N2-15dias; N3-30 dias) x Tratamentos (Controle; Melaço; Vinhaça; Xarope de Milho) em solos superficiais e em solos inferiores.

A análise estatística Tukey95 (Log) realizada separadamente nos diferentes tempos (2 dias; 15 dias; 30 dias) apontaram as diferenças significativas das médias dos tratamentos (Figura 18).

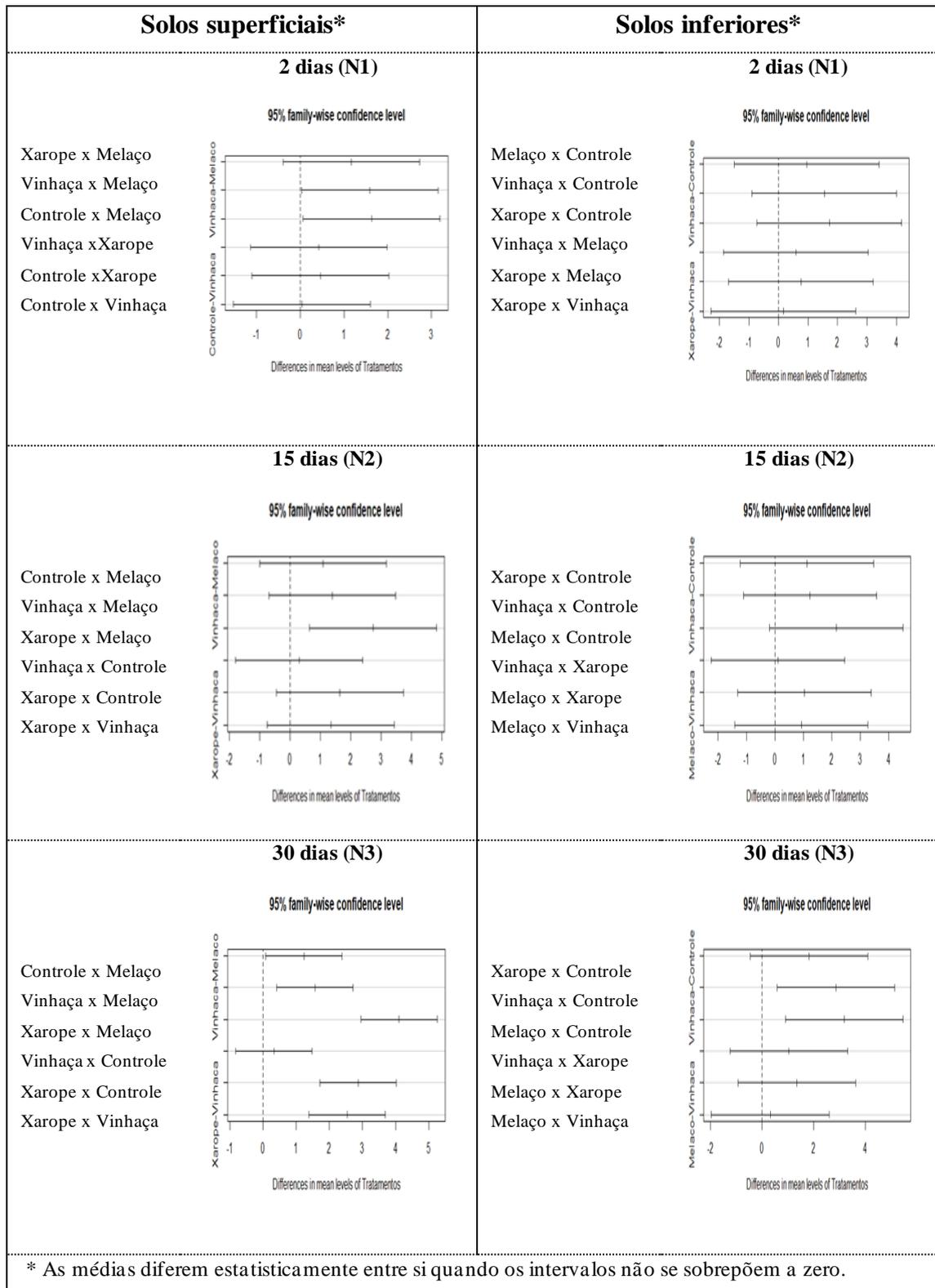


Figura 18 – Diferenças significativas entre os tratamentos nos tempos: 2 dias/15 dias/30 dias.

Como apontado por Bordignon *et al.* (2012) a UFC bacteriana por grama de solo se torna maior quando ocorre adição de vinhaça, e que seu uso na biofertilização contribui para o aumento das comunidades microbianas do solo, devido alta dose de compostos orgânicos e grande diversidade de nutrientes de sua composição (tais como

Manganês, Cobre, Zinco, Ferro, Enxofre, Magnésio, Cálcio, Fósforo, Nitrogênio, Carbono, e, principalmente Potássio). Os compostos orgânicos de maior proporção na vinhaça são: glicerol, ácido láctico, etanol, ácido acético, frutose, glicose, sacarose, galactose, acetatos, oxalatos e citratos. Ácidos orgânicos também fazem parte da compostagem da vinhaça, tais como: aconítico, málico, maleico, cítrico, tartárico, malônico, oxálico, glicólico, glutâmico, láctico e succínico (DOWD *et al.*, 1994; BENKE *et al.*, 1998; DECLoux; BORIES, 2012; PARNAUDEAU *et al.*, 2008; DOELSCH *et al.*, 2009 apud SILVA, 2012).

A vinhaça já foi testada como meio de cultura para proliferação de algumas bactérias, tais como:

- ***Azospirillum brasilense*** em meio vinhaça 100% - maior proliferação; aumento dos teores de fósforo e nitrogênio além de reduzir a carga orgânica (SILVA *et al.*, 2020).
- ***Bacillus subtilis*** em meio vinhaça 25% – maior proliferação (CARDOSO e ARAÚJO, 2011).
- **Bactérias diazotróficas (Gênero *Azospirillum*)** em meio vinhaça - eficiente proliferação. Em meio vinhaça 100% - maior proliferação do gênero *Azospirillum*, aumento dos valores de pH (pH ácido - 5,0 transformado em pH básico – de 7,0 a 9,0), gerando diminuição da acidez dos solos agrários fertirrigados com Vinhaça (MARTINS *et al.*, 2016).
- **Actinobactérias (gênero *Streptomyces*)** em meio vinhaça – eficiente proliferação e remoção de metais pesados presentes na vinhaça, sendo biorremediadoras de solos contaminados (APARÍCIO *et al.*, 2017). E segundo Omori (2014) as Actinobactérias fazem parte do terceiro filo bacteriano de maior concentração nos solos de canaviais fertirrigados por vinhaça (cerca de 6% das bactérias observadas). Algumas Actinobactérias fazem parte dos E.M. (Microrganismos Eficientes), presentes no solo, os quais controlam fungos e bactérias patogênicas e também aumentam a resistência das plantas (ANDRADE, 2020). Por isso, pode-se constatar que tais bactérias são beneficiadas pela utilização da Vinhaça como biofertilizante.
- ***Corynebacterium glutamicum*** (Actinobactéria) em meio vinhaça – resultados eficientes com *Corynebacterium glutamicum* foram obtidas tanto em vinhaça quanto em melão (CAZETTA *et al.*, 2005 apud DANTAS, 2020)
- ***Lactobacillus sp.*** em meio vinhaça - cultivo de bactérias produtoras de ácido láctico, devido a diversidade de nutrientes da sua composição e sobretudo ao alto teor de proteína e cerca de 8% de lipídeo (VUKOVIC *et al.*, 2015)

- *Paenibacillus polymyxa* e *Azotobacter chroococcum* (bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico) cultivadas em meio vinhaça (abaixo de 15%) – eficiência da proliferação bacteriana (OMAR *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008 apud APARÍCIO *et al.*, 2017).

No presente estudo experimental, o tratamento vinhaça (70%) proporcionou eficiente proliferação de bactérias tanto dos solos superficiais (mesmo sem diferença significativa com o tratamento controle) quanto dos solos inferiores (com diferença significativa com o tratamento controle).

Das amostras de solos superiores, 13 espécies do grupo Actinobactérias foram isoladas e sequenciadas, todas aeróbicas e Gram positivas: 10 *Streptomyces* sp.; 1 *Nocardia* sp.; 1 *Promicromonospora* sp.; 1 *Brevibacterium* sp.). E segundo Sharma (2005 apud NICOLAU, 2016), o gênero *Streptomyces* é um dos grupos bacterianos dominantes em solos de superfície, muito utilizado na produção agrária como degradadores de matéria orgânica e produtores de substâncias antimicrobianas. E segundo Goth *et al.* (1999 apud OLIVEIRA, 2003) *Nocardia* é formado por importantes bactérias edáficas, degradadoras de matéria orgânica e capazes de decompor compostos químicos ambientalmente prejudiciais. E como já citado anteriormente a vinhaça pode ser utilizada como meio de cultura para Actinobactérias.

Entretanto, no presente estudo experimental, a maior eficiência da vinhaça ocorreu na proliferação de bactérias de solos inferiores, inoculadas em placas de petri com MRS (meio de cultura para bactérias ácido lácticas). Tais placas foram colocadas dentro de recipientes contendo baixa concentração de oxigênio (contendo vela acesa cerca de um minuto). Por tais motivos, nestas amostras de solos inferiores, é possível que haja a presença de algumas bactérias ácido lácticas que se proliferam em MRS, tais como *Lactobacillus* e *Pediococcus* (bactérias EM) e *Leuconostoc*, as quais podem ser aeróbicas, microaerofílicas ou anaeróbicas facultativas. E como já citado anteriormente, a vinhaça pode ser utilizada como meio de cultura para *Lactobacillus* spp.

O melaço de cana (subproduto sucroalcooleiro, produzido a partir da cristalização do açúcar) também está sendo utilizado como fertilizante em solos agrícolas, em função das taxas de nutrientes presentes. Devido a alta concentração de carbono fermentável, tal substrato pode permitir a nutrição, o crescimento e a multiplicação de microrganismos, inclusive alguns microrganismos benéficos do solo, como as Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas “BPCP” (DALSASSO, 2019; DANTAS, 2020).

