

BIANCA SERRÃO GONZAGA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Atriplex nummularia*
COM POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO
VEGETAL**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**RIO DE JANEIRO
JULHO/ 2024**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do(a) Professor(a) Caio Tavora Rachid Coelho da Costa e co-orientação de Douglas Alfradique Monteiro.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

G642i Gonzaga, Bianca Serrão
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES ENDOFÍTICAS
ISOLADAS DE *Atriplex nummularia* COM POTENCIAL
PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL / Bianca Serrão
Gonzaga. -- Rio de Janeiro, 2024.
57 f.

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa .
Coorientador: Douglas Alfradique Monteiro.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. *Atriplex nummularia*. 2. MALDI-TOF. 3.
sequenciamento genético. 4. endofíticos. 5.
taxonomia bacteriana. I. Costa , Caio Tavora Rachid
Coelho da, orient. II. Monteiro, Douglas Alfradique
, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): Bianca Serrão Gonzaga

DRE:121072128

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Flavia Lima do Carmo (Presidente)
Prof. Igor Nunes Taveira
Prof. Renata Cristina Picão
Prof. Andrew Macrae (Suplente)

**Título da Monografia: ""IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Atriplex nummularia* COM
POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL""**

Local: IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 10 de dezembro de 2024 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2024.

NOTA:

Banca Examinadora:

10,0



Prof. Flavia Lima do Carmo (Presidente)

10



Prof. Igor Nunes Taveira

10,0



Documento assinado digitalmente
RENATA CRISTINA PICAO
Data: 17/12/2024 15:57:42-8300
Verifique em <https://verificar.dfi.gov.br>

Prof. Renata Cristina Picão

Prof. Andrew Macrae (Suplente)

Aluno(a):



Bianca Serrão Gonzaga

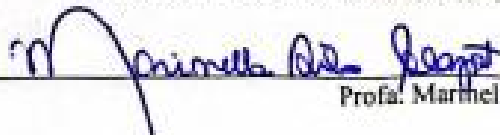
Orientador(a)



(e coorientador):

Prof. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa e Douglas Alfredo Monteiro

Coordenadora de



Prof. Marthella Silva Laport

TCC:

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer às minhas pessoas favoritas no mundo e que, coincidentemente, também são meus pais, Lucilene e José Luis.

Mãe, você é a minha maior inspiração e também minha melhor amiga. Obrigada por sempre me apoiar em tudo, mesmo quando não fazia a menor ideia do que ia dar. Você me ensinou a importância de valorizar a mim mesma e não ligar para o que os outros pensam, aprendizados sem os quais eu não teria conseguido sobreviver tanto tempo sozinha.

Pai, você é a pessoa que mais se parece comigo em todo o mundo, e o motivo pelo qual eu nunca me senti sozinha em toda a vida, mesmo com todas as minhas esquisitices. Além de ser a pessoa mais inteligente que conheço, você também me ensinou que ser gentil é sempre o melhor caminho, e ser sua filha é o meu maior orgulho!

Obrigada, el mãe e el pai, amo vocês! (E desculpa por tê-los enlouquecido ao sair de casa aos 17 anos).

Quanto a Elvinho e Katinha, meus titizinhos, agradeço por serem os melhores companheiros que qualquer um poderia querer e por alegrarem a vida dos meus pais enquanto eles me apoiavam a voar longe. Vocês são os seres mais puros que existem, e eu os amo com todo o meu coração.

Também gostaria de agradecer a toda a minha família estendida, mas, em especial, à minha tia Luciana, minha segunda mãe desde quando consigo me lembrar. Tia, você é o motivo pelo qual eu sempre sorrio ao ver qualquer coisa amarela, e foi contigo que aprendi que é preciso criar humor na vida para que ela seja digna de ser vivida. Seu amor por mim é incondicional, e eu prometo que o meu por você também sempre será.

Devo muito, também, à família que construí longe de casa, a “cota LGBT” (título totalmente autoproclamado, diga-se de passagem). Agradeço à Ana, que sempre está do meu lado para rir das mesmas besteiras e para quando preciso me sentir compreendida. Espero ainda assistir a muitos musicais contigo. Ao Gonçalo, que capta todas as minhas referências e faz o melhor sushi do mundo inteiro, implicar com você é o meu esporte preferido. E, claro, ao Eduardo, meu irmão de escolha (ou não tão escolha assim, já que não tem mais como voltar atrás agora que decidimos um único cérebro). Eduardo, obrigada pela reciprocidade infinita e por ser minha âncora em alguns dos momentos mais difíceis da minha vida. Te amo além das palavras, espero continuar sendo sua rocha para sempre.

Aos amigos que deixei em São Paulo, Giovanna, João, Pablo e Leticia (ou Titicia, como até hoje está seu nome no meu celular), agradeço imensamente pelo apoio na época em

que decidi fazer a loucura de mudar de estado para fazer faculdade. Valeu a pena! E vocês me ajudaram a ver isso desde o início, saudades sempre!

Ao meu coorientador, Douglas, expresso minha sincera gratidão pela paciência, parceria e mentoria, que foram fundamentais para o meu crescimento e a concretização deste trabalho. Ao meu orientador, Caio, agradeço profundamente pelo direcionamento preciso, pela confiança depositada em mim e pela oportunidade de desenvolver este projeto. Agradeço a todos do LABEM, que sempre tornam o ambiente descontraído e inspirador, além de reconhecer a importância do espaço físico do laboratório, que viabilizou a concretização deste trabalho.

Expresso, por fim, minha profunda gratidão à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes pela infraestrutura e pelo apoio técnico, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Only the impossible can do the impossible.

Anne Rice, *The Vampire Lestat*.

RESUMO

BIANCA SERRÃO GONZAGA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Atriplex nummularia* COM POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa

Coorientador: Douglas Alfradique Monteiro

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As mudanças climáticas têm imposto desafios crescentes à agricultura em todo o mundo. Nesse cenário, o estudo de bactérias associadas a plantas adaptadas a ambientes áridos e salinos é a base para o desenvolvimento de inoculantes que venham a mitigar os estresses abióticos das plantas. O objetivo deste estudo foi caracterizar molecularmente estirpes bacterianas endofíticas isoladas da planta halófito *A. nummularia*. Foram analisadas 91 estirpes bacterianas, previamente isoladas e selecionadas com base em características relacionadas à promoção do crescimento das plantas. As estirpes foram reativadas e submetidas à análise por MALDI-TOF. Aquelas com resultados inconclusivos nessa etapa foram submetidas ao sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA via método Sanger. As sequências obtidas foram analisadas e utilizadas para construir uma árvore filogenética. O uso do MALDI-TOF foi capaz de identificar 81 estirpes, que foram atribuídas aos seguintes gêneros bacterianos: *Enterobacter* (19), *Bacillus* (11), *Klebsiella* (4), *Pantoea* (1), *Priestia* (5), *Citrobacter* (6), *Pseudomonas* (1), *Microbacterium* (1), *Sphingobacterium* (1), *Agrobacterium* (1) e *Staphylococcus* (1). Trinta estirpes não puderam ser identificadas pelo MALDI-TOF, e 26 foram submetidas ao sequenciamento genético. Os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*, conhecidos por suas interações benéficas com plantas, foram predominantes entre os identificados. Três estirpes formaram um clado robusto (*bootstrap* 96%) com *Bacillus cereus*, *Bacillus tropicus* e *Bacillus nitratireducens*. Uma estirpe foi fortemente associada (100% de *bootstrap*) com *Priestia megaterium* e *Priestia aryabhatai*. Três estirpes se agruparam em um clado formado por *Bacillus licheniformis* e *Bacillus paralicheniformis*. Outras estirpes formaram um agrupamento com *Bacillus velezensis*, *Calidifontibacillus erzurumensis*, *Bacillus stercoris* e *Pseudomonas* sp. Algumas bactérias apresentaram padrões de agrupamento mais variados e com valores de *bootstrap* baixos (<50%), indicando uma relação filogenética mais incerta. Foi observada que a integração do MALDI-TOF com técnicas de sequenciamento genético representa uma abordagem poderosa para a identificação taxonômica de bactérias endofíticas. Este estudo avança o conhecimento sobre a diversidade de microrganismos em ambientes salinos e oferece subsídios importantes para futuras pesquisas sobre seu potencial biotecnológico. Além disso, reforça a necessidade de expandir os bancos de dados de referência, especialmente para microrganismos adaptados a condições

extremas, e destaca o potencial de *A. nummularia* como modelo para estudos de interação planta-microrganismo.

Palavras-chave: *Atriplex nummularia*, MALDI-TOF, sequenciamento genético, endofíticos, identificação molecular, taxonomia bacteriana.

ABSTRACT

BIANCA SERRÃO GONZAGA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Atriplex nummularia* COM POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa

Coorientador: Douglas Alfradique Monteiro

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Climate change has imposed increasing challenges to agriculture worldwide. In this scenario, the study of bacteria associated with plants adapted to arid and saline environments is the basis for the development of inoculants that can mitigate abiotic stresses in plants. The objective of this study was to molecularly characterize endophytic bacterial strains isolated from the halophytic plant *A. nummularia*. Ninety-one bacterial strains, previously isolated and selected based on characteristics related to plant growth promotion, were analyzed. The strains were reactivated and subjected to MALDI-TOF analysis. Those with inconclusive results at this stage were subjected to sequencing of the gene encoding the 16S rRNA subunit via the Sanger method. The sequences obtained were analyzed and used to construct a phylogenetic tree. The use of MALDI-TOF was able to identify 81 strains, which were assigned to the following bacterial genera: *Enterobacter* (19), *Bacillus* (11), *Klebsiella* (4), *Pantoea* (1), *Priestia* (5), *Citrobacter* (6), *Pseudomonas* (1), *Microbacterium* (1), *Sphingobacterium* (1), *Agrobacterium* (1) and *Staphylococcus* (1). Thirty strains could not be identified by MALDI-TOF, and 26 were submitted to genetic sequencing. The genera *Bacillus* and *Enterobacter*, known for their beneficial interactions with plants, were predominant among those identified. Three strains formed a robust clade (96% bootstrap) with *Bacillus cereus*, *Bacillus tropicus* and *Bacillus nitratireducens*. One strain was strongly associated (100% bootstrap) with *Priestia megaterium* and *Priestia aryabhattai*. Three strains were grouped in a clade formed by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis*. Other strains formed a cluster with *Bacillus velezensis*, *Calidifontibacillus erzurumensis*, *Bacillus stercoris* and *Pseudomonas sp.* Some bacteria presented more varied clustering patterns and low bootstrap values (<50%), indicating a more uncertain phylogenetic relationship. It was observed that the integration of MALDI-TOF with genetic sequencing techniques represents a powerful approach for the taxonomic identification of endophytic bacteria. This study advances the knowledge on the diversity of microorganisms in saline environments and provides important subsidies for future research on their biotechnological potential. Furthermore, it reinforces the need to expand reference databases, especially for microorganisms adapted to extreme conditions, and highlights the potential of *A. nummularia* as a model for studies of plant-microorganism interactions.

Keywords: *Atriplex nummularia*, MALDI-TOF, genetic sequencing, endophytes, molecular identification, bacterial taxonomy.

RESUMO PARA LEIGOS

BIANCA SERRÃO GONZAGA

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *Atriplex nummularia* COM POTENCIAL PROMOTOR DE CRESCIMENTO VEGETAL

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa

Coorientador: Douglas Alfradique Monteiro

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Foram feitas descobertas promissoras para a agricultura em regiões de solos pobres e climas adversos. O estudo evidenciou a eficácia da combinação de diferentes técnicas de identificação e destacou a importância de expandir os bancos de dados sobre essas bactérias, principalmente aquelas associadas a plantas resistentes e a solos de baixa qualidade. A criação de um acervo mais robusto pode impulsionar novas estratégias para a agricultura sustentável em cenários extremos. Pesquisas sobre como a agricultura pode se adaptar às mudanças climáticas estão ganhando cada vez mais destaque. Em regiões com solos salgados ou climas extremos, como secas intensas, a produção de alimentos se torna mais difícil. Um grupo de seres apresenta-se como solução promissora para enfrentar esses desafios: bactérias que vivem dentro das plantas e ajudam no seu crescimento, mesmo em condições severas. O estudo em questão focou na planta erva-sal, conhecida por sua resistência a ambientes difíceis, como os de solos muito salgados e secos. Foram analisadas 81 bactérias retiradas de suas partes internas, buscando aquelas com características que podem ser benéficas para o desenvolvimento das plantas. Entre os principais benefícios, estão a capacidade dessas bactérias de fixar nitrogênio – um processo em que bactérias transformam o gás do ar em nutrientes que as plantas podem usar. Para identificar as bactérias, foi usada uma técnica que analisa o que essas bactérias são feitas, funcionando como uma "impressão digital" que ajuda a determinar a espécie delas. Quando não foi possível identificá-las dessa maneira, foi-se utilizado o sequenciamento genético. O material genético funciona como um "manual de instruções" único para cada ser vivo, e no caso deste estudo, foi feita a análise de uma parte chamada '16S rRNA'. É como se fosse um "RG" genético: cada bactéria tem o seu, com informações que permitem diferenciá-la de outras espécies, mas também com semelhanças que mostram de qual "família" ela faz parte. Os resultados mostraram uma grande diversidade de bactérias, com destaque para *Bacillus* e *Enterobacter*. Essas bactérias são bem conhecidas por suas propriedades benéficas para as plantas, ajudando-as a crescer em solos difíceis. Além

disso, o estudo identificou algumas bactérias com impressão incerta, o que sugere a possibilidade de existirem novas espécies ou variantes com potencial para futuras pesquisas.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Bactérias endofíticas e a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas na agricultura.....	1
1.2 Seleção e caracterização molecular de bactérias endofíticas isoladas.....	5
1.3 A microbiota da halófita <i>Atriplex nummularia</i> e seu potencial promotor de crescimento vegetal.....	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivos gerais.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Identificação de banco de estirpes isoladas de <i>Atriplex nummularia</i> por MALDI-TOF.....	13
4.2 Extração do DNA genômico e PCR para amplificação do gene 16S rRNA.....	14
4.3 Sequenciamento e análise de bioinformática do gene 16S rRNA.....	15
5. RESULTADOS	16
5.1 Seleção, reativação e identificação de banco de estirpes isoladas de <i>Atriplex nummularia</i> por MALDI-TOF.....	16
5.2 Sequenciamento e análise de bioinformática do gene 16S rRNA.....	20
6. DISCUSSÃO	26
6. CONCLUSÕES	31

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bactérias endofíticas e a mitigação dos efeitos das mudanças climáticas na agricultura

Com o atual crescimento da população mundial, projetada para alcançar 9 bilhões de habitantes no ano de 2050, emerge a preocupação com demanda alimentícia futura (Campos Avelar et al., 2023). Estima-se que a produtividade agrícola precise ser duplicada até o ano de 2050 para que seja possível prover a demanda resultante do aumento populacional que vem sendo documentado durante as últimas décadas (Janni et al., 2023). Apesar da especialização da produção agrícola usada atualmente, sua produtividade a longo prazo tende a ser reduzida em decorrência dos efeitos das mudanças climáticas (Di Falco and Chavas, 2008).

As mudanças climáticas, termo que engloba os efeitos do aumento contínuo da temperatura média do sistema climático do planeta Terra, são causadas pelo aumento da concentração de gases de efeito estufa (GEE), como o dióxido de carbono (CO₂), o metano (CH₄), o óxido nitroso (N₂O) e os hidrofluorcarbonos (HFCs), pela atividade humana. A emissão desses gases se intensificaram durante o período industrial, iniciado em 1850, marcado por avanços tecnológicos e estruturais que acarretam em aumentos na emissão de GEE, continuados até hoje (IPCC, 2019; Seneviratne et al., 2021; Zandalinas et al., 2021). O aumento da temperatura média do planeta é diretamente proporcional à frequência da incidência de eventos meteorológicos extremos, como ondas de calor, secas ou enchentes, impactando diversas relações ecológicas existentes e modificando os padrões de distribuição e interações entre espécies (IPCC, 2019).

Mudanças de temperatura alteram, por exemplo, o comportamento de fitopatógenos, afetando dinâmicas populacionais e gerando adaptações para evadir das respostas de defesa das plantas (Campos-Avelar et al., 2023). Isso pode impactar severamente o desenvolvimento de uma planta e, conseqüentemente, reduzir a qualidade do produto ou até causar a sua perda por completo (Janni et al., 2023). Embora as plantas sejam naturalmente expostas a diversos estressores bióticos, como fitopatógenos, sua suscetibilidade a doenças pode ser seriamente impactada pelo clima (Surówka et al., 2020). O estresse térmico, por exemplo, pode resultar no fechamento de estômatos, redução da fotossíntese, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), diminuição do crescimento, redução da eficiência do uso de água e morte celular local, aumentando assim sua vulnerabilidade a patógenos (Leisner et al., 2022). Essas condições também desregulam canais de cálcio controlados por nucleotídeos cíclicos, causando um desbalanço no influxo de Ca²⁺ no citoplasma. Além disso, estressores abióticos, como a radiação ultravioleta, variações de temperatura e falta ou excesso de água, também podem ter seu potencial de impacto sobre

plantações intensificado pelas mudanças climáticas (Rucińska-Sobkowiak, 2010; Bitá and Gerats, 2013; Osakabe et al., 2013; He et al., 2018).

Diversas estratégias vêm sendo investigadas para mitigar tais efeitos adversos. Entre essas, destacam-se práticas de cultivo agroecológico sustentável, que incluem o manejo apropriado da água e a implementação de técnicas de agricultura de precisão para a otimização da gestão informacional (Panjehpour & Zarrinpoor, 2024). O desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas para resistência à seca, em conjunto com práticas agrícolas que minimizem estresses também tem demonstrado potencial promissor (Zainal-Abidin & Khalid, 2024). Adicionalmente, abordagens como a agricultura vertical e o cultivo em estufas emergem como soluções inovadoras, criando ambientes controlados que mitigam os impactos de condições climáticas adversas (Chauhan, 2024).

Estas práticas, embora eficazes até certo ponto, revelam-se insuficientes para enfrentar a complexidade e a intensidade dos desafios impostos pelas mudanças climáticas. Portanto, torna-se imperativo buscar alternativas inovadoras que possam complementar os métodos tradicionais (Biswal, 2024; Verma et al., 2024). Nesse contexto, a exploração biotecnológica do microbioma vegetal se apresenta como uma estratégia de relevância crescente.

O microbioma refere-se ao conjunto completo de microrganismos associados a um ecossistema, incluindo suas interações funcionais e genes, enquanto a microbiota diz respeito especificamente às comunidades de microrganismos presentes em um ambiente particular, como bactérias, fungos e vírus que vivem nas raízes, folhas ou no solo ao redor das plantas. Interações entre as plantas e seu microbioma são complexas e envolvem uma alta diversidade de microrganismos. Parte dessa diversidade é crucial para promover o crescimento vegetal e a tolerância a estresses ambientais, como seca e salinidade, ao mesmo tempo em que ajudam a mitigar os impactos das mudanças climáticas (Addison et al., 2024 ;Brüssow et al., 2024; Pino & Griffon, 2024).

Dentre esses microrganismos benéficos, destaca-se o grupo das bactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPB, do inglês *plant-growth promoting bacteria*). Eles podem ser utilizados como inoculantes, produtos que contêm microrganismos vivos que, quando aplicados a raiz, superfície do substrato, ou solo, colonizam a rizosfera ou interior da planta e promovem o crescimento vegetal aumentando a disponibilidade de nutrientes primários para a planta hospedeira (Vessey et al., 2003).

O estudo das interações entre plantas e os microrganismos que habitam o seu interior tecidual simbioticamente, conhecidos como endofíticos (Berg et al., 2020), é fundamental,

principalmente quando se considera que a manipulação estratégica representa potencial tecnologia capazes de promover o crescimento vegetal.

Estes microrganismos destacam-se como potencial objeto de maior investigação, não apenas por promoverem o crescimento vegetal, mas também por sua capacidade de atuar como agentes de biocontrole (Glick, 2012; Santoyo et al., 2016), colonizando nichos semelhantes aos dos fitopatógenos e contornando seus efeitos negativos por mecanismos de competitividade.

Essa habilidade é atribuída a tal grupo de microrganismos uma vez que grande parte destes possuem a habilidade de disponibilizar macronutrientes essenciais, como nitrogênio, fósforo e potássio, além de micronutrientes como ferro e zinco (Ramakrishna et al., 2019). Ademais, contribuem para a adaptação das plantas a estresses ambientais por meio da regulação dos níveis de fitohormônios, minimizando reações adversas a condições desfavoráveis, como a alta salinidade (Glick, 2012; Santoyo et al., 2016).

Entre as bactérias endofíticas, o filo Pseudomonadota se mostra como o mais predominante, seguido por Actinomycetota, Bacillota e Bacteroidota. Os gêneros mais comumente estudados como PGPB incluem *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Streptomyces* (Santoyo et al., 2016; Ramakrishna et al., 2019). No entanto, embora a diversidade de bactérias endofíticas seja considerável, a exploração de diferentes gêneros ainda é limitada, o que se dá em grande parte por sua difícil cultivabilidade em laboratório.

Os microrganismos endofíticos são adaptados aos microambientes internos das plantas, tornando-os difíceis de cultivar fora de seu hospedeiro. Os métodos tradicionais de cultivo geralmente falham porque essas bactérias requerem fatores de crescimento específicos e condições ambientais que replicam seu habitat *in vivo*, incluindo nutrientes personalizados, níveis de pH e possivelmente interações simbióticas com a planta hospedeira (Pham & Kim, 2012). Além disso, fatores de estresse, como estresses osmóticos e oxidativos, podem impedir seu crescimento, necessitando de um controle cuidadoso dessas condições para melhorar o sucesso da cultura. Esses ocorrem frequentemente devido às condições artificiais criadas nos laboratórios, que podem não replicar exatamente o microambiente natural dos endófitos dentro da planta hospedeira. Por exemplo, o estresse osmótico pode surgir de concentrações inadequadas de sais ou outros solutos no meio de cultura, enquanto o estresse oxidativo pode ocorrer devido à presença de níveis elevados de oxigênio reativo, como peróxidos ou radicais livres, no ambiente de incubação (Taskila, 2010).

Nessa perspectiva, ampliar o cultivo bacteriano para aqueles endofíticos que são de difícil cultivabilidade é fundamental para a construção de um banco de conhecimento

aprofundado sobre esse grupo de microrganismos, permitindo a compreensão das suas características fisiológicas e, conseqüentemente, facilitando seu aproveitamento em aplicações biotecnológicas (Fonseca et al., 2017).

Dentre os fatores relevantes para análise da promoção de crescimento vegetal, destacam-se genes e enzimas associados à fixação biológica de nitrogênio (FBN), síntese de ácido indol-acético (AIA) e produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminase, todos notórios por desempenharem papéis cruciais na promoção do crescimento vegetal (de Oliveira et al., 2012; Blaha et al., 2006; Gaby et al., 2012).

Microrganismos fixadores de nitrogênio desempenham um papel crucial na ecologia global, mediando a principal fonte biológica de nitrogênio fixado biologicamente na biosfera. Estes microrganismos, incluindo bactérias e archaeas, possuem a capacidade de realizar a conversão enzimática do gás dinitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), que é fundamental para a biossíntese de macromoléculas celulares, como aminoácidos e ácidos nucleicos, essenciais para o crescimento e manutenção celular (Mehta et al., 2003).

O processo de fixação biológica de nitrogênio é catalisado pela enzima nitrogenase, que possui múltiplas subunidades estruturais codificadas pelos genes *nifH*, *nifD* e *nifK*. Em especial, o gene *nifH*, que codifica a subunidade redutase da nitrogenase, é amplamente utilizado como marcador molecular em estudos de bioprospecção para identificar e caracterizar microrganismos fixadores de nitrogênio (Gaby et al., 2012). A identificação do *nifH* em bactérias isoladas sugere um potencial significativo para contribuir ao ciclo do nitrogênio e, por conseguinte, ao crescimento vegetal, especialmente em ambientes agrícolas.

Outro aspecto relevante ao estudar o potencial dos microrganismos para promover o crescimento de plantas é a presença do gene *acdS*, responsável pela codificação da enzima ACC deaminase. Essa enzima catalisa a conversão do ácido ACC em amônia e α -cetobutirato, reduzindo a concentração de ACC na planta, precursor direto do hormônio etileno (Etesami et al., 2020). O etileno, em concentrações elevadas, pode inibir o crescimento radicular; portanto, microrganismos que expressam ACC deaminase têm o potencial de mitigar esses efeitos, promovendo o alongamento radicular e o aumento da área de absorção de água e nutrientes (Blaha et al., 2006).

Além da fixação de nitrogênio e da degradação do ACC, a produção de auxinas, especialmente o AIA, por microrganismos também é um fator crítico na promoção do crescimento vegetal. Auxinas são hormônios vegetais envolvidos no desenvolvimento das raízes, e a produção exógena por bactérias pode induzir a formação de mais pêlos radiculares e aumentar a captação de nutrientes essenciais do solo (Mohite, 2013).

Ao cultivar e entender os microrganismos que possuem estas características, ampliam-se as condições para a criação de inoculantes que aumentem a resiliência das culturas a condições climáticas extremas, uma necessidade urgente em face das mudanças climáticas e da degradação do solo em várias regiões do mundo (Yadav et al., 2017). No entanto, esse desenvolvimento é limitado pela baixa diversidade capturada em cultivo laboratorial, necessitando de maiores esforços nessa frente para caracterizar e utilizar melhor a biodiversidade endofítica.

1.2 Seleção e caracterização molecular de bactérias endofíticas isoladas

Para expandir o repertório conhecido de microrganismos endofíticos, primeiramente as amostras vegetais são coletadas e esterilizadas em sua superfície externa, garantindo que os microrganismos observados sejam primariamente endofíticos (Kandel et al., 2017). O processo de esterilização de superfície normalmente envolve o uso de etanol e hipoclorito de sódio, em concentrações específicas para remover bactérias epífitas e, ao mesmo tempo, poupar a população endofítica nos tecidos vegetais. Há otimização de protocolos com concentrações variadas; por exemplo, uma combinação de hipoclorito de sódio a 4% com etanol a 75% foi considerada eficaz para esterilizar tecidos vegetais como *Psidium guajava* e *Hibiscus rosa-sinensis* (Muhtari et al., 2024). Ajustes para plantas específicas, como a adição de 0,1% de cloreto mercúrico para superfícies mais resistentes, ajudam a garantir uma desinfecção completa (Sahu et al., 2022). Para refinar ainda mais a esterilização, são utilizados surfactantes, como o Tween 20, para penetrar mais profundamente nas superfícies das plantas, e técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica, para verificar a ausência de contaminantes superficiais e confirmar a presença de endófitos internalizados (Silva-Cardoso et al., 2024). A esterilização ideal aumenta a pureza e a precisão do isolamento de endófitos. Em seguida, essas amostras passam por técnicas de cultivo seletivo para favorecer o crescimento dos endófitos, que são então isolados para posterior identificação. Nessa etapa, as limitações de cultivo discutidas anteriormente levam a predominância de gêneros específicos, como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea* e *Microbacterium* (Santoyo et al., 2016; Ramakrishna et al., 2019). A recorrência dessas cepas em estudos baseados em cultivo restringe a descoberta de novas cepas potencialmente mais promissoras, que seguem pouco exploradas ou ainda desconhecidas.

Há indicação na literatura que a diversidade microbiana associada às plantas é muito mais ampla do que o pequeno grupo de espécies frequentemente utilizadas em experimentos de promoção de crescimento vegetal. Estudos como o de Velázquez-Sepúlveda e colaboradores

(2012) evidenciam que métodos tradicionais baseados em cultivo conseguem identificar apenas uma fração da microbiota, como gêneros predominantes em ambientes rizosféricos, incluindo *Pseudomonas* e *Bacillus*. Contudo, o mesmo estudo, ao empregar a amplificação de genes 16S rDNA, revelou a presença de classes de bactérias dificilmente cultiváveis, como Deltaproteobacteria e *Clostridia*, que representam uma parcela significativa da comunidade microbiana e desempenham funções ecológicas críticas. A análise molecular destacou que muitas dessas bactérias não podem ser isoladas ou estudadas em laboratório devido às exigências específicas de cultivo, frequentemente desconhecidas. Essa limitação também foi ressaltada por Santana e colaboradores (2017), que utilizou métodos baseados em DNA genômico para caracterizar bactérias endofíticas de cacauzeiros, evidenciando a importância de métodos independentes de cultivo para ampliar o escopo da análise microbiana. Assim, enquanto métodos de cultivo identificam microrganismos de interesse agrícola imediato, abordagens moleculares revelam uma biodiversidade oculta, incluindo potenciais novos microrganismos com aplicações biotecnológicas

Sob essa ótica, ressalta-se novamente a importância da caracterização filogenética de novas espécies que sejam, de fato, cultiváveis isoladas de amostras ambientais (Thangavelu et al., 2022). Tal abordagem não só permite a descoberta de novas espécies e linhagens em um campo já limitado pela cultivabilidade, como também amplia o entendimento sobre a diversidade microbiana e seu potencial biotecnológico. Ademais, viabiliza o desenvolvimento de novas aplicações práticas a partir de microrganismos já conhecidos, aumentando as possibilidades de uso em diversas áreas biotecnológicas.

Este processo de identificação de possíveis novas espécies bