

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE ISOLADOS
BACTERIANOS DO SOLO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL
DO GENE 16S rRNA E INFERÊNCIA DE SEU POTENCIAL
AGROBIOTECNOLÓGICO**

THÉO TIZZIOTO VIANA

Orientador(a): Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal - SP

1º semestre 2026

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DE ISOLADOS
BACTERIANOS DO SOLO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL
DO GENE 16S rRNA E INFERÊNCIA DE SEU POTENCIAL
AGROBIOTECNOLÓGICO**

THÉO TIZZIOTO VIANA

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal, SP 1º Semestre/2026

AUTOR

Théo Tizzioto Viana

TÍTULO DO TRABALHO ACADÊMICO

Caracterização filogenética de isolados bacterianos do solo por sequenciamento do gene 16S rRNA e inferência do potencial agrobiotecnológico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

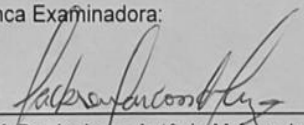
Área de Concentração: Microbiologia Agropecuária

Data da defesa: 26/06/2026

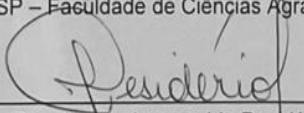
(x) Aprovado

() Reprovado

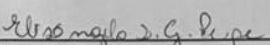
Banca Examinadora:


Prof. Dr. Jackson Antônio Marcondes de Souza

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

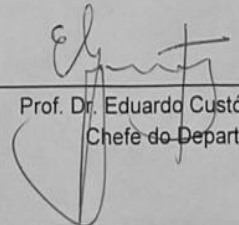

Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal


Dra. Elisângela Soares Gomes Pepe

Pós-Doutoranda do Laboratório LBMP – UNESP/FCAV

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 08/07/2026


Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino
Chefe do Departamento

V614c

Viana, Théo Tizzio

Caracterização filogenética de isolados bacterianos do solo por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e avaliação de seu potencial agrobiotecnológico / Théo Tizzio Viana. -- Jaboticabal, 2026

30 p. : tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Jackson Antônio Marcondes Souza

1. Agricultura sustentável. 2. Filogenia. 3. Bacteriologia do solo. 4. Diversidade genética. 5. Bioinsumos agrícolas. I. Título.

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, principalmente à minha mãe, que sempre me deu todo o apoio necessário para enfrentar não só os desafios da graduação, mas também todos os desafios impostos pela vida. Nos momentos mais difíceis, sempre fez tudo aquilo que era possível para me motivar e me manter no caminho correto a ser trilhado, dando-me forças para continuar.

À minha namorada, que esteve comigo durante grande parte deste trajeto e sempre fez o possível e o impossível para me manter alegre e otimista, mesmo nas horas que pareciam impossíveis. Agradeço imensamente por estar ao meu lado para ouvir minhas lamentações e sempre me confortar quando as coisas pareciam desmoronar ao meu redor.

Aos meus grandes amigos, os quais considero irmãos que a vida me deu, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, alegrando meus dias mais tristes, mostrando-me novas perspectivas e não deixando que eu me esquecesse da pessoa que sou, acima de qualquer problema.

Aos amigos que fiz durante minha trajetória na faculdade, que se tornaram um porto seguro para mim e sempre se mostraram pessoas incríveis, que não soltaram minha mão e sempre se propuseram a ajudar. Agradeço pelas companhias durante as refeições, aulas e palestras, e agradeço pelas longas conversas que tivemos. Vocês irão ficar para sempre no meu coração.

Ao meu orientador, que sempre esteve ao meu lado, dispondo-se a me ajudar de todas as formas, sempre me tratando com muito respeito e confiança. Agradeço por acreditar em mim e por me orientar e apoiar durante todo esse período.

Ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, pela parceria e pelo apoio durante todo esse tempo.

Agradeço ao João Victor dos Anjos Almeida pelo suporte e pela colaboração nas etapas de bioinformática do meu trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Geral.....	10
2.2 Específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Isolados bacterianos de solo agricultável.....	11
3.2 Cultivo bacteriano, extração de DNA e amplificação do gene 16S rRNA.....	12
3.3 Sequenciamento dos amplicons 16S rRNA	13
3.4 Análises das assinaturas moleculares dos isolados bacterianos através de bioinformática.....	14
3.5 Estoque de laboratório.....	15
3.6. Isolados comerciais.....	15
3.7. Construção e elaboração do dendrograma.....	16
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÃO.....	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

RESUMO

Frente aos desafios da agricultura global, as práticas agrícolas tradicionais baseadas em fertilizantes químicos e pesticidas têm se mostrado inviáveis a longo prazo devido aos impactos ambientais irreversíveis, tornando indispensável a adoção de alternativas sustentáveis. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar filogeneticamente isolados bacterianos de solo agrícola por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, avaliando seu potencial de aplicação como bioinsumos. Para isso, foram selecionados 11 isolados bacterianos provenientes de solos de diferentes culturas, os quais foram cultivados e submetidos à extração de DNA para amplificação e sequenciamento do referido gene. As análises das assinaturas moleculares foram realizadas por ferramentas de bioinformática, permitindo a construção de um dendrograma filogenético que integrou as sequências obtidas, 6 isolados do estoque do Laboratório de Genética Bacteriana e Biologia Aplicada (LGBBA), 12 linhagens comerciais predefinidas e sequências complementares de organismos relacionados. Os resultados revelaram proximidades filogenéticas consistentes entre os isolados do estudo e as cepas comerciais. O clado pertencente à ordem Caryophanales representou o agrupamento mais complexo da árvore, reunindo de forma robusta os isolados BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4, BioAdd 5 e V05_13, que compartilharam o mesmo nó com as linhagens comerciais *Bacillus mojavensis* MVY-007, *Bacillus amyloliquefaciens* MVY-008, *Bacillus aryabhatai* MVY-004 e *Bacillus megaterium*. Conclui-se que a proximidade evolutiva observada consolida a abordagem filogenética como uma ferramenta biotecnológica eficaz para a triagem e identificação de potenciais bioinsumos agrícolas. Esse mapeamento abre perspectivas promissoras para a realização de futuros ensaios in vitro e in vivo voltados à confirmação das atividades de promoção de crescimento vegetal, solubilização de fosfato, produção de fitormônios e biocontrole.

Palavras-chave: Agricultura sustentável; Filogenia; Bacteriologia do solo; Diversidade genética; Bioinsumos agrícolas.

ABSTRACT

Faced with the challenges of global agriculture, traditional farming practices based on chemical fertilizers and pesticides have proven unviable in the long term due to irreversible environmental impacts, making the adoption of sustainable alternatives indispensable. This study aimed to phylogenetically characterize bacterial isolates from agricultural soil through 16S rRNA gene sequencing and evaluate their potential application as agricultural bioinputs. To this end, 11 bacterial isolates from soils of different crops were selected, cultivated, and subjected to DNA extraction for the amplification and sequencing of the target gene. Molecular signature analyses were performed using bioinformatics tools to construct a phylogenetic dendrogram integrating the obtained sequences, 6 isolates from the Laboratory of Bacterial Genetics and Applied Biology (LGBBA) stock, and 12 predefined commercial strains. The results revealed consistent phylogenetic proximities between the study isolates and commercial strains. The clade belonging to the order Caryophanales represented the largest and most complex cluster in the tree, robustly grouping the isolates BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4, BioAdd 5, and V05_13, which shared the same node with the commercial strains *Bacillus mojavensis* MVY-007, *Bacillus amyloliquefaciens* MVY-008, *Bacillus aryabhattai* MVY-004, and *Bacillus megaterium*. It is concluded that the observed evolutionary proximity consolidates the phylogenetic approach as an effective biotechnological tool for screening and identifying potential agricultural bioinputs. This mapping opens promising prospects for future vitro and vivo assays to confirm plant growth-promoting activities, phosphate solubilization, phytohormone production, and biocontrol.

Keywords: Sustainable agriculture; Phylogeny; Soil bacteriology; Genetic diversity; Agricultural bioinputs.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura global se vê à frente de um enorme problema. O rápido crescimento populacional e o aumento da poluição ambiental têm um impacto severo na produção global de alimentos (MUSHTAQ, 2021). Demanda-se um aumento de cerca de 50% na produtividade agrícola até o ano de 2050 (FLORENCIO et al., 2022). Além disso, as práticas agrícolas tradicionais dependem fortemente de fertilizantes químicos e pesticidas para aumentar a produtividade das culturas (SINGH et al., 2026).

No contexto da agricultura brasileira, por o país se destacar como um dos maiores produtores de alimentos do mundo acaba se tornando também um dos maiores consumidores de fertilizantes químicos. Esse alto consumo de insumos agrícolas é impulsionado por características tropicais, tais como: solos com fertilidade natural predominantemente baixa, intensa pressão de pragas e longo período agrícola, com possibilidade de colheita de até três safras por ano sem irrigação (VAZ et al., 2025).

Contudo, mesmo que esses insumos químicos apresentem resultados diretos no aumento da produção, eles são inviáveis a longo prazo, especialmente quando utilizados de forma descontrolada. Fertilizantes fosfatados e nitrogenados têm gerado problemas relacionados à lixiviação, como a eutrofização de rios e lagos (FLORENCIO et al., 2022). O problema não reside apenas na aplicação desses fertilizantes, mas também em seu processo de produção em larga escala, que gera impactos significativos para o meio ambiente.

Dessa maneira, torna-se indispensável a adoção de práticas agrícolas sustentáveis a longo prazo. Para isso, o governo brasileiro tem se empenhado em expandir e fortalecer a produção e o uso de bioinsumos no controle de pragas e na nutrição de plantas (Fig. 1) (VAZ et al., 2025).

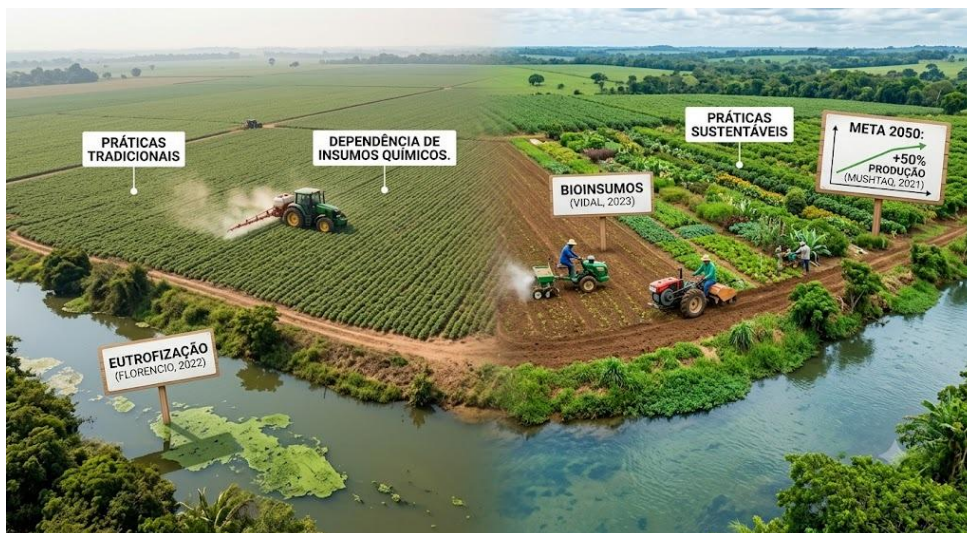


Figura 1 – Práticas Agrícolas

Fonte: gerado através da IA Gemini pelo próprio autor.

Considera-se bioinsumo o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfira positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais (VIDAL, 2023).

Bactérias não patogênicas do solo, com capacidade de antagonizar fitopatógenos fúngicos e, assim, promover o crescimento vegetal, representam uma alternativa atraente para substituir os agroquímicos (BAKTHAVATCHALU et al., 2012). As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) são um grupo benéfico de microrganismos da rizosfera que podem aumentar o crescimento das plantas por meio de vários processos, como a absorção de nutrientes, a síntese de sideróforos, a síntese de fito-hormônios, a fixação de N, a solubilização de fósforo insolúvel, a introdução de genes de tolerância sistêmica, a síntese de ACC deaminase e a produção de diversos compostos orgânicos voláteis (COVs) (RIAZ et al., 2021). As bactérias do grupo dos rizóbios (Fig. 2) (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*) são as mais reportadas na literatura (FLORENCIO et al., 2022).

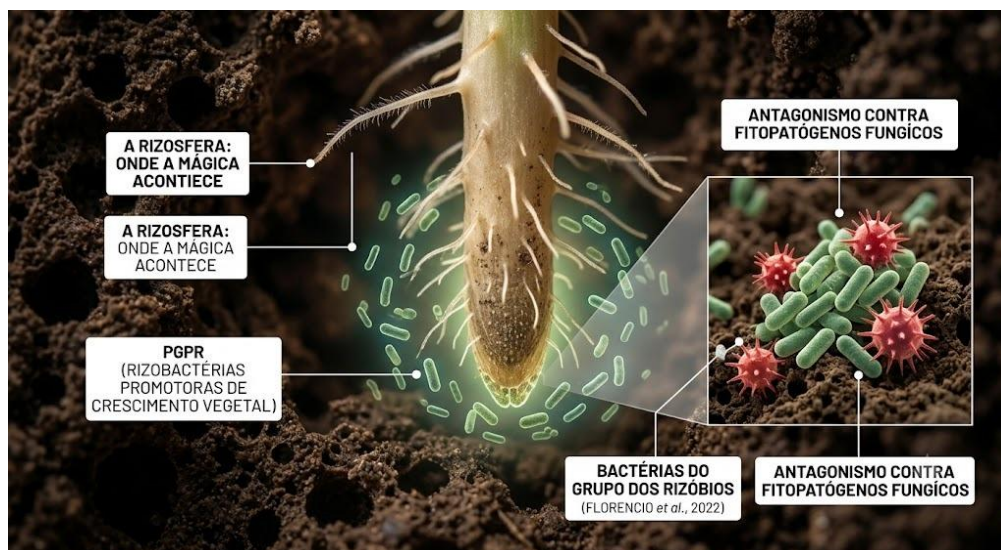


Figura 2 – Local de atuação das Rhizobactérias

Fonte: gerado através da IA Gemini pelo próprio autor.

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) estimulam o desenvolvimento vegetal por mecanismos diretos ou indiretos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). De forma direta, atuam como biofertilizantes e fitoestimuladores através da fixação biológica de nitrogênio (VESSEY, 2003) e da solubilização de fósforo via liberação de prótons e ácidos orgânicos (RICHARDSON et al., 2009).

Além disso, sintetizam fito-hormônios (como auxinas, giberelinas e citocininas) que expandem a área superficial das raízes (HAN et al., 2005; WERNER et al., 2003) e produzem a enzima ACC-deaminase, que minimiza os efeitos deletérios do etileno sob estresses ambientais (DUAN et al., 2009). Indiretamente, funcionam como agentes de biocontrole e biopesticidas ao privar fitopatógenos de ferro pela secreção de sideróforos (AKHTAR; SIDDIQUI, 2010) e ao liberar compostos voláteis supressores, como o cianeto de hidrogênio (Fig. 3) (HCN) (HAAS; KEEL, 2003).

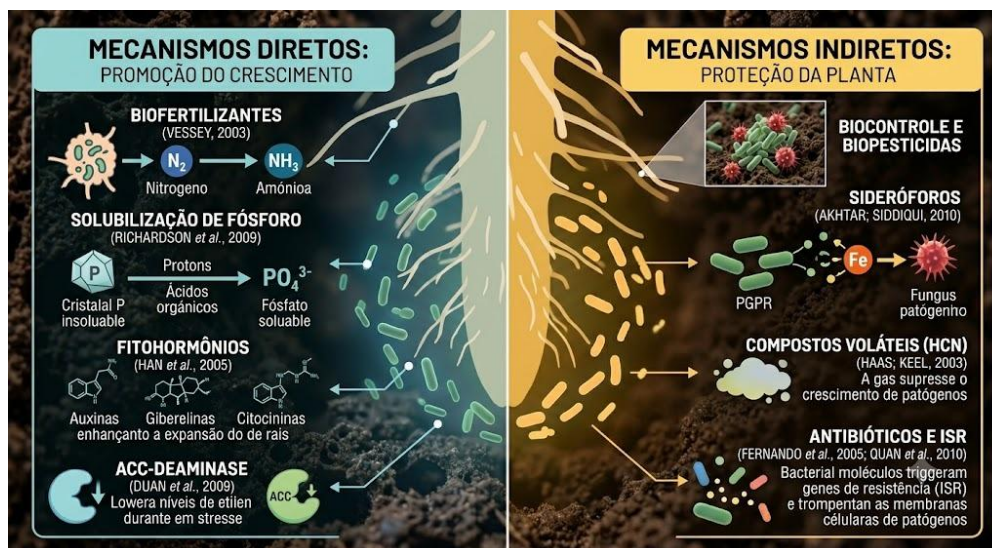


Figura 3 – Mecanismos de ação das Rhizobactérias

Fonte: gerado através da IA Gemini pelo próprio autor.

Por fim, combatem pragas e doenças pela produção de antibióticos que ativam genes de resistência sistêmica induzida (ISR) na planta hospedeira (FERNANDO *et al.*, 2005) e pela síntese de lipopeptídeos cíclicos que abrem canais iônicos nas membranas dos patógenos, provocando a sua citólise (QUAN *et al.*, 2010).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi explorar o banco de bactérias do solo do estoque armazenado no Laboratório de Genética Aplicada (LGA), vinculado ao LGBBA, com vistas à aplicação biotecnológica como RPCP, de forma a aumentar o leque de opções a serem exploradas como bioinsumos agrícolas e comparar esses isolados com aqueles que já são disponibilizados no mercado agrícola.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar filogeneticamente isolados bacterianos de solo agrícola por sequenciamento do gene 16S rRNA e avaliar seu potencial de aplicação como bioinsumos agrícolas.

2.2 Específicos

Os objetivos específicos consistiram em:

Identificar taxonomicamente os isolados bacterianos isolados de solo agrícola nacional;

Inferir relações filogenéticas e determinar a diversidade bacteriana;

Comparar os isolados com linhagens de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) de uso comercial;

Prospectar o potencial agrobiotecnológico dos táxons identificados a partir dos isolados bacterianos do solo, baseado nas evidências de afiliação taxonomia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos de solo agrocultivável.

Partes das estirpes utilizadas para caracterização molecular foram originárias a partir de amostras de solo, coletadas em fevereiro de 2011, na Fazenda Itaquerê, Usina Santa Fé S.A., em Nova Europa/SP. As amostras foram retiradas de solos distintos: (i) Solo sob cultivo de Cana-de-açúcar RB965911 (4º estágio de corte), fertirrigado com vinhaça por três anos consecutivos (2008/2009/2010) e (ii) Solo do canal mestre de distribuição de vinhaça (Fig. 4)



Figura 4. Localização geográfica dos sítios de coleta na Fazenda Itaquerê, Nova Europa/SP. (A) Região correspondente a Usina Santa Fé S.A, com área de plantio. (B) Detalhe do canal mestre de distribuição de vinhaça. (Imagens: Google Earth, Wikipedia e Omori, W.P.)

Algumas características edafoclimáticas correspondentes à área de coleta foram: (i) classificação climática de Köppen-Geiger: tipo Aw, clima tropical chuvoso com estação seca de Inverno; (ii) temperatura média: 25,2°C; (iii) precipitação média: 195,5 mm; (iv) precipitação média do ano anterior ao da coleta (2010): 33,0 mm (CEPAGRI, 2017); e (v) condições do canal mestre de vinhaça: parcialmente assoreado pela deposição de sedimentos deslocados pelas fortes chuvas no período. Os solos foram amostrados e coletados na profundidade de 0-20 cm conforme descrito por Omori e colaboradores (2016). A análise das características químicas dos solos foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solo (Departamento de Solos e Adubos, FCAV/UNESP).

Os isolados bacterianos foram obtidos após homogeneização e diluição seriada de 1 g de amostra dos solos em solução salina [NaCl 0.85% (p/v)], a 250 rpm por 30 min à temperatura ambiente. Diluições de 10^{-5} – 10^{-8} foram distribuídas em meio sólido de cultivo “PEG” [composto por (g/L): K₂HPO₄ (0,6), MgSO₄ (0,2), NaCl (0,1), Extrato de Levedura (1,0), Glicose (10,0), e Agar (9,0); pH 6,9], acrescido de cicloheximida (300 µg/mL), e incubadas por 15 dias a 28°C. Colônias distintas foram obtidas e cultivadas em meio PEG líquido, por 48 hs a 28°C, 120 rpm, e estocadas em ultrafreezer a -80°C na presença de glicerol [20% (v/v)]. A coleção constituiu-se

em 40 isolados morfológicamente distintos, depositados no Laboratório de Genética Aplicada (DB/FCAV/UNESP) e Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP/FCAV/UNESP).]

3.2 Cultivo bacteriano, extração de DNA e amplificação do gene 16S RRNA.

Foram selecionados 11 isolados bacterianos, designados: EV05, EV08, V05_13, V05_22, V05_6, V05D, V20B, V20C, V20F, V20G e V20L. A nomenclatura “EV” refere-se ao solo do canal mestre de distribuição de vinhaça, enquanto “V” refere-se ao solo sob cultivo de cana-de-açúcar, fertirrigado com vinhaça.

Após cultivo em meio PEG líquido, as culturas tiveram suas D.O. (600 nm) padronizadas em aproximadamente 0,800, no período de 17 – 48 hrs. Cerca de 1 ml da cultura, correspondente a 50 mg de células, foram sedimentados e lavados em solução salina [NaCl 0.85% (p/v)] para proceder-se à extração de DNA, baseado na adaptação do método desenvolvido para obtenção de DNA total de bactérias (Marmur, 1961). A lise celular foi realizada através da adição de enzima lisozima (20 mg/mL), na presença de RNase (50 µg/mL). Em seguida, procedeu-se à dissociação do complexo DNA/proteínas por meio da desnaturação com 2,0 % (p/v) do detergente Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e aumento da força iônica com 1 M Acetato de Sódio, pH 5,2. A separação do DNA de outras macromoléculas aconteceu pela extração orgânica com um volume de Clorofórmio: Álcool Isoamílico [24:1 (v/v)] e a precipitação do DNA com 2 volumes de Etanol. As amostras tiveram o excesso de etanol evaporado em Concentrator Plus (Eppendorf), na opção D-AL e sem ajuste de temperatura. O DNA foi ressuspensionado em 100 µL de TE (10:1) pH 8,0, overnight a 4 °C. Após caracterização eletroforética [Agarose 0,8 % (p/v)] e quantificação do DNA em aparelho Nanodrop 1000 Spectrophotometer (ThermoScientific – Uniscience), as amostras de DNA foram estocadas em freezer -20 °C.

Foram obtidos amplicons de 1,5 Kb a partir do gene 16S rRNA, para determinação da assinatura molecular de cada isolado, através de PCR. Foram aplicados os oligonucleotídeos iniciadores (primers) universais fD1 (8-27) <5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'> e rD1 (1525-1541) <5'-AAG GAG GTG ATC CAG

CC-3'> (Weisburg et al., 1991), descritos para as regiões alvo de *Escherichia coli* K12. A reação de amplificação consistiu em: 40,0 ng DNA molde; 7,5 pmol de cada primer universal; 1,75 mM MgCl₂; 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Trifosfatos (dNTPs); 2,0 µl de Tampão 10X; 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen); em um volume final de 20 µL. O programa de amplificação foi: 94°C/5 min; 35 ciclos a 94°C/30 s, 56°C/40 s, 72°C/90 s; 72°C/7 min, realizados em um termociclador PTC-100™ Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc.). O tamanho e pureza dos amplicons gerados foram verificados por eletroforese [Agarose 1,5 % (p/v)].

3.3 Sequenciamento dos amplicons 16S rRNA.

Os amplicons produzidos por PCR tiveram suas seqüências de DNA determinadas para identificação do gênero bacteriano afiliado. Dada à pureza das reações de PCR, reações de sequenciamento de DNA foram realizadas sem a necessidade de purificação adicional dos amplicons. Para as amplificações de sequenciamento de DNA, além dos primers externos (fD1 e rD1), foram utilizados os primers internos à região 16S rRNA (1,5 Kb), desenhados por L. M. Cruz e descritos por Menna e colaboradores (2006): 362f (339–362) <5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG-3'>, 786f (764-786) (5'-CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG-3') e 1203f (1179-1203) (5'-GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC-3'). A cobertura concatenada do amplicon atinge em média até 1,3 Kb.

As reações de sequenciamento foram padronizadas para um volume final de 10 µl, utilizando os seguintes reagentes: 0,5 pmol de primer; tampão de sequenciamento 1X; 1,0 µl de enzima BigDye (Thermo Fisher Scientific); 7 ng de DNA total bacteriano (para os primers fD1 e rD1) ou 7 ng de amplicon 16S rRNA (para os primers 362f, 786f e 1203f). O programa de amplificação foi: 96°C/2 min; 40 ciclos a 96°C/10 s, 52°C/20 s, 60°C/4 min. Cada reação de sequenciamento foi precipitada com 80 µl de isopropanol 75% (v/v) e submetida a sucessivas lavagens em etanol 70% (v/v) gelado, para remoção dos Dideoxinucleotídeos Trifosfatos (ddNTPs) marcados não incorporados à reação. As amostras foram secas em fluxo

laminar por 1 h, ressuspensas com 9,0 µl de Hi-Di Formamide (4311320 - ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 min. O sequenciamento dos amplicons foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3100 Automated Sequencer (PerkinElmer).

3.4 Análises das assinaturas moleculares dos isolados bacterianos através de bioinformática.

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador capilar foram avaliados quanto à qualidade (Phred ≥ 20). O gene 16S rRNA foi concatenado nos seus aproximadamente 1,5 Kb pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Gordon et al., 1998). Após a montagem dos contigs 16S rRNA, as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos contra o banco de dados de nucleotídeos (não redundante) do GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI), utilizando a ferramenta nucleotide BLAST (BLASTn) (Altschul et al., 1990).

3.5 Estoque de laboratório

As bactérias *Bacillus cereus* (BioAdd 1), *Bacillus thuringiensis* (BioAdd 2), *Bacillus cereus* (BioAdd 3), *Bacillus cereus* (BioAdd 4), *Bacillus widmannii* (BioAdd 5), *Paenibacillus alvei* (AgN31) são provenientes do estoque pertencente ao “Laboratório de Genética Aplicada”, do Departamento de Biologia, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, unidade de Jaboticabal.

3.6. Isolados comerciais

Para a comparação filogenética foram selecionadas as principais bactérias disponibilizadas comercialmente por empresas de biotecnologia no ramo de bioinoculantes, com objetivo de criar um panorama completo e representativo do mercado. Foram as bactérias *Ensifer meliloti* (MVY-026), *Paenibacillus polymyxa*

(MVY-024), *Rhizobium leguminosarum* (MVY-018), *Bacillus amyloliquefaciens* (MVY-008), *Bacillus mojavenensis* (MVY-007), *Bacillus megaterium* (MVY-011), *Bacillus aryabhattai* (MVY-004), *Bacillus wiedmannii* (FSL W8-0169), *Paenibacillus alvei* (DSM 29), *Propionibacterium acidipropionici* (CIP 103025), *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), *Burkholderia cepacia*. As sequencias parciais do gene 16S rRNA foram obtidas por meio do banco de dados Genbank, conforme os números de acesso descritos na Tabela 1. Esses isolados não estavam contidos no estoque do LGBBA.

Tabela 1 – Relação das linhagens bacterianas comerciais utilizadas na análise filogenética, classificação taxonômica em nível de família e respectivos números de acesso no GenBank.

Acesso	Família	Linhagem
MT900583.1	Rhizobiaceae	<i>Sinorhizobium meliloti</i> MVY-026
MT900581.1	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus polymyxa</i> MVY-024
NR_044774.1	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium leguminosarum</i> MVY-018
NR_041455.1	Bacillaceae	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MVY-008
NR_024693.1	Bacillaceae	<i>Bacillus mojavenensis</i> MVY-007
NR_043401.1	Bacillaceae	<i>Priestia megaterium</i> MVY-011
NR_115953.1	Bacillaceae	<i>Priestia aryabhattai</i> MVY-004
NR_152692.1	Bacillaceae	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169
NR_042091.1	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus alvei</i> DSM 29
NR_125504.1	Propionibacteriaceae	<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>
NR_029329.1	Oxalobacteraceae	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67
NR_029209.1	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia cepacia</i> 717

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

3.7. Construção e elaboração do dendrograma

Foram obtidas, inicialmente, as sequências parciais do gene do 16S rRNA, dos 17 isolados avaliados e dos 12 isolados comercialmente ativos. Sequências complementares de organismos relacionados foram recuperadas por meio de buscas no repositório do banco SILVA v138.2 (<https://academic.oup.com/nar/article/54/D1/D334/8326456?login=true>) utilizando a ferramenta BLASTn, a fim de aumentar a resolução dos ramos e clados da árvore filogenética e reduzir agrupamentos inconsistentes. O alinhamento múltiplo de todas

as sequências foi executado na ferramenta MAFFT v7.525 (<https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>). Posteriormente, regiões pouco informativas e colunas com excesso de lacunas (gaps) foram removidas utilizando o software trimAl (Capella-Gutiérrez et al., 2009). O alinhamento processado foi submetido à reconstrução filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança no software IQ-TREE v2.0.7 (Wong et al., 2026), sendo utilizado o ModelFinder (<https://www.nature.com/articles/nmeth.4285>) para seleção automática do melhor modelo evolutivo, sendo ele TIM3+F+I+G4 de acordo com os critérios BIC (Critério de Informação Bayesiano). Por fim, a árvore gerada foi visualizada e editada por meio da ferramenta iTOL v7 (Letunic; Bork, 2024).

3.8. Aspectos legais

O acesso ao Patrimônio Genético (PG) de microrganismos e as atividades de pesquisa desenvolvidas neste trabalho foram devidamente registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o cadastro nº AE8C9B5, em conformidade com as exigências da Lei nº 13.123/2015.

4. RESULTADOS

O sequenciamento completo do gene 16S rRNA dos isolados bacterianos do solo permitiram a identificação taxonômica dos 11 isolados selecionados. Adicionalmente, o sequenciamento parcial do 16S rRNA de outros seis isolados pertencentes à Coleção de Isolados do Solo mantidos no LGBBA permitiu identificar a assinatura molecular necessária para comparação filogenética.

A tabela 1 ilustra os resultados da análise de similaridade por BLASTn. Esta análise mostra elevado nível de identidade nucleotídica que variou de 97,37% até 100%, possibilitando a afiliação taxonômica dos isolados com diferentes grupos taxonômicos. Os isolados do solo agrocoltivável foram distribuídos em oito famílias distintas, a saber: Chromobacteriaceae, Burkholderiaceae, Sphingomonadaceae,

Rhizobiaceae, Bacillaceae, Paenibacillaceae, Microbacteriaceae e Micrococcaceae. Entre os gêneros identificados destacaram-se os gêneros *Chromobacterium*, *Cupriavidus*, *Novosphingobium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Curtobacterium* e *Arthrobacter*.

A comparação das sequências consenso com o banco de dados GenBank revelou elevados índices de similaridade (99%) para todos os isolados do solo (coleção 1 ao 11), possibilitando sua afiliação a diferentes grupos bacterianos reconhecidos. Os isolados V20B, V20G e V05D apresentaram identidade com *Arthrobacter echigonensis*, constituindo o grupo taxonômico mais representativo entre os isolados avaliados. Os isolados V20F e V20L mostraram alta similaridade com o gênero *Cupriavidus*, enquanto os isolados V20C, EV05, EV08, V05_6, V05_13 e V05_22 foram afiliados respectivamente com os gêneros *Rhizobium*, *Curtobacterium*, *Brevibacillus*, *Novosphingobium*, *Bacillus* e *Chromobacterium* (Tabela 2).

Os isolados 12 ao 17 pertencentes ao banco do LGA (SIGNORINI; ALVES, 2025) foram identificados taxonomicamente como pertencentes às espécies *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus wiedmannii* e *Paenibacillus alvei*, com valores de identidade variando entre 97,37% e 100%

Tabela 2 - Dados de similaridade de sequência e identificação dos isolados bacterianos selecionados para a análise de agrupamento no dendrograma.

	Isolados	Acesso	Família	Linhagem	Identidade
1	V05_22	CP017707.1	Chromobacteriaceae	<i>Chromobacterium vaccinii</i> strain 21-1	99%
2	V20F	KU248158.1	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i> sp. strain UYMRaPT14	99%
3	V20L	LC218379.1	Burkholderiaceae	<i>Cupriavidus</i> sp. strain SM52	99%
4	V05_6	KX215153.2	Sphingomonadaceae	<i>Novosphingobium</i> sp. strain SA925	99%
5	V20C	KY426389.1	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i> sp. strain Moz100	99%
6	V05_13	MF405756.1	Bacillaceae	<i>Bacillus wiedmannii</i> strain cl65	99%
7	EV08	NR_112926.1	Paenibacillaceae	<i>Brevibacillus nitrificans</i> strain DA2	99%
8	EV05	CP017580.1	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i> sp. strain BH-2-1-1	99%
9	V20B	GU326383.1	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter echigonensis</i> strain MN1405	99%
10	V20G	GU326383.1	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter echigonensis</i> strain MN1405	99%
11	V05D	GU326383.1	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter echigonensis</i> strain MN1405	99%
12	BioAdd 1	SS4-F	Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>	100%
13	BioAdd 2	SS2-F	Bacillaceae	<i>Bacillus thuringiensis</i>	99.86%
14	BioAdd 3	SS3-R	Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>	100%
15	BioAdd 4	SS5-F	Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i>	100%
16	BioAdd 5	SS3-F	Bacillaceae	<i>Bacillus widmannii</i>	100%
17	AgN31 #	SS6-F	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus alvei</i>	97.37%

Fonte: elaborado pelo próprio autor

A Figura 2 apresenta uma árvore filogenética construída com as sequências de 16S rRNA obtidas a partir dos isolados bacterianos do solo. Foi obtida pelo método de Máxima Verossimilhança e apresenta altos valores de bootstrap nos principais nós, com valores maiores que 70% e muitos acima de 90%. Este resultado indica significância estatística satisfatória para análise dos agrupamentos observados e demonstra uma elevada diversidade filogenética dos microrganismos recuperados da coleção de isolados do LGA. Os cladons ilustrados apresentaram elevada

coerência com a classificação atribuída pela análise de similaridade de sequência BLASTn (Tabela 2), corroborando a robustez das identificações obtidas neste trabalho

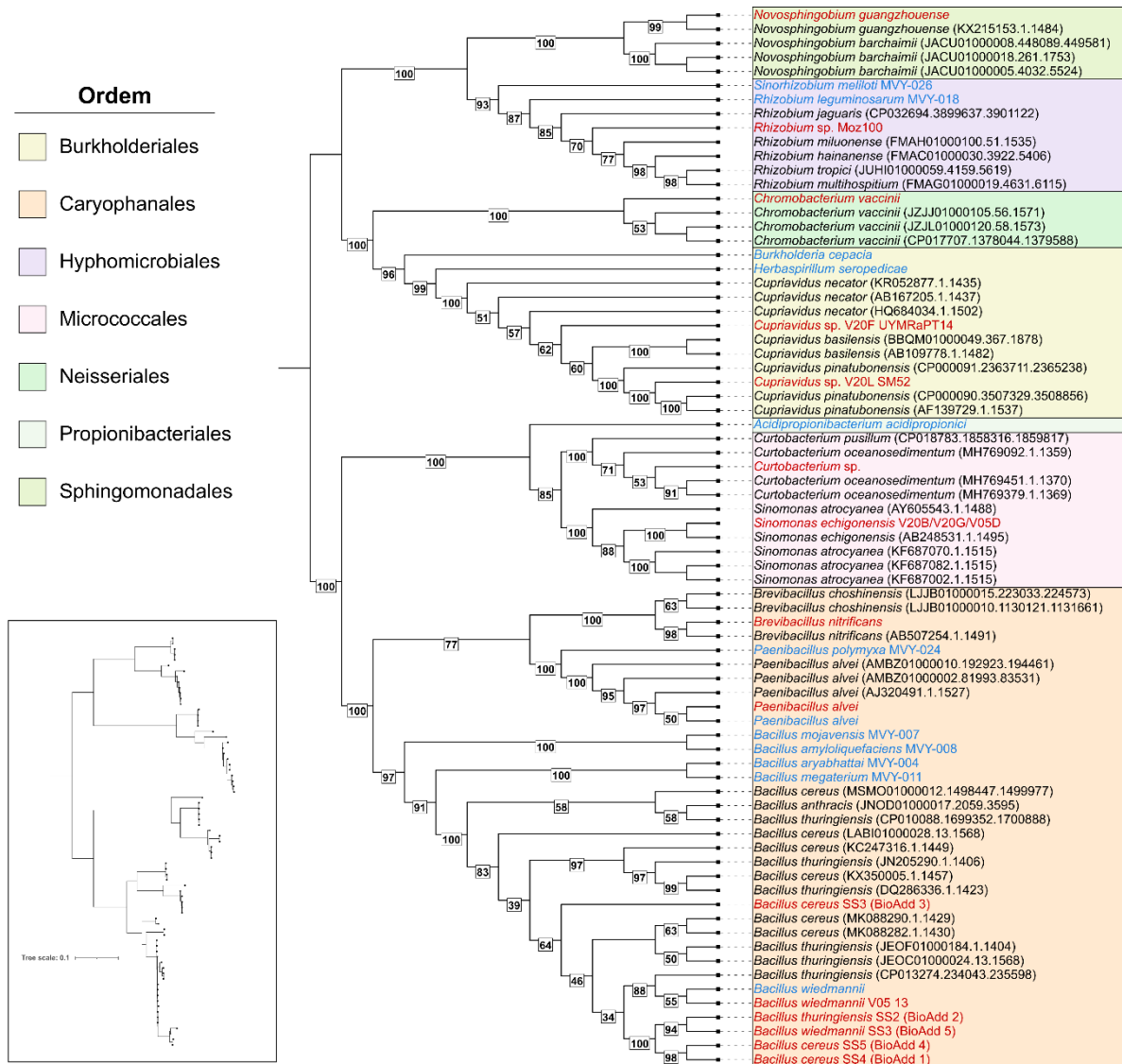


Figura 5 - Árvore filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA evidenciando as relações evolutivas dos isolados bacterianos obtidos em relação a linhagens comerciais e sequências de referência. Os isolados na cor vermelha representam os isolados abordados, os isolados na cor azul representam os comercialmente ativos, já os isolados em preto representam as complementares de organismos relacionados foram recuperadas por meio de buscas no repositório do banco SILVA.

Os isolados correspondentes aos gêneros *Bacillus* e *Penibacillus* agruparam-se próximos ao grupo de linhagens comerciais utilizadas como referência. Por outro lado, os gêneros *Arthrobacter*, *Cupriavidus*, *Rhizobium*, *Novosphingobium*, *Curtobacterium* e *Chromobacterium* formaram grupos distintos, refletindo a diversidade filogenética presente no banco de isolados bacterianos estudados e isolados do solo pertencentes a coleção do LGA.

As ordens bacterianas que agruparam os diferentes isolados foram: *Hyphomicrobiales*, *Neisseriales*, *Micrococcales*, *Caryophanales*, *Sphingomonadales*, *Burkholderiales* e *Propionibacteriales*.

O isolado V20C agrupa-se com o gênero *Rhizobium* formando subclado com *Rhizobium* sp. Moz100, *Rhizobium miluonense* e *Rhizobium tropici*. Isto confirma a identificação pelo BLASTn e sugere associação com um grupo de bactérias associadas à fixação biológica de nitrogênio. A posição filogenética do isolado V05_22 no clado de *Chromobacterium vaccinii* foi muito consistente, com bootstrap de 100% (Figura 2).

O clado *Cupriavidus* abrigou os isolados V20F e V20L, fortemente relacionados com *Cupriavidus pinatubonensis* e *Cupriavidus basilensis*, além da proximidade com a linhagem comercial *Cupriavidus* sp. UYMRaPT14. Um interessante resultado ilustrado pela árvore consiste no clado *Curtobacterium* / *Sinomonas* que agrupou os isolados EV05, V20B, V20G e V05D, com particular diferenciação para os isolados identificados pelo BLASTn do gênero *Arthrobacter* (Tabela 2; Figura 2).

O isolado EV08 agrupou-se fortemente com *Brevibacillus nitrificans* (bootstrap 98-100%), enquanto AgN31 agrupou-se com *Paenibacillus alvei*, confirmando a identificação dos isolados pertencentes ao estoque. O clado *Bacillus* foi o grupo mais complexo da árvore, abrigando os isolados V05_13, BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4 e BioAdd 5. Todos os isolados encontram-se dentro com complexo *Bacillus cereus* sensu lato, o qual inclui *B. cereus*, *B. thuringiensis* e *B. wiedmannii*, com valores internos de bootstrap significativamente baixos em alguns nós (34% -58%). Vale ressaltar que os isolados caracterizados por sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, pertencentes ao grupo *B. cereus*, não podem ser categoricamente

discriminados em nível de espécie. O marcador 16S rRNA não tem eficiência filogenética discriminatória para este grupo (Liu et al., 2015).

5. DISCUSSÃO

Com base na análise do dendrograma, a proximidade filogenética entre os isolados bacterianos do solo avaliados e as linhagens popularmente comercializadas no mercado de bioprodutos sugere o compartilhamento de características funcionais de interesse agrícola. Na árvore essa correlação é evidente para as linhagens pertencentes à ordem *Caryophanales*.

O clado pertencente à ordem *Caryophanales* representou o maior e mais complexo agrupamento da árvore. Os isolados BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4, BioAdd 5 e V05_13 inseriram-se de forma consistente dentro do complexo *Bacillus cereus* sensu lato, compartilhando o mesmo nó com os isolados comerciais: *Bacillus mojavensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus aryabhatai* e *Bacillus megaterium*. Esse posicionamento das linhagens da coleção de isolados bacterianos do LGBBA sugere que essas sejam possíveis candidatas para o desenvolvimento de biopesticidas e promotores de crescimento vegetal. Conforme descrito por Kulkova et al. (2023) as linhagens presentes nesse agrupamento são popularmente utilizadas como bioinseticidas, principalmente devido a síntese de delta-endotoxinas (cristais Cry), além de atuarem na promoção de crescimento vegetal via solubilização de fosfato e produção de sideróforos.

A viabilidade do desenvolvimento de bioinsumos a partir das linhagens do LGBBA é apoiada pela existência de bioprodutos comerciais consolidados que utilizam esses mesmos microrganismos em suas formulações. Um grande exemplo é a empresa de biotecnologia Bioenergy LT (sediada na Lituânia), que dispõem um portfólio de insumos de grande importância agrícola baseados nos isolados avaliados neste estudo.

O isolado *Bacillus mojavensis*, filogeneticamente próximo às linhagens do LGBBA, é o princípio ativo de produtos como o Bactoforce, um bioestimulante microbiano que otimiza a absorção de nutrientes e atenua estresses bióticos e

abióticos; o Bacto-Seed, voltado para o incremento da viabilidade e velocidade de germinação de sementes; e o Ruinex, um bioestimulante focado na aceleração da decomposição e mineralização de resíduos vegetais via secreção de enzimas lignocelulolíticas. Essas formulações são indicadas à grandes culturas e hortifrutis, incluindo cereais, colza, milho, girassol e beterraba sacarina.

Complementarmente, o isolado *Bacillus amyloliquefaciens* compõe o produto Bacto-C, atuando como corretivo biológico para o incremento do teor de carbono orgânico no solo. Para a mobilização de macroelementos, o isolado *Bacillus aryabhatai* é utilizado no bioproduto Fosfofix-Plus, que atua na solubilização de complexos fosfatados recalcitrantes (ligados a cálcio, magnésio, ferro e alumínio), convertendo-os em formas assimiláveis pelas plantas.

Por fim, o isolado *Bacillus megaterium* faz parte da formulação do Bacto-K, responsável pela decomposição de silicatos e consequente disponibilização de potássio, e do Master, um estimulante projetado para aumentar o potencial microbiológico do solo.

Da mesma maneira o isolado AgN31 inseriu-se nesse enorme agrupamento, muito próxima a referências comerciais do gênero *Paenibacillus*. Bactérias desse gênero são amplamente descritas na literatura pela promoção do crescimento de culturas diretamente por meio da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção do fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA) e liberação de sideróforos que permitem a aquisição de ferro (Grady et al., 2016). Com isso essa linhagem pertencente ao LGBBA acaba se tornando um possível alvo para ensaios de promoção de crescimento vegetal de base biológica. A proximidade do isolado AgN31 com a linhagem comercial *Paenibacillus polymyxa* abre perspectivas concretas para o desenvolvimento de novos bioinsumos, visto que já existem produtos consolidados no mercado internacional utilizando este microrganismo. É o caso do Azofix Plus, um bioestimulador microbiológico formulado para otimizar a fixação do nitrogênio atmosférico e potencializar o aproveitamento nutricional pelas culturas

Fora do clado pertencente à ordem *Caryophanales*, outro destaque de alinhamento comercial ocorre na ordem *Burkholderiales*, onde as linhagens V20F e

V20L inseriram-se no clado *Cupriavidus*, estreitamente relacionadas a *Cupriavidus pinatubonensis* e *Cupriavidus basilensis*, além de demonstrarem uma proximidade filogenética com a linhagens comerciais. Linhagens do gênero *Cupriavidus* destacam-se na literatura por sua extraordinária tolerância a estresses abióticos e capacidade de promover o crescimento vegetal em solos degradados ou contaminados por metais pesados Zheng et al. (2023). Posicionando as linhagens V20F e V20L como potenciais ativos para formulações de bioestimulantes agrícolas multiuso.

Considerando que os isolados próximos a linhagens comerciais oferecem um caminho mais previsível para o desenvolvimento de bioinsumos, os isolados que se agruparam em clados distintos e altamente especializados representam janelas de inovação biotecnológica e merecem prospecção futura detalhada.

O isolado V05_22 demonstrou um posicionamento filogenético inequívoco, sustentado por 100% de bootstrap, no clado da espécie *Chromobacterium vaccinii*. O gênero *Chromobacterium* desperta grande interesse industrial devido à sua capacidade de biotransformação e produção de metabólitos secundários como a violaceína, com potentes propriedades antifúngicas e inseticidas contra pragas agrícolas de difícil controle (Ebadzadsahrai et al. 2020). A estabilidade de V05_22 o posiciona como um dos ativos mais promissores da coleção.

Da mesma maneira, o isolado V20C (ordem Hyphomicrobiales) estabeleceu um subclado bem definido (bootstrap de 98%) com as espécies de referência *Rhizobium miluonense* e *Rhizobium tropici*. A proximidade evolutiva com *R. tropici* possui grande relevância agronômica, visto que esta espécie é o padrão ouro na inoculação comercial do feijoeiro na América do Sul, apresentando alta eficiência na fixação biológica de nitrogênio e tolerância a estresses térmicos (Botelho et al. 2020)

6. CONCLUSÃO

Com base na análise da árvore filogenética, foi possível concluir que a proximidade evolutiva entre os isolados da coleção do LGBBA e as linhagens comerciais se faz presente, consolidando essa abordagem como uma ferramenta

biotecnológica eficaz para a triagem e identificação de potenciais bioinsumos de interesse agrícola.

Os isolados BioAdd 1, BioAdd 2, BioAdd 3, BioAdd 4, BioAdd 5 e V05_13 (complexo *Bacillus cereus* sensu lato), juntamente com o isolado AgN31 (*Paenibacillus*), apresentam forte correspondência com ativos comerciais de sucesso. Esse alinhamento valida essas linhagens como candidatas seguras e previsíveis para o desenvolvimento de bioinseticidas, solubilizadores de nutrientes e promotores de crescimento vegetal. Adicionalmente, as linhagens V20F e V20L demonstram aptidão filogenética para o desenvolvimento de bioestimulantes multiuso voltados ao manejo de estresses abióticos e à recuperação de solos degradados ou contaminados.

Por sua vez, os isolados V05_22 (estável no clado *Chromobacterium vaccinii*) e V20C (altamente relacionado a *Rhizobium tropici*) representam as janelas de inovação biotecnológica mais promissoras da coleção, dada a alta especificidade e relevância agrônoma de seus metabólitos e funções ecológicas.

Em suma, o estudo mostra que a coleção de isolados do LGBBA abriga uma rica diversidade funcional metabólica. Abrem-se, assim, perspectivas promissoras para a realização de ensaios in vitro e in vivo que confirmem as atividades de promoção de crescimento vegetal, solubilização de fosfato, produção de fitormônios e biocontrole sugeridas nesta triagem filogenética.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHTAR, Mohd Sayeed; SIDDIQUI, Zaki. Role of plant growth promoting rhizobacteria in biocontrol of plant diseases and sustainable agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (ed.). Plant growth and health promoting bacteria. Berlin: Springer, 2010. cap. 7. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2_7.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

ALVES, Higor de Oliveira. Ecogenômica de solos agrícolas e potencial de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) voltados à cultura do

cultivo do alho (*Allium sativum*). 2025. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, 2025.

BAKTHAVATCHALU, Sasirekha; SHIVAKUMAR, Srividya; SULLIA, Shanker Bhat. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluation of their potential as biocontrol agents. *Acta Biologica Indica*, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 61-67, 2012.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9. PMID: 22805914.

BOTELHO, G. R. et al. Nodulation and biological nitrogen fixation of common bean rhizobia from Santa Catarina Plateau soils. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 44, n. 4, p. 1507–1522, 2023. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2023v44n4p1507>.

CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA (CEPAGRI). *Clima dos Municípios Paulistas*. Campinas: Unicamp, 2017. Disponível em: <http://www.cpa.unicamp.br>. Acesso em: 20 jun. 2026.

CAPELLA-GUTIÉRREZ, Salvador; SILLA-MARTÍNEZ, José M.; GABALDÓN, Toni. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, Oxford, v. 25, n. 15, p. 1972–1973, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>.

DUAN, J. et al. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbial Ecology*, [S. l.], v. 57, n. 3, p. 423-436, 2009. DOI: 10.1007/s00248-008-9407-6.

EBADZADSARAI, G. et al. Inhibition of fungal growth and induction of a novel volatilome in response to *Chromobacterium vaccinii* volatile organic compounds. *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 11, p. 1035, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01035>.

FERNANDO, Dilantha; SEVUGAPPERUMAL, Nakkeeran; ZHANG, Yilan. Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: MAHESHWARI, D. K. (ed.). *Plant growth and health promoting bacteria*. Berlin: Springer, 1970. cap. 3. DOI: 10.1007/1-4020-4152-7_3.

FLORENCIO, Camila et al. Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. *Química Nova*, São Paulo, v. 45, n. 9, p. 1133-1145, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170909>.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.195>.

GRADY, E. N. et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, London, v. 15, n. 1, p. 203, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7. PMID: 27905924; PMCID: PMC5134293.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v. 41, p. 117–153, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095656>.

HAN, J. et al. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 66-76, 2005. DOI: 10.1016/j.syapm.2004.09.003. PMID: 15709367.

KULKOVA, I. et al. Plant growth promotion using *Bacillus cereus*. *International Journal of Molecular Sciences*, [S. l.], v. 24, n. 11, p. 9759, 2023. DOI: 10.3390/ijms24119759. PMID: 37298706; PMCID: PMC10253305.

LETUNIC, Ivica; BORK, Peer. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 52, n. W1, p. W78–W82, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>.

LIU, Yang et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*, London, v. 5, n. 1, p. 14082, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep14082>.

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology*, London, v. 3, n. 2, p. 208–218, 1961. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8).

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.12.002>.

MUSHTAQ, Zain. PGPR: present role, mechanism of action and future prospects along bottlenecks in commercialization. *EQA - International Journal of Environmental Quality*, Bologna, v. 41, p. 9-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.6092/issn.2281-4485/11103>.

QUAN, C. S.; WANG, X.; FAN, S. D. Antifungal compounds of plant growth promoting rhizobacteria and its action mode. In: MAHESHWARI, D. K. (ed.). *Plant growth and health promoting bacteria*. Berlin: Springer, 2010. p. 117–156.

RIAZ, Umair et al. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizers and biopesticides. In: HAKEEM, Khalid Rehman et al. (ed.). Microbiota and biofertilizers: a sustainable continuum for plant and soil health. Cham: Springer, 2021. cap. 11, p. 181-196. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-48771-3_11.

RICHARDSON, Alan E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant and Soil, [S. l.], v. 321, p. 305-339, 2009. DOI: 10.1007/s11104-009-9895-2.

SIGNORINI, Suélen Vieira. Potencial de bactérias nitrificantes e desnitrificantes como bioinoculante para cana-de-açúcar em sistemas de cultivo com vinhaça. 2025. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, 2025.

SINGH, A.; SHARMA, S. K.; LOGANATHAN, S. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture and improved crop productivity. Agriculture Reviews: An International Journal, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 9-14, 2026. DOI: <https://doi.org/10.51470/AR.2026.5.1.09>.

VAZ, A. P. A. et al. Bioinputs and bioenergy: research's contributions to Brazil's transition to a green economy. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 60, e04147, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2025.v60.04147>.

VESSEY, Joseph. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. Plant and Soil, [S. l.], v. 255, p. 571-586, 2003. DOI: 10.1023/A:1026037216893.

VIDAL, Mariane Carvalho; DIAS, Rogerio Pereira. Bioinsumos a partir das contribuições da agroecologia. Revista Brasileira de Agroecologia, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 171-192, 2023. DOI: <https://doi.org/10.33240/rba.v18i1.23735>.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, [S. l.], v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.