Certos microrganismos osmofílicos são tolerantes ao açúcar e necessitam de ambiente com baixa Aa (atividade de água), como produtos com teores significativos de açúcar, para se desenvolver. Algumas bactérias edáficas são osmofílicas, tolerantes à alta

concentração de açúcar, podendo se adaptar ao melaço de cana-de-açúcar. (WHITE JÚNIOR, 1978)

Segundo USDA (2019a) o Melaço contém os seguintes ingredientes: Água; Lipídios; Carboidratos (sacarose, glicose, frutose); Cálcio; Ferro; Magnésio; Fósforo; Potássio; Sódio; Zinco; Cobre; Manganês; Selênio; Tiamina (Vitamina B1); Riboflavina (Vitamina B2); Niacina (Vitamina B3); Ácido Pantotênico (Vitamina B5); Vitamina B6; Colina (Vitamina B8); Ácidos Graxos. (baixa concentração de Fósforo e Potássio)

Devido tais compostos o melaço já foi testado como meio de cultura para proliferação de algumas bactérias, tais como:

- *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* (E.M. regenerativas) em meio Melaço (5% de melaço suplementado com 0,5% de extrato de levedura) – geração de maior proliferação bacteriana (VILLAVICENCIO *et al.*, 1999). Tais bactérias são normalmente proliferadas em meio MRS (meio utilizado em nosso presente experimento, como apontado na metodologia).
- *Corynebacterium glutamicum* (Actinobactéria) em meio melaço – resultados eficientes com *Corynebacterium glutamicum* foram obtidas tanto em vinhaça quanto em melaço (CAZETTA *et al.*, 2005 apud DANTAS, 2020)
- **Bactérias E.M.: Actinobactérias; Lactobacilos (*Lactobacillus* e *Pediococcus*); Bactérias fotossintéticas roxas tais como *Chromatiales* (bactérias púrpuras sulfurosas) e *Rhodospirillaceae* (bactéria púrpura não sulfurosa).** Tais bactérias são inoculadas em composto com melaço (1% a 2%), denominado Compost Tea, utilizado na irrigação do solo ou na pulverização foliar (INGHAM, 2005; ANDRADE, 2020).

Segundo Delgado (1975 apud FELTRIN *et al.*, 2000), o melaço de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentativos e muitos minerais que faz com que seja considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias ácido lácticas pertencentes a família Lactobacillaceae (tais como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) algumas utilizadas na produção vegetal.

Segundo Garcia (2019), o desaconselhamento do uso do melaço no Compost Tea pela responsável Dra. Elaine Ingham (devido somente a proliferação de bactérias patogênicas e contra fungos agrários) não está correto. O substrato melaço proporciona a proliferação de microrganismos eficientes (E.M.) regenerativos, os quais auxiliam as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (ANDRADE, 2020).

No presente trabalho experimental, o tratamento melaço (70%) proporcionou eficiente proliferação de bactérias dos solos inferiores plaqueados em meio MRS com baixa concentração de oxigênio (devido à vela acesa). Tais motivos apontam que muitas bactérias deste tratamento podem ser osmofílicas, ácido lácticas e aeróbicas facultativas.

O xarope de milho também está sendo utilizado como fertilizante em solos agrícolas, em função das taxas de nutrientes presentes. Devido a alta concentração de carbono fermentável, tal substrato pode permitir a nutrição, o crescimento e a multiplicação de microrganismos, inclusive alguns microrganismos benéficos do solo, como as Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas “BPCP” (DALSSASSO, 2019; DANTAS, 2020).

O xarope de milho apresenta os seguintes nutrientes: Sódio (alta concentração); Potássio; Cálcio; Ferro; Magnésio; Fósforo; Zinco; Cobre; Manganês; Selênio; Tiamina (Vitamina B1); Riboflavina (Vitamina B2); Niacina (Vitamina B3); Ácido Pantotênico (Vitamina B5); Vitamina B-6; Colina (Vitamina B8) e Carboidratos de alta frutose, sendo um açúcar artificial, obtido através da síntese de amido de milho, e que contém uma quantidade grande do dissacarídeo maltose. Por tais motivos, algumas bactérias edáficas osmofílicas (tolerantes à alta concentração de açúcar), podem se adaptar ao xarope de milho (MARCELINO, 2021; USDA, 2019b).

Um estudo científico aponta a proliferação de bactérias osmofílicas em meio xarope de milho em ambientes de produção e armazenamento de xarope de milho, cujos inóculos apresentaram contaminação microbiana osmofílica, mesmo não patogênica (PORTO, 2000).

Xarope de milho também apresenta alta concentração de NaCl, o que permite a proliferação de bactérias halotolerantes (toleram alta concentração de NaCl).

O estudo realizado por Santos (2019) apontou algumas bactérias halotolerantes, resistentes a alta concentração de NaCl: *Pseudomonas aeruginosa* (9%); *Bacillus atrophaeus* (9%); *Bacillus cereus* (5%); *Lysinibacillus macroides* (3%); *Bacillus thuringiensis* (9%). O endósporo, pertencente às bactérias dos gêneros *Bacillus* ou correlatos, permite uma maior tolerância a tais substâncias.

Por estes motivos, bactérias halotolerantes e osmofílicas podem se proliferar no meio de cultura contendo xarope de milho, sendo utilizado como fertilizante agrário.

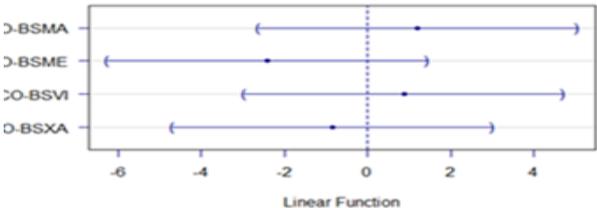
No presente trabalho experimental, o tratamento xarope de milho (70%) proporcionou eficiente proliferação de bactérias dos solos superiores e inferiores.

5.2. Resíduos e subprodutos industriais no crescimento de bactérias em cultura líquida

Os testes bioestatísticos apontaram heterogeneidade de variâncias (Bartlett-Test) e anormalidade dos resíduos (Shapiro-Test), ambos com $P\text{-value} < 0,05$. Por isso, foi realizada a análise estatística com escala logarítmica em todos os resultados experimentais das 15 bactérias, com o objetivo de estabilizar as variâncias e obter normalidade e homogeneidade.

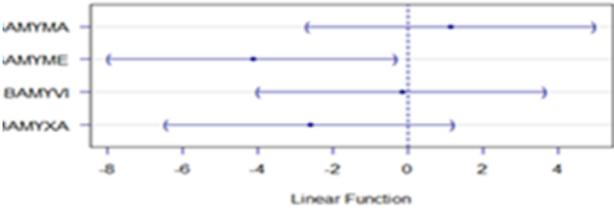
Nenhum dos compostos incrementou significativamente a população de bactérias em relação as testemunhas (Tabelas 7 a 21). Por outro lado, Xarope e Melaço afetaram negativamente a população das bactérias, principalmente o Xarope que reduziu significativamente a população em relação as testemunhas para 10 das 15 bactérias, seguido do melaço, para 4 bactérias. Vinhaça e Macadâmia, apesar de não diferir significativamente das testemunhas, geraram maiores populações de bactérias para 12 das 15 espécies de bactérias.

Tabela 7 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bacillus subtilis*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	<p>Teste Dunnett “Sem diferença significativa” 95% family-wise confidence level</p> 
Macadâmia	72.416.666,67 a	
Vinhaça	30.933.333,33 a	
Controle	16.450.000 a	
Xarope	86.681.000 a	
Melaço	20.066.666,67 a	
P-value: 0,134		

*Bartlett-Test / P-value 0,0003793(heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 0,0004324(anormalidade)

Tabela 8 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	<p>Teste Dunnett Com 1 diferença significativa - “Controle x Melaço” 95% family-wise confidence level</p> 
Macadâmia	1.411.100.000 a	
Controle	44.633.333,33 ab	
Vinhaça	32.333.333,33 ab	
Xarope	21.883.500 ab	
Melaço	1.270.000 b	
P-value: 0,00827		

*Bartlett-Test / P-value 2,2e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 9,858e-10 (anormalidade)

Tabela 9 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Azospirillum brasilense*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 2 diferenças significativas – “Controle x Xarope”; “Controle x Melaço”
Vinhaça	9.073.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Macadâmia	7.211.666,67 a	
Controle	2.911.666,67 ab	
Melaço	479.166,67 b	
Xarope	85 c	
P-value: 1,78e-14		

*Bartlett-Test / P-value 2,2e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 7,296e-07 (anormalidade)

Tabela 10 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bacillus velezensis*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett “Sem diferença significativa”
Macadâmia	192.833.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Vinhaça	104.200.000 ab	
Controle	26.666.666,67 ab	
Xarope	9.800.000 b	
Melaço	14.488.333,33 b	
P-value: 0,00494		

*Bartlett-Test / P-value 4,994e-11 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 1,367e-05 (anormalidade).

Tabela 11 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Priestia aryabhatai*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 1 diferença significativa – “Controle x Xarope”
Macadâmia	176.516.666,67 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Vinhaça	46.500.000 a	
Controle	15.500.000 ab	
Melaço	5.411.666,67 bc	
Xarope	795.833,33 c	
P-value: 1,14e-05		

*Bartlett-Test / P-value 1,122e-15 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 5,378e-06 (anormalidade)

Tabela 12 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bacillus thuringiensis* Kurstaki (BtK)

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 1 diferença significativa – “Controle x Xarope”
Vinhaça	351.333.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Melaço	175.483.333,33 a	
Controle	103.866.666,67 a	
Macadâmia	38.400.000 a	
Xarope	850.000 b	
P-value: 0,00038		

*Bartlett-Test / P-value 3,905e-14 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 0,008391 (anormalidade)

Tabela 13 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bacillus pumilus*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 2 diferenças significativas – “Controle x Xarope”; “Controle x Melaço”
Vinhaça	593.083.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Macadâmia	217.500.000 a	
Controle	381.116.666,67 a	
Melaço	12.093.333,33 b	
Xarope	1.716.666,67 b	
P-value: 7,24e-05		

*Bartlett-Test / P-value 5,448e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 0,01417 (anormalidade)

Tabela 14 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bacillus licheniformis*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 1 diferença significativa – “Controle x Xarope”
Vinhaça	899.666.666,67 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Controle	342.333.333,33 ab	
Melaço	963.350.000 ab	
Macadâmia	212.833.333,33 ab	
Xarope	46.766.666,67 b	
P-value: 0,00827		

*Bartlett-Test / P-value 1,648e-05 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 0,01137 (anormalidade)

Tabela 15 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Priestia megaterium*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Sem diferença significativa
Vinhaça	8.600.000 a	<p>95% family-wise confidence level</p> <p>MEGMA MEGME PMEGVI MEGXA</p> <p>Linear Function</p>
Macadâmia	16.265.000 a	
Controle	1.610.166,67 ab	
Xarope	3.273.500 ab	
Melaço	78.500 b	
P-value: 0,00256		

*Bartlett-Test /P-value 8,206e-11 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 0,0003898 (anormalidade)

Tabela 16 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Pseudomonas putida*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 2 diferenças significativas – “Controle x Xarope”; “Controle x Melaço”
Macadâmia	574.700.000 a	<p>95% family-wise confidence level</p> <p>*PUTMA *PUTME *PPUTVI *PUTXA</p> <p>Linear Function</p>
Controle	416.850.000 a	
Vinhaça	352.033.333,33 a	
Xarope	5.164.833,33 b	
Melaço	18.537.166,67 b	
P-value: 2,67e-05		

*Bartlett-Test /P-value 1,352e-09 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 0,04965 (anormalidade)

Tabela 17 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Pseudomonas fluorescens*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 2 diferenças significativas – “Controle x Xarope”; “Controle x Melaço”
Macadâmia	60.533.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p> <p>*FLUMA *FLUME *PFLUVI *FLUXA</p> <p>Linear Function</p>
Vinhaça	168.976.666,67 a	
Controle	48.266.666,67 a	
Xarope	31.333,33 b	
Melaço	10.667.500 b	
P-value: 3,34e-07		

*Bartlett-Test /P-value 2,2e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 9,213e-05 (anormalidade)

Tabela 18 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Streptomyces violaceus*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 1 diferença significativa – “Controle x Xarope”
Controle	366.666.666,67 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Vinhaça	101.500.000 a	
Macadâmia	592.466.666,67 a	
Melaço	45.000.000 a	
Xarope	3.311.666,67 b	
P-value: 8,66e-05		

*Bartlett-Test /P-value 2,2e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 6,263e-06 (anormalidade)

Tabela 19 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Saccharopolyspora spinosa*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 2 diferenças significativas – “Controle x Xarope”; “Controle x Melaço”
Vinhaça	11.833.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Controle	3.126.666,67 ab	
Macadâmia	2.350.000 ab	
Melaço	293.335 b	
Xarope	283,33 c	
P-value: 7,55e-08		

*Bartlett-Test /P-value 2,2e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 1,516e-05 (anormalidade)

Tabela 20 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Chromobacterium subtsugae*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	Teste Dunnett Com 1 diferença significativa – “Controle x Xarope”
Controle	89.133.333,33 a	<p>95% family-wise confidence level</p>
Macadâmia	99.000.000 a	
Vinhaça	48.991.666,67 a	
Melaço	90.801.666,67 a	
Xarope	17.500 b	
P-value: 3,41e-07		

*Bartlett-Test /P-value 2,609e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 1,513e-06 (anormalidade)

Tabela 21 – Média das Unidades formadoras de colônias por mL de meio de cultura cultivado com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*

Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)	<p>Teste Dunnett Com 2 diferenças significativas – “Controle x Xarope”; “Controle x Melaço” 95% family-wise confidence level</p>
Controle	353.333.333,33 a	
Vinhaça	1.831.800.000 a	
Macadâmia	897.016.668,33 ab	
Melaço	677.668,33 bc	
Xarope	235 c	
P-value: 4,28e-06		

*Bartlett-Test /P-value 2,2e-16 (heterogeneidade); Shapiro-Test /P-value 2,091e-05 (anormalidade)

A vinhaça já foi testada como meio de cultura para proliferação de *Bacillus subtilis*, tendo o meio de cultura com vinhaça a 25% gerado maior proliferação bacteriana (CARDOSO & ARAÚJO, 2011). Outros estudos apontaram que o uso da bactéria *Bacillus subtilis* tem como benefícios a diminuição dos efeitos negativos da vinhaça e o aumento da fertilidade do solo (SANTOS; KANDASAMY; RIGOBELLO, 2018). Além disso, Santos *et al.* (2018) apontaram que a utilização das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* apresentam benefícios agrícolas, tais como: diminuição dos efeitos negativos da vinhaça, aumento da fertilidade do solo gerando crescimento vegetal.

Tais informações sugerem que porcentagens da vinhaça acima do que foi colocado no tratamento vinhaça (7%) podem aumentar a proliferação da bactéria *Bacillus subtilis*, podendo gerar diferença significativa da análise estatística.

A vinhaça já foi testada como meio de cultura para proliferação de *Azospirillum brasilense* (bactéria diazotrófica). Os meios de cultura com vinhaça a 25% e 100% geraram maior proliferação bacteriana comparados com o meio sem vinhaça (sobretudo vinhaça 100%). Tais experimentos apontaram aumento dos teores de fósforo e nitrogênio, redução da carga orgânica, além do aumento dos valores de pH ácido da vinhaça (3,0 a 5,0) para valores de pH básicos (de 7,0 a 9,0), o que pode auxiliar a diminuição da acidez dos solos agrários fertirrigados com vinhaça (MARTINS *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2020).

Portanto, da mesma forma que para *B. subtilis*, porcentagens da vinhaça acima do que foi colocada no tratamento vinhaça (7%) podem aumentar a proliferação da bactéria *Azospirillum*, podendo gerar diferença significativa da análise estatística.

O estudo realizado por Santos (2019) apontou algumas bactérias halotolerantes, resistentes a alta concentração de NaCl, sendo o *Bacillus thuringiensis* uma das bactérias que

são tolerantes a 9% do NaCl. Entretanto, no presente estudo, o tratamento xarope de milho (7%) que apresenta alta concentração de NaCl, não foi eficiente na proliferação da bactéria *B. thuringiensis* subsp. Kurstaki.

Segundo Santos *et al.* (2018), a utilização das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* gera benefícios agrícolas tais como redução dos efeitos negativos da vinhaça, aumento da fertilidade do solo gerando crescimento vegetal.

Ainda, a vinhaça também pode ser utilizada como meio de cultura para Actinobactérias (gênero *Streptomyces* sp.) biorremediadoras de solos contaminados (APARÍCIO *et al.*, 2017), as quais geram remoção de metais pesados de meio à base de vinhaça. Segundo Padilha (1998 apud OLIVEIRA, 2003), tais bactérias são produtoras de enzimas de uso industrial, sendo que algumas enzimas apresentam capacidade de degradar compostos celulolíticos do solo, tornando tais bactérias importantes degradadoras de matéria orgânica e formadoras de húmus.

Meios de cultura contendo glicose, manitol, maltose, sacarose ou glicerol geram maior proliferação da Actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa*, sendo que manitol e glicose proporcionam maior produção da espinosina (moléculas com ação inseticida), produzidas por tal bactéria. O manitol (28%) foi o produto que gerou maior biomassa de tal bactéria, além da maior produção da espinosina (GUOJUN *et al.*, 2016).

Os tratamentos vinhaça e macadâmia, apesar de não diferirem significativamente das testemunhas, geraram populações de bactérias numericamente maiores para 12 das 15 espécies de bactérias. Isso pode ser atribuído as composições orgânicas da macadâmia (sacarose, frutose, glicose, lactose, maltose e amido) e da vinhaça (maiores proporções de glicerol, ácido láctico, etanol, ácido acético, frutose, glicose, sacarose, galactose, acetatos, oxalatos) (USDA, 2019; SILVA, 2012).

O extrato de macadâmia pode ser aplicado como fertilizante orgânico para diversas culturas agrárias e para proliferação de microrganismos edáficos, pois é um fruto rico em nutrientes como fibras, proteínas, gorduras saudáveis, potássio, fósforo, cálcio e magnésio, e vitaminas do complexo B e vitaminas A e E (FERREIRA, 2015; USDA, 2019c).

Bactérias edáficas osmofílicas tolerantes ao açúcar que necessitam de ambiente com baixa Aa (atividade de água), podem se proliferar em meio contendo melaço de cana-de-açúcar. (WHITE JÚNIOR, 1978).

As bactérias edáficas osmofílicas e halotolerantes (tolerantes a sais) se proliferam em meio de cultura contendo xarope de milho (PORTO, 2000; MARCELINO, 2021).

Algumas bactérias são halotolerantes, resistentes a alta concentração de NaCl (substância encontrada em xarope de milho), tais como *Pseudomonas aeruginosa* (9%); *Bacillus atrophaeus* (9%); *Bacillus cereus* (5%); *Lysinibacillus macroides* (3%); *Bacillus thuringiensis* (9%) (SANTOS, 2019).

A vinhaça (resíduo sucroalcooleiro) está sendo utilizada como fertilizante em culturas agrícolas, permitindo o aumento da comunidade biológica do solo em função das altas taxas de matéria orgânica (MARTINS&CAMPOS, 2011).

Vinhaça ao ser utilizada para fertilização em solos agrícolas, diminuindo a utilização de fertilizantes químicos industriais, é considerado como uma excelente fonte de carbono para microrganismos do solo (SANTOS, 2010; PRATA *et al*, 2001 apud SILVA *et al.*, 2012). Entretanto, experimentos realizados em solos fertilizados e não fertilizados com vinhaça apontaram que a vinhaça não estimulou de maneira significativa a proliferação de bactérias rizosféricas dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* da cultura da Cana de açúcar (CAMPOS, 2010).

5.3. Bactérias filamentosas - Actinobactérias – isoladas do solo com resíduos e subprodutos industriais

O objetivo deste experimento foi conseguir isolar bactérias Actinomicetos, no intuito de preservá-las na coleção de bactérias do laboratório de Controle Biológico (IB).

A análise biomolecular foi realizada em 44 bactérias filamentosas Gram+, das quais 27 foram sequencialmente classificadas como Actinobactérias.

Segue abaixo a tabela contendo as bactérias sequenciadas e analisadas taxonomicamente (maiores detalhes analíticos estão apontados no Anexo 8.6).

Tabela 22. Identificação dos isolados usando o primer rRNA 16S, baseadas na análise BLAST do genbank.

Isolado	Espécie	Identidade
1	<i>Streptomyces argenteolus</i>	99.78%
2	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	99.50%
3	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	99.64%
4	<i>Streptomyces platensis</i>	99.64%
5	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	99.71%
6	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	99.64%
7	<i>Streptomyces xanthii</i>	98.85%

8	<i>Streptomyces</i>	99.78%
10	<i>Streptomyces tricolor; S. anthocyanicus; S. violaceoruber</i>	99.93%
11	<i>Streptomyces tricolor; S. anthocyanicus; S. violaceoruber</i>	99.86%
12	<i>Nocardia rhamnosiphila (NBRC 108938)</i>	99.78%
13	<i>Streptomyces hydrogenans; S. sampsonii; S. coelicolor</i>	99.86%
15	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	99.64%
16	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	98.46%
17	<i>Streptomyces bungoensis</i>	99,57%
18	<i>Streptomyces</i>	99.88%
19	<i>Streptomyces praecox; S. pratensis; S. anulatus</i>	99,71%
20	<i>Streptomyces praecox; S. pratensis; S. anulatus</i>	99.78%
22	<i>Streptomyces lannensis</i>	99.71%
24	<i>Streptomyces flavofuscus; S. baarnensis; S. fimicarius; S. caviscabies</i>	99,51%
26	<i>Streptomyces platensis; S. libani; S. glebosus</i>	99.64%
27	<i>Streptomyces flavofuscus; S. baarnensis; S. fimicarius; S. acrimycini; S. caviscabies</i>	99,93%
28	<i>Streptomyces platensis; S. libani; S. glebosus</i>	99.64%
33	<i>Promicromonospora thailandica</i>	98,98%
35	<i>Brevibacterium sediminis; Streptomyces iodinum</i>	99,88%
42	<i>Dietzia timorensis</i>	99,56%
44	<i>Streptomyces bungoensis</i>	99.50%

Dos 44 isolados sequenciados, 27 foram identificados como Actinobactérias:

- Gênero *Streptomyces* spp.– 23 amostras
- Gênero *Nocardia* spp. – 1 amostra
- Gênero *Promicromonospora* spp.– 1 amostra
- Gênero *Brevibacterium* spp. – 1 amostra
- Gênero *Dietzia* spp. – 1 amostra

Das 44 amostras, dez delas serão novamente sequenciadas com primers específicos para determinação das espécies (Amostras 10; 11; 13; 19; 20; 24; 26; 27; 28,35).

Actinobactérias (também conhecidas como Actinomycetos) são bactérias filamentosas Gram+, a maioria aeróbicas, porém algumas microaerofílicas ou anaeróbicas. São pertencentes ao Filo Actinomycetota (também denominado Filo Actinobacteria), formadoras de esporos e micélios, cujas pseudo-hifas são de pequeno diâmetro: 0,5 a 1,0 µm (WOSTEN; WILLEY, 2000). Segundo Kumar & Jadeja (2016) o principal hábitat das Actinobactérias é o solo (embora sejam cosmopolitas).

Como já apontado na Tabela 22, a maioria das bactérias sequenciadas fazem parte do gênero *Streptomyces*. Tal gênero pertencente a maior classe das Actinobactérias (Classe Actinobacteria – 90%, apontado na Figura 1), família Streptomycetaceae, a qual apresenta maior quantidade de espécies (YADAV *et al.*, 2018).

Os gêneros *Nocardia*, *Streptomyces* e *Brevibacterium*, gêneros encontrados nos isolados sequenciados no presente estudo, fazem parte dos mais importantes microrganismos do bioma edáfico. E tais gêneros bacterianos fazem parte de importantes actinobactérias degradadoras de pesticidas, além dos gêneros: *Arthrobacter*, *Clavibacter*; *Corynebacterium*, *Rhodococcus*; *Micromonospora*; *Nocardioides*. (SCHRIJVER & MOT, 1999 apud OLIVEIRA, 2003).

O gênero *Streptomyces* é um dos grupos bacterianos dominantes em solos de superfície (aeróbico), sendo 5 a 20% das bactérias cultiváveis do solo, atuando frequentemente na biodegradação de substâncias e na decomposição de matéria orgânica do solo, bactérias produtoras de Geosmina, responsável pelo odor da terra. (SHARMA, 2005 apud NICOLAU, 2016). *Nocardia* também é um gênero bacteriano decompositor de matéria orgânica.

Membros do gênero *Brevibacterium* também são considerados degradadores de poluentes orgânicos, como fenol e 4-clorofenol (CUI *et al.*, 2013).

Segundo OLIVEIRA (2018) o gênero *Streptomyces* é o maior produtor de antibióticos. Um dos isolados sequenciados no presente trabalho, foi taxonomicamente classificado como *Streptomyces platensis*, produtor do antibiótico Platensimicina (de grande efeito contra bactérias Gram+).

Bactérias do gênero *Promicromonospora* (um dos gêneros isolados e sequenciados no presente trabalho) são resistentes a metais tóxicos, podendo ser utilizadas como microrganismos biorremediadoras de substâncias tóxicas do solo, removedoras do metal tóxico cádmio (96,5%), o que aponta que tal gênero pode ser utilizado como um agente eficaz para remoção de cádmio, provenientes de resíduos poluídos (HAMED *et al.*, 2015).

5.4. Melaço na proliferação de bactérias em cultura líquida

O objetivo de tal procedimento foi analisar a eficiência do melaço para a proliferação de bactérias em alta concentração de oxigênio (aeróbicas) e em baixa concentração de Oxigênio (aeróbicas facultativas ou microaerofílicas).

Segue abaixo os resultados das médias das UFC/mL das 10 bactérias de solos superficiais e 10 bactérias de solos inferiores, plaqueadas em meios de cultura NA e MRS, puros ou contendo Melaço (2%) em diferente concentração de oxigênio.

Os testes bioestatísticos apontaram anormalidade dos resíduos, tanto dos solos superficiais quanto dos solos inferiores. (P-value<0,05). Por isso, foi realizada a análise estatística com escala logarítmica (Tukey95 -log), com o objetivo de obter normalidade.

Tabela 23 – Média das Bactérias cultivadas em meios de cultura puro ou com Melaço (2%)

10 Bactérias de solos superficiais – Alta concentração de O₂	
Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)
NB Puro	34.590.000 a
NB com Melaço (2%)	11.420.000 b
P-value: 0,0224	
10 Bactérias de solos inferiores - Baixa concentração de O₂	
Meio de cultura	Média UFC/mL Tukey95 (Log)
MRS com Melaço (2%)	525.140.000 a
MRS Puro	294.350.000 a
P-value: 0,494	

Solos superficiais - (Shapiro-Test /P-value 9,598e-05)

Solos inferiores - (Shapiro-Test /P-value 3,981e-06)

As bactérias de solos superficiais apresentaram menor proliferação em meio contendo melaço (com diferença significativa na análise estatística).

Entretanto, as bactérias de solos inferiores apresentaram numericamente maior proliferação em meio contendo melaço, embora a análise estatística não tenha apresentado diferença significativa.

No presente estudo a metodologia do experimento realizado com as bactérias de solos inferiores disponibilizou menor concentração de oxigênio atmosférico (devido a vela acesa dentro do pote de vidro). Portanto, tal experimento apontou que o melaço é um substrato que gera maior proliferação bacteriana aeróbica facultativa ou microaerofílica.

As concentrações de oxigênio no solo são variáveis, possibilitando a ocorrência de diferentes ambientes: aeróbicos, microaeróbicos e anaeróbicos. Ambientes aeróbicos apresentam cerca de 20% de oxigênio. Ambientes microaerofílicos apresentam baixa concentração de oxigênio (de 1% a 15%). Já os ambientes anaeróbicos são caracterizados pela ausência do oxigênio: solos alagados em cultivos de arroz, manguezais, ambientes com intensa atividade respiratória dos organismos aeróbios ou solos com alta viscosidade (COTTA In CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

O complexo enzimático nitrogenase, que ocorre na fixação de nitrogênio pelas bactérias diazotróficas, é extremamente sensível à presença de oxigênio. E como a fixação de nitrogênio é um processo estritamente anaeróbico, tal fato gera problema para os microrganismos diazotróficos aeróbicos (sem problemas para as bactérias diazotróficas anaeróbicas ou microaerofílicas). Por esse motivo, o ambiente preferencial da fixação de nitrogênio são as regiões edáficas microaerofílicas (CASSETARI, *et al.* In CARDOSO; ANDREOTE, 2016)

E como o presente experimento confirmou que algumas bactérias aeróbicas facultativas ou microaerofílicas se proliferam melhor com o efeito do melaço, tal substrato pode auxiliar a proliferação e a ação das bactérias diazotróficas anaeróbicas ou microaerofílicas.

Os microrganismos eficientes (EM) fazem parte de um grupo cuja ocorrência é natural nos solos, que podem ser utilizados nas atividades agrárias como microrganismos decompositores fermentadores, os quais produzem importantes substâncias químicas agrárias. Bactérias ácido lácticas, bactérias fotossintéticas e Actinobactérias fazem parte do grupo EM as quais são colocadas num líquido de cultura, onde o melaço é utilizado como moléculas orgânicas. E tal processo de produção do inóculo contendo os microrganismos eficientes (EM) é realizado dentro de garrafas fechadas por 20 dias, e os gases oriundos da fermentação anaeróbica são liberados da garrafa a cada dois dias (GOMES *et al.*, In SOUSA *et al.*, 2021).

6. CONCLUSÕES

Xarope de milho a 70% aplicado no solo pode contribuir para a proliferação de bactérias

Xarope de milho e melão a 7% podem afetar a multiplicação de bactérias em cultivos líquidos, utilizadas como bioinsumos agrários.

Das bactérias isoladas das amostras de solo e sequenciadas, 27 delas foram identificadas como actinobactérias.

Melão a 2% pode contribuir para a proliferação de bactéria em cultivos líquidos com redução de oxigênio e afetar a proliferação em cultivos aerados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTAB, U.; ZECHEL, D. L.; SAJID, I. Antitumor compounds from *Streptomyces* sp. KML-2, isolated from Khewra salt mines, Pakistan. **Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 48-58. 2015. Disponível em: < <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-015-0046-3>> Acesso em: 02 maio 2023.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods of water analysis, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C. 1917 apud BBL Nutrient Agar, Procedimentos de controle de qualidade. **Rev. 10**, L007481, 2014. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4613609/mod_resource/content/1/BBLNutrientAgar.pdf> Acesso em: 14 abr. 2024.

ANDRADE, F. M. C. **Caderno dos Microrganismos Eficientes (E.M.)**. Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Fitotecnia. 3ª Edição, 2020. 31p. Disponível em: < <https://vilavelha.ifes.edu.br/images/stories/biblioteca/sala-verde-virtual/agroecologia-permacultura-e-educacao-alimentar/caderno-dos-microrganismos-eficientes-diagramado.pdf> > Acesso em: 06 maio 2023.

APARICIO, J.D.; BENIMELI, C.S.; ALMEIDA, C.A.; POLTI, M.A.; COLIN, V.L. Integral use of sugarcane vinasse for biomass production of actinobacteria: Potential application in soil remediation. **Chemosphere**. v.181, p.478-484. 2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653517306434?via%3Dihub>> Acesso em: 05 jan.2024

BORDIGNON, A. J.; DELFINO, E. R.; MARTINS, N. M; SILVA, R. F.; BATISTOTE, M. Quantificação da microbiota de solos fertirrigados com vinhaça. **Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934** – v. 6, n. 2, 2012. Disponível em: <https://www.academia.edu/90861293/086_Quantifica%C3%A7%C3%A3o_da_microbiota_de_solos_fertirrigados_com_vinha%C3%A7a> Acesso em: 04 jan. 2024.

BUENO, O. C. (Orgs). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal 6, 2017. 275 p.; Cap. 6. Disponível em: <https://www.canal6.com.br/livros_loja/Ebook_Cana.pdf > Acesso em 08 maio 2023

ÇAKMAKÇI, R. Isolation and applications of beneficial microorganisms associated with tea plants (*Camellia sinensis* L.). In: ÇIĞ, F. *et al.* (ed.) **Bacterial Practices in Agriculture**. Ankara / Turkey: Iksad (2021). p. 3-56. Disponível em: <<https://iksadyayinevi.com/wp-content/uploads/2021/12/BACTERIAL-PRACTICES-IN-AGRICULTURE.pdf>> Acesso em 16 abr. 2023

CAMEOTRA, S; MAKKAR, R. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion In Microbiology*. **Elsevier BV** v. 7, n. 3, p.262-266, jun. 2004. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.006> > Acesso em 16 abr. 2023.

CARDOSO, R.B.; ARAÚJO, F.F. Multiplicação de *Bacillus subtilis* em vinhaça e prevenção no controle da meloidoginose em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v.15, n.12, p. 1283-1288, 2011. Disponível em: < <https://www.scielo.br/pdf/rbeaa/v15n12/a10v15n12>> Acesso em 03 jan. 2024.

CARNEIRO, R. G.; SOUZA, I.; BELARMINO, L. C. Nematicidal activity of *Bacillus* spp. strains on juveniles of *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 22, n.1, p.12-21, 1998. Disponível em:

<https://www.academia.edu/1222635/Nematicidal_Activity_of_Bacillus_spp_Strains_on_Juveniles_of_Meloidogyne_javanica> Acesso em 16 abr. 2023

CARVALHO, I.T. **Microbiologia básica**. EDUFPRPE, 2010. 108 p. Disponível em: <https://pronatec.ifpr.edu.br/wp-content/uploads/2013/06/Microbiologia_Basica.pdf> Acesso em: 27 abr. 2023.

CASSETARI, A.S.; SILVA, M.C.P.; CARDOSO, E.J.B.N. Fixação biológica de Nitrogênio Simbiótica In: CARDOSO, E.J.B.N; ANDREOTE, F.D. (Orgs). **Microbiologia do solo**. Piracicaba SP. ESALQ, 2016. p. 221.; Cap. 8. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf> Acesso em 11 fev. 2024.

CHEN, YP., TSAI, CF., REKHA, P.D. Agricultural management practices influence the soil enzyme activity and bacterial community structure in tea plantations. **Bot Stud** **62**, 8 (2021). Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40529-021-00314-9>> Acesso em 16 abr. 2023

CHRISTOFOLETTI, C.A.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; SOUZA, R.B.; FRANCISCO, A.; GASTALDI, V.D. Emprego de diferentes resíduos utilizados como fertilizantes na cultura de Cana-de-açúcar. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Orgs). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal 6, 2017. 275 p.; Cap. 4. Disponível em: <https://www.canal6.com.br/livros_loja/Ebook_Cana.pdf> Acesso em 08 maio 2023

ÇIĞ, F. *et al.* (ed.) **Bacterial Practices in Agriculture**. Ankara / Turkey: Iksad. 2021. 332 p. Disponível em: <<https://iksadyayinevi.com/wp-content/uploads/2021/12/BACTERIAL-PRACTICES-IN-AGRICULTURE.pdf>> Acesso em 16 abr. 2023

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar -safra 2022/23 terceiro levantamento**. 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> Acesso em: 20 jan. 2023.

COTTA, S.R. O solo como ambiente para a vida microbiana. In: CARDOSO, E.J.B.N; ANDREOTE, F.D. (Orgs). **Microbiologia do solo**. Piracicaba SP. ESALQ, 2016. p. 221.; Cap. 2. Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/biblioteca/sites/default/files/Microbiologia_solo.pdf> Acesso em: 11 fev. 2024.

CUI, Y.; KANG, M.S.; WOO, S.G.; JIN, L.; KIM, K.K.; PARK, J.; LEE, M.; LEE, S.T. *Brevibacterium daeguense* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from a 4-chlorophenol enrichment culture. **Int J. Syst Evol Microbiol.** v.63, p. 152–157, 2013. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.038141-0>> Acesso em 08, fev. 2024.

DALSASSO, R. R. **Produção de Polihidroxibutirato a partir de Vinhaça e Melaço de Cana-de-açúcar por *Cupriavidus necator* DSM 545**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2019. Disponível em:

< <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/211603/PEAL0344-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y> > Acesso em: 06 maio 2023.

DANTAS, F. M. A. L. **Utilização de Melaço de Cana-de-Açúcar em meio alternativo para crescimento de Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas**. João Pessoa: 2020.

TCC (Graduação) – Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Paraíba, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/22936/1/TCC_FERNANDA%20MIKAINY%20ANTAS%20LUNGUINHO%20DANTAS.pdf> Acesso em: 28 jan. 2023.

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. Um meio para o cultivo de lactobacilos. **Jornal de Bacteriologia Aplicada**. v. 23, p.130-135, 1960. Disponível em:

< <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x> > Acesso em: 11 abr. 2024.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas** Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **O Agro no Brasil e no mundo – Um panorama do período de 2000 a 2021**. 2022a. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/documents/10180/26187851/O+agro+no+Brasil+e+no+mundo/098fc6c1-a4b4-7150-fad7-aaa026c94a40> > Acesso em: 20 jan. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **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 > Acesso em 27 jan. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Transplante biológico entre plantas melhora produtividade de lavouras em até 30%**. 2022b.

Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/68567784/transplante-biologico-entre-plantas-melhora-produtividade-de-lavouras-em-ate-30> > Acesso em 28 abr. 2023.

FELTRIN, V. P.; SANT'ANNA E. S.; PORTO, A. C. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Braz. arch. biol. technol.** v.43, n.1, 2000. Disponível em: < <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000100015> > Acesso em: 06 maio 2023.

FERREIRA, C. P. C. **Noz Macadâmia: Extração, Caracterização do Óleo e Estudo da Biomassa Residual como Fertilizante Orgânico**. 2015. Monografia (Licenciatura em Química) - Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo. São Mateus - ES. 2015. Disponível em:

<https://quimica.saomateus.ufes.br/sites/quimica.saomateus.ufes.br/files/field/anexo/noz_macadamia_extracao_caracterizacao_do_oleo_e_estudo_da_biomassa_residual_como_fertilizante_organico_cristiane_pitol.pdf> Acesso em: 06 maio 2023.

FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Orgs). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal 6, 2017. 275 p.; 23 cm.

Disponível em: <https://www.canal6.com.br/livros_loja/Ebook_Cana.pdf> Acesso em 08 maio 2023

GARCIA, J.L.M. **Agricultura biológica: agricultura não tóxica para o século XXI – Técnicas avançadas para o agricultor sustentável** - Manual prático. Juiz de Fora, MG: Editora Garcia, 2022. 110p.

GARCIA, J.L.M. **Compost Tea Ciência ou Religião?** Instituto de Agricultura Biológica, 2019. Disponível em <<https://institutodeagriculturabiologica.org/2019/10/21/compost-tea-2/>> Acesso em: 24/04/2023

GOMES, J.P.A.; SOUZA, M.N.; JUNIOR, A.C.S.; MOULIN, M.M. Uso de microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um referencial teórico, In: SOUSA, C.S.; LIMA, F.S.; SABIONI, S.C. **Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável**. Crossref, Volume 5, Edição 1, 2021. Cap. 29. Disponível em:

<<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/210604968.pdf>> Acesso em: 11 fev. 2024.

GUOJUN Y, YUPING H, YAN J, KAICHUN L, HAIYANG X. A New Medium for Improving Spinosad Production by *Saccharopolyspora spinosa*. **Jundishapur J Microbiol**. v. 9, n.6, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5013548/>> Acesso em: 16 jan. 2024.

GUPTA, R.S.; PATEL, S.; SAINI, N.; 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. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2020 Nov;70(11):5753-5798.

doi:10.1099/ijsem.0.004475. Epub 2020 Oct 27. Erratum in: *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 Dec;70(12):6531-6533. PMID: 33112222. Disponível em:

<<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004475#T9>> Acesso em 02 abr. 2023

HAMEDI, J.; DEHHAGHI, M.; MOHAMMADIPANAH, F. Isolation of Extremely Heavy Metal Resistant Strains of Rare Actinomycetes from High Metal Content Soils in Iran.

International Journal of Environmental Research, v.9, n.2, p.475-480, 2015. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/282207662_Isolation_of_Extremely_Heavy_Metal_Resistant_Strains_of_Rare_Actinomycetes_from_High_Metal_Content_Soils_in_Iran>

Acesso em 8 fev. 2024.

HANDELSMAN, J. Sorting out metagenomes. **Nature biotechnology**, v.23, n.1, jan., p.38-39, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt0105-38>> Acesso em 28 jan. 2023

INGHAM, E.R. **The Compost Tea Brewing Manual**. 5ª Edit. Corvallis - Oregon: Soil Foodweb Incorporated, 2005. 79p. Disponível em:

<<https://forum.lepeuplier.ca/uploads/default/original/1X/f0bada96cecaa70408f5f4b11abeb64b163be032.pdf>> Acesso em: 20 maio 2023.

JESUS, K. R. E. de; TORQUATO, S. A. **Evolução da mecanização da colheita de cana-de-açúcar em São Paulo: uma reflexão a partir de dados do Protocolo Agroambiental**. In: SIMPÓSIO DA CIÊNCIA DO AGRONEGÓCIO, 2., 2014, Porto Alegre. Cadeias globais e suprimento no agronegócio: anais. Porto Alegre: UFRGS, 2014. 5 p. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/126239/1/2014AA77.pdf> > Acesso em: 10 março 2024.

JONATHAN, E. I.; BARKER, K. R.; ABDEL-ALIM, F. F.; VRAIN, T. C.; DICKSON, D. W. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes, and *Pasteuria penetrans*. **Nematropica**, Gainesville, v.30, n.2, p.231-240, 2000. Disponível em: < <file:///C:/Users/Maria%20Elizia/Downloads/admin-231-240.pdf> > Acesso em 16 abr. 2023.

KEMPSTER, V. N.; DAVIES, K. A.; SCOTT, E. S. Chemical and biological induction of resistance to the clover cyst nematode (*Heterodera trifolii*) in white clover (*Trifolium repens*). **Nematology**, Leiden, v. 3, p. 35-43, 2001. Disponível em: < https://brill.com/view/journals/nemy/3/1/article-p35_6.xml > Acesso em: 16 abr. 2023

KUMAR, R. R.; JADEJA, V. J. Isolation of Actinomycetes: A complete approach. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 606-618, 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.062> > Acesso em: 02 maio 2023.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010. Disponível em: < <http://periodicoeletronicos.ufma.br/index.php/ccaatropica/article/view/145/96> > Acesso em 02 abr. 2023.

LE MOS, M. **Macadâmia: 9 benefícios e como consumir**. Grupo REDEDOR. 2023. Disponível em: < <https://www.tuasaude.com/macadamia/> > Acesso em: 06 maio 2023.

MARCELINO, A. **Xarope de milho: para que serve e possíveis malefícios**. Minha Vida/Webedia. 2021. Disponível em: < <https://www.minhavidacom.br/materias/materia-21781> > Acesso em: 04 maio 2023.

MARTINS, M. D.; CAMPOS, D. T. Qualidade Microbiológica do Solo Fertirrigado com Vinhaça. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.9, n.2, p.273 - 282, 2011. Disponível em: < http://www.unemat.br/revistas/rcaa/docs/vol9-2/ARTIGO_9_RCAA_v9n2a2011.pdf > Acesso em 28 jan. 2023.

MARTINS, G.M.; BELLODI, G.D.; SILVA, K.C.; RAMARI, T.O.I.; GASPAROTTO, F. Cultivo de Bactérias Diazotróficas em Vinhaça. **UNICESUMAR**, 2016. Disponível em: < https://www.unicesumar.edu.br/mostra-2016/wp-content/uploads/sites/154/2017/01/guilherme_miglioli_martins_1.pdf > Acesso em: 08 maio 2023.

MELAÇO DE CANA. **Benefícios do Melaço de cana na agricultura**. Saltinho/ SP, 2023. Disponível em: < <https://mellacodecana.com.br/beneficios-do-melaco-de-cana-na->

OLIVEIRA, V. **Sistemas Agro Industriais**. 2011. Disponível em

<<https://docplayer.com.br/15897394-Sistemas-agro-industriais-prof-vanderley-de-oliveira.html>> Acesso em: 20 jan. 2023.

OLIVEIRA, B. G. de; CARVALHO, J. L. N.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Soil greenhouse gas fluxes from vinasse application in Brazilian sugarcane areas. **Geoderma**, Amsterdam, v. 200-201, p. 77-84, 2013. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706113000487>> Acesso em: 07 maio 2023.

OLIVEIRA, R.C. **Potencial antimicrobiano de actinomicetos de solos amazônicos**. 2018.

Dissertação (Mestrado: Programa de Pós-Graduação, Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia – CITA) – Universidade Federal do Acre – Rio Branco/Acre. 2018. Disponível em:

<http://www2.ufac.br/cita/dissertacoes/2018/raimundo-carro-de-oliveira.pdf/@_@download/file/Raimundo%20Carro%20de%20Oliveira.pdf> Acesso em: 17 maio 2023

OMORI, W.P. **Diversidade bacteriana em solos, vinhaça e semicompostagem**

relacionados ao cultivo de cana-de-açúcar. 2014. Dissertação (Mestrado: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias) – Universidade Estadual Paulista /UNESP – Jaboticabal/SP, 2014. Disponível em:

<<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/124083/000830788.pdf;jsessionid=5243088EB56933C7F2A36A9B4128A6FA?sequence=1>> Acesso em: 16 maio 2023.

PORTO, D. M. **Controle de perigos e pontos críticos de natureza biológica no processo de armazenamento de Xarope de Milho**. 2000. Monografia (Graduação em Ciências

Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia-MG, 2000. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/25882/1/ControlePerigosPontos.pdf>> Acesso em: 06 maio 2023.

PRADO, R. M.; CAIONE, G.; CAMPOS, C. N. S. Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2013, 2013. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/581984>> Acesso em 02 abr. 2023

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. de. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de Bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160 p. ISBN 978-85-67506-04-3. Disponível em: <

<<http://www.fiocruz.br/ioc/media/Coletanea%20de%20Procedimentos%20Tecnicos%20para%20Bacillus.PDF>> Acesso em: 27/01/2023

REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO - (RIFIB), 5, 2001, Sertãozinho, SP. **Anais da V Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico – Cana-de-açúcar**: José Eduardo M. de Almeida, Amaury da S. dos Santos, Antônio Batista Filho, Elitamara Morsolotto Santos e Maria Aparecida Vicente Cano, 2001. 62p. Disponível em:

<<http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/files/rifib/V%20RIFIB%20anais.PDF>> Acesso em: 18 jan.2019

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999. Disponível em:

< https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/7703428/mod_resource/content/1/Artigo%20-%20extra%C3%A7%C3%A3o%20de%20DNA%20de%20plantas.pdf > Acesso em: 13 abr. 2024.

RUIU, L.; SATTI, A.; FLORIS, I. Emerging entomopathogenic bacteria for insect pest management. **Bulletin of Insectology**, Italy, v. 66, n. 2, p. 181-186, 2013.

Disponível em: < <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol66-2013-181-186ruiu.pdf> > Acesso 27 jan. 2023

SAAD, L.P.; IWASAKI, M.T.; SILVA, N.S.; SOUZA-CAMPANA, D.R.; BUENO, O.C.; MORIN, M.S.C. Diversidade da Fauna Edáfica em cultivos de Cana-de-açúcar. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Orgs). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal 6, 2017. 275 p.; Cap.7.

Disponível em: <https://www.canal6.com.br/livros_loja/Ebook_Cana.pdf > Acesso em 08 maio 2023

SALA, V. M. R.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas Não-leguminosas. In: SILVEIRA, A. P. D; FREITAS, S. S. (ed.).

Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônomo. Cap. 6, p. 97-115, 2007. Disponível em: < <https://pt.scribd.com/document/94256856/Livro-Microbiota-Do-Solo-e-Qualidade-Ambiental#> > Acesso em: 29 abr. 2023.

SANTOS, R. M.; KANDASAMY, S.; RIGOBELLO, E. C. Sugarcane growth and nutrition levels are differentially affected by the application of PGPR and cane waste. **Microbiology Open**, v. 7, n. 6, p. 617, 2018. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6291826/> > Acesso em: 13 jan. 2024.

SANTOS, E.C.L dos. **Perfil biotecnológico de microrganismos tolerantes a metais potencialmente tóxicos, capazes de promover crescimento vegetal e remediar resíduos agroindustriais**. 2019. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2019. Disponível em: <

<https://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/6646/1/Perfil%20biotecnol%C3%B3gico%20de%20microrganismos%20tolerantes%20a%20metais%20potencialmente%20t%C3%B3xicos%20capazes%20de%20promover%20crescimento%20vegetal%20e%20remediar%20res%C3%ADduos%20agroindustriais.pdf> > Acesso em: 29 jan. 2024.

SÃO PAULO (Estado). Lei n. 11.241, de 19 de setembro de 2002. **Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas**. Diário Oficial do Estado, 20 set. 2002. Disponível em:

<<http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2002/lei-11241-19.09.2002.html>>. Acesso em: 15 mai. 2020.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v354, p.311-313, 2006. Disponível em:

< <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.014> > Acesso em: 13 abr. 2024.

SCHNEIDER, L.M.; ROLIM, G.S.; SOBIERAJSKI, G.R.; PRELA-PANTANO, A.; PERDONÁ, M.J. Zoneamento agroclimático de noqueira-macadâmia para o Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, nº 2, p. 515–524, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbf/a/fvGhV7yBhcPG5K9HW6NjMcz/?format=pdf&lang=pt>> Acesso em: 06 maio 2023.

SIAMIG – **Perfil da Produção - Cana-de-açúcar**. 2021. Disponível em: <<http://www.siamig.com.br/uploads/26acb81e2531eb24c99d163a20ee83c6.pdf>> Acesso em 29 jan.2013

SILVA, L.C.B. **Identificação de Actinobactérias e *Thermoactinomyces* spp. isolados no processo de compostagem para a produção de *Agaricus brasiliensis***. 2010. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/1520/1/DISSERTA%20c3%87%20c3%83O%20Identifica%20c3%a7%20c3%a3o%20de%20actinobact%20c3%a9rias%20e%20Thermoactinomyces%20sp.p.%20isolados%20do%20processo%20de%20compostagem%20para%20a%20produ%20c3%a7%20c3%a3o%20de%20Agaricus%20brasiliensis.pdf>> Acesso em: 20 maio 2023.

SILVA, A.N.; SILVA, A.P.; BATISTA, S.B.; HARDOIM, E.L. Análise quali-quantitativa de bactérias com atividades enzimáticas celulolíticas e proteolíticas isoladas de solo adicionado de vinhaça. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 12, n. 1, 2012. Disponível em: <http://joaootavio.com.br/bioterra/workspace/uploads/artigos/artigo_flavio_bioterra_v12_n1-51832d348f402.pdf> Acesso em: 06 fev. 2024.

SILVA, Alinne da. **Vinhaça concentrada de cana-de-açúcar: monitoramento das propriedades químicas do solo e mineralização líquida de nitrogênio**. 2012. Tese (Doutorado)- Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012. Disponível em: <<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64134/tde-26092012-152806/publico/Alinnedasilva.pdf>> Acesso em: 15 jan. 2024.

SILVA, M.; GASPAROTTO, F.; LUSTRI, B.; VASQUES, N.; YAMAGUSHI, N. Cultivation of *Azospirillum brasilense* in Vinasse and Potential Use in Fertigation. **Journal of Agricultural Studies**, v. 8, n. 4, p. 726-734, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.5296/jas.v8i4.17862>>. Acesso em 03 jan. 2024.

SILVA, P. C.; COSTA, R. A.; GIONGO, P. R.; MORAES, M. H.; LANA, R. M. Q. Aplicação de doses de vinhaça sob desenvolvimento vegetativo de pastagem degradada e propriedades físicas do solo. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n.17, p. 233- 246, 2013. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/CIENCIAS%20AGRARIAS/APLICACAO%20DE%20DOSES.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2019

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia: methods in legume Rhizobium thecnology**. Paia: Niftal Project, 1984. 450p. Disponível em: <<https://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/Downloads/Training/Rhizobium%20technology/Title%20Page.PDF>> Acesso em: 12 abr. 2024

SOTO, M.A.; BASSO, J.B.; KIANG, C.H. Impacto da Fertirrigação da Cana-de-açúcar por Vinhaça nas propriedades físicas, químicas e hidráulicas do solo. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Orgs). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal 6, 2017. 275 p.; Cap. 6.

Disponível em: <https://www.canal6.com.br/livros_loja/Ebook_Cana.pdf > Acesso em 08 maio 2023

SOUZA, R.B.; MOREIRA-DE-SOUSA, C.; CHRISTOFOLETTI, C.A.; SOUZA, C.P.; FONTANETTI, C.A. Impacto de Resíduos (Vinhaça e Biossólido) lançados no cultivo de Cana-de-açúcar em representantes da Fauna Edáfica. In: FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. (Orgs). **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**. Bauru, SP: Canal 6, 2017. 275 p.; Cap. 10.

Disponível em: <https://www.canal6.com.br/livros_loja/Ebook_Cana.pdf > Acesso em 08 maio 2023.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, November 11, p. 4673 - 4680, 1994. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/pdf/nar00046-0131.pdf> > Acesso em: 13 abr. 2024.

USDA. **Melaço**. Departamento de Agricultura dos EUA. 2019a. Disponível em:

< <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168820/nutrients> > Acesso em: 03 maio 2023.

USDA, **Xaropes, milho, escuro**. Departamento de Agricultura dos EUA. 2019b. Disponível em: < <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168836/nutrients> > Acesso em: 04 maio 2023.

USDA, **Nozes, nozes de macadâmia, cruas**. Departamento de Agricultura dos EUA. 2019c. Disponível em: < <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170178/nutrients> > Acesso em: 06 maio 2023.

VELAZCO, M. **Como preparar tea de composta**. Community Food Bank of Southern Arizona. YouTube, 3 de dez. de 2020. Disponível em:

<<https://www.google.com/search?q=Como+preparar+o+Compost+tea&oq=Como+preparar+o+Compost+tea&aqs=chrome..69i57j0i546.14098j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8#fpstate=ive&vld=cid:438cf108,vid:OxWm4on9uXE>> Acesso em: 21 maio 2023.

VILLAVICENCIO, A.R.N.; SANT ANNA, E.S.; TÔRRES, R.C.O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em Melaço de Cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, 1999. Disponível em:

< <https://www.scielo.br/j/babt/a/GX9FDktq77yXcQQywZnrSZQ/#> > Acesso em: 18 jan. 2024.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 20p. (IBP Handbook, 15).

VUKOVIĆ, A.P.D.; MOJOVIĆ, V.L.; SEMENČENKO, V.V.; RADOSAVLJEVIC, M.M.; PEJIN, D.J.; KOCIC-TANACKOV, S.D. Valorização efetiva da vinhaça de destilaria através de integração produção de ácido láctico e rações de alta qualidade. **Comida Pesquisa Internacional**, v.73, p.75-80, 2015. Disponível em:

<<http://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.048>> Acesso em: 04 jan. 2024.

WANG, M., SUN, H., XU, L., XU, Z. Bacterial diversity in tea plant (*Camellia sinensis*) rhizosphere soil from Qinling Mountains and its relationship with environmental elements. **Plant and Soil**, 460: 403-415, 2021. Disponível em:

<<https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-020-04822-8>> Acesso em: 16 abr. 2023

WHITE JUNIOR, J.W. **Advances in Food Research**, v. 22, p. 287-374, 1978. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60160-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60160-3) > Acesso em: 05 maio 2023

WÖSTEN, H.A.B.; WILLEY, J.M. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. **Microbiology**, v.146, n. 4, 2000. Disponível em:

<<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/146/4/1460767a.pdf?expires=1684457240&id=id&acname=guest&checksum=7448E8546BAE86DCBB178DCE61470804>> Acesso em: 21 mai. 2023.

YADAV, A.N.; VERMA, P.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; KUMAR, M.; KUMARI, S.; THANKAPPAN, C.; SINGH, B.P.; SAXENA, A.K.; DHALIWAL, H.S. Actinobacteria from Rhizosphere: Molecular Diversity, Distributions, and Potential Biotechnological Applications. **Elsevier**, p.13-41, 2018. Disponível em:

< <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63994-3.00002-3>> Acesso em: 18 mai. 2023.

ZHAO, X.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Antifungal Effects of Lipopeptide Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, Tianjin, v. 8, n. 9, p.295-310, 19 set. 2017. 10.4236/abb.2017.89022. Disponível em:

<http://www.scirp.org/pdf/ABB_2017091815014444.pdf> Acesso em: 2 abr. 2023

8. ANEXOS

8.1. Coloração de Gram

- Colocar 1 gota de água autoclavada na lâmina e em seguida parte da colônia bacteriana
- Secar a lâmina na temperatura ambiente e em seguida passá-la na chama, para fixá-la na lâmina
- Quando a lâmina estiver seca, cobrir com o corante cristal violeta (cerca de 6 gotas) e deixar agir por cerca de 60 segundos
- Lavar a lâmina com um filete de água corrente e em seguida cobrir a lâmina com o lugol (que tem como objetivo fixar o corante Violeta de Genciana) e deixar agir por 60 segundos.
- Em seguida, lavar a lâmina com água corrente
- Aplicar álcool a 95%, deixando agir por 30 segundos. O álcool é responsável por dissolver a membrana de lipídios formadora das bactérias gram-negativas e, como a camada de peptidoglicano é fina, há a remoção do complexo formado entre o corante Violeta de genciana e o lugol, descolorindo a bactéria. No entanto, no caso das bactérias gram-positivas, o álcool desidrata a parede celular, e como a camada de peptidoglicano é grossa, ocorre contração dos poros e a impermeabilização, impedindo a descoloração.
- Lavar novamente em água corrente e cobrir a lâmina com o segundo corante, a fucsina ou safranina e deixar agir por 60 segundos;
- Em seguida, deve-se lavar a lâmina com água corrente e deixar secar à temperatura ambiente ou passar um pedaço de papel toalha (autoclavado)
- Fazer a observação microscópica (100x) com uma gota de óleo de imersão
- Bactérias com coloração roxa – Gram+
- Bactérias com coloração rosada – Gram-

8.2. Meio de Cultura ACA (Ágar Amido Caseína)

1. Amido – 10g
2. Caseína – 0,3g
3. Nitrato de Potássio – 2,0g
4. NaCl – 2,0g
5. Fosfato de Potássio Dibásico – 2,0g
6. Sulfato de Magnésio – 0,05g
7. Sulfato Ferroso (ou Sulfeto Ferroso) – 0,01g
8. Ágar – 18g

8.3. Meios de Cultura YMA

▪ YMA

1. K_2HPO_4 - 0,5 g
2. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 g
3. NaCl - 0,1 g
4. Manitol - 5,0 a 10 g
5. Extrato de levedura - 0,4 g
6. Ágar-ágar - 10,0 a 15,0 g
7. Água destilada - 1000 mL
8. Azul de Bromotimol (0,5 % em 0,2 N de KOH) - 5 mL

▪ **YMA com Vermelho Congo (meio 79)**

1. K_2HPO_4 - 0,5 g
2. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 g
3. NaCl - 0,1 g
4. Manitol - 5,0 a 10 g
5. Extrato de levedura - 0,4 g
6. Ágar-ágar - 10,0 a 15,0 g
7. Água destilada - 1000 mL
8. Solução de Vermelho Congo - 10 mL
(0,25g de vermelho Congo em 100 mL de água destilada)

8.4. Meio de Cultura MRS

1. Peptona - 10 g
2. Extrato de carne bovina – 10 g
3. Extrato de levedura – 5 g
4. 2,0 % de glicose – 20 g
5. Acetato de sódio tri-hidratado – 5 g
6. Polissorbato 80 (também conhecido como Tween 80) – 1 g
7. Fosfato Dipotassium – 2 g
8. Citrato de triamônio – 2 g
9. Sulfato de magnésio hepta-hidratado – 0,2 g
10. Sulfato de manganês tetra-hidratado – 0,05 g
11. Ágar – 15 g
(pH ajustado para 6,2 a 25 ° C)

8.5. Meio de Cultura NFB

Solução A (micronutrientes)

1. $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ - 0,2 g
2. $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0,235 g
3. H_3BO_3 - 0,28 g
4. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ - 0,008 g
5. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,024 g
6. Água destilada - 200 ml

Solução B (vitaminas)

1. Biotina - 10 mg
2. Piridoxina - 20 mg
3. Água destilada - 100 ml

Componentes

1. Ácido Málico - 5,0 g
2. K_2HPO_4 -0,5 g
3. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2 g
4. NaCl - 0,1 g
5. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,2 g
6. Solução B (vitaminas) - 1 ml
7. Solução A (micronutrientes) - 2ml
8. Fe EDTA Solução 1,64% - 4ml
9. Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH) - 2ml
10. Água destilada - 1.000 ml

11. Ágar - 15 a 18 g (meio sólido) / 1,7 a 1,8 g (meio semi-sólido)

- Ajustar pH = 6,8 (ajustar com \pm 4,0g de KOH).
- Para meio sólido adicionar 200 mg (0,2g) de extrato de levedura.

8.6. Procedimentos da análise molecular das bactérias filamentosas

➤ Análise molecular

Todos os procedimentos e etapas da análise molecular foram realizadas em parceria com o instituto biológico de São Paulo, no laboratório biomolecular.

Todos os isolados que foram separados e purificados passaram pelo sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s.

➤ Extração de DNA

A extração do DNA genômico seguiu o protocolo pelo método do CTAB (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). O material bacteriano isolado nas placas foi retirado com o auxílio de alça e depositado em micro tubos de 1,5 mL contendo 100 μ L de CTAB para serem macerados com pistilo previamente autoclavado, após a maceração do material foi adicionado 500 μ L de CTAB e 10 μ L de proteinase K, homogeneizado e incubado a 65° C em Banho seco sob agitação por 2h. Logo foi adicionado 600 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), agitado em vórtex por alguns segundos e centrifugado a 12.000 r.p.m. por 10 min. Nessa etapa é perceptível a formação de duas fases, onde foi coletado 500 μ L de sobrenadante e condicionado num novo micro tubo, sendo adicionado 300 μ L de isopropanol que posteriormente foi centrifugado a 12.000 r.p.m. por 10 min. A seguir foi descartado todo o conteúdo do micro tubo, só observando de não jogar fora o pellet de coloração branca. O pellet foi lavado com 500 μ L de etanol 70% e centrifugado a 12.000 r.p.m. por 5 min e seguidamente foi descartado o excesso de etanol. O micro tubo foi colocado na estufa 37°C por 30m para ficar totalmente seco e prontamente foi adicionado 50 μ L de H₂O ultrapura e acondicionados em freezer a -20° C.

Após a extração a quantificação do DNA bacteriano foi medida utilizando o equipamento nanodrop, logo as amostras foram padronizadas para uma concentração de 100ng/ μ L.

➤ Amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s

Foi utilizada a técnica Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para amplificação do gene RNA ribossomal 16S, utilizando os primers homólogos às suas extremidades conservadas e são descritos na Tabela abaixo.

Tabela - Sequência dos primers utilizados na reação de amplificação e sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S

Primer	Sequência	Referência
fD1	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCA G- 3'	WEISBUR <i>et al.</i> , 1991
rP1	5'- ACGGTTACCTTGTTACGAC TT- 3'	WEISBUR <i>et al.</i> , 1991

Fonte: Autor

As reações individuais foram compostas por água ultrapura (8,2µL), Mastermix sybr green (10,0 µL), Primer fD1e rP1 (0,4 µL) respectivamente e DNA proveniente da extração (5 µL). Posteriormente, as reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 1 ciclo de 2 minutos a 94°C, 40 ciclos consistindo em 94°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minutos e 30 segundos, 1 ciclo a 72°C por 4 minutos. Para conferir a amplificação do DNA, as amostras foram visualizadas em gel de agarose 1,5% no transluminador uv.

Os produtos amplificados foram purificados por precipitação com PEG 6000 (SCHMITZ; RIESNER, 2006) e sequenciados empregando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) e o sequenciador capilar 3500 µL (Applied Biosystems).

➤ **Análise das Sequências Nucleotídicas do gene RNA ribossomal 16s**

Para a montagem dos contigs, as sequências resultantes foram processadas no programa Bioedit versão 7.2 Windows (HALL,198), sendo comparadas com linhagens tipo no banco de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências do banco de dados que resultaram em similaridade igual ou acima de 98,50% com a sequência analisada foram alinhadas no programa CLUSTAL W, pacote do programa Bioedit.

➤ **Amplificação e sequenciamento com a utilização de primers específicos**

Será realizado um segundo sequenciamento utilizando primers específicos nas amostras que não conseguiram ser identificadas pelos RNA ribossomal 16S. A metodologia seguirá a mesma descrita em “Amplificação e Sequenciamento do gene RNA ribossomal 16s”, se diferenciando apenas nos primers utilizados, descritos na Tabela abaixo sendo selecionados de acordo com o gênero identificado anteriormente com o sequenciamento do gene rRNA 16s.

➤ **Resultados**

Tabela. Identificação dos 44 isolados usando o primer rRNA 16S, baseadas na análise BLAST do genbank.

Isolado	Espécie	Tamanho do fragmento (PB)	Identidade	Nº Acesso Genbank
1	<i>Streptomyces argenteolus</i>	1370	99.78%	EU048540.1
2	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	1390	99.50%	NR_041186.1
3	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	1379	99.64%	MT760608.1
4	<i>Streptomyces platensis</i>	1398	99.64%	CP023691.1
5	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	1384	99.71%	NR_116093.1
6	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	1382	99.64%	NR_116093.1
7	<i>Streptomyces xanthii</i>	1384	98.85%	CP061281.1
8	<i>Streptomyces</i>	905	99.78%	Só R. igual % com 3 espécies
9	Erro no sequenciamento Pode ter Actino + Paenibacillus			
10	<i>Streptomyces tricolor</i> <i>S. anthocyanicus</i> <i>S. violaceoruber</i>	1392	99.93%	igual % com 3 espécies
11	<i>Streptomyces tricolor</i> <i>S. anthocyanicus</i> <i>S. violaceoruber</i>	1391	99.86%	igual % com 3 espécies
12	<i>Nocardia rhamnosiphila</i> (NBRC 108938)	1374	99.78%	NR_116015.1
13	<i>Streptomyces hydrogenans</i> <i>S. sampsonii</i> , <i>S. coelicolor</i>	1398	99.86%	igual % com 3 espécies
14	<i>Bacillus safensis</i> <i>Bacillus australimaris</i>	1408	99.43%	Fazer primer GYRB
15	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	1385	99.64%	MT760608.1
16	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	712	98.46%	MT760608.1
17	<i>Streptomyces bungoensis</i>	1388	99,57%	NR_041191.1
18	<i>Streptomyces</i>	843	99.88%	várias espécies
19	<i>Streptomyces praecox</i> , <i>S. pratensis</i> <i>S. anulatus</i>	1377	99,71%	várias espécies
20	<i>Streptomyces praecox</i> <i>S. pratensis</i> <i>S. anulatus</i>	1377	99.78%	várias espécies
21	Contaminada			
22	<i>Streptomyces lannensis</i>	1383	99.71%	NR_113181.1
23	Erro no sequenciamento			
24	<i>Streptomyces flavofuscus</i> <i>S. baarnensis</i> , <i>S. fimicarius</i> <i>S. caviscabies</i>	1425	99,51%	várias espécies
25	Erro no sequenciamento			

26	<i>Streptomyces platenses</i> <i>S. libani</i> <i>S. glebosus</i>	1130	99,64%	várias espécies
27	<i>Streptomyces flavofuscus</i> , <i>S. baarnensis</i> , <i>S. fimicarius</i> <i>S. acrimycini</i> <i>S. caviscabies</i>	1377	99,93%	várias espécies
28	<i>Streptomyces platenses</i> <i>S. libani</i> , <i>S. glebosus</i>	1390	99,64%	várias espécies
29	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>B. mobilis</i> <i>B. paramobilis</i> <i>B. toyonensis</i>	1405	98,93%	várias espécies
30	Contaminada			
31	<i>Enterobacter kobei</i> <i>Leclercia adecarboxylata</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i>	1387	99,21%	várias espécies
32	Contaminada			
33	<i>Promicromonospora thailandica</i>	1381	98,98%	<u>NR 113177.1</u>
34	Contaminada			
35	<i>Brevibacterium sediminis</i> <i>Streptomyces iodinum</i>	880	99,88%	várias espécies
36	<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1175	99,91%	várias espécies
37	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1420	99,58%	<u>AP008934.1</u>
38	Erro no sequenciamento			
39	<i>Staphylococcus succinus</i>	722 só R	99,45%	<u>MF678913.1</u>
40	<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1411	99,79%	várias espécies
41	<i>Vagococcus fluvialis</i>	1351	99,41%	<u>NR 026489.1</u>
42	<i>Dietzia timorensis</i>	1360	99,56%	CP015961.1
43	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1410	99,22%	<u>AP008934.1</u>
44	<i>Streptomyces bungoensis</i>	1394	99,50%	<u>NR 041191.1</u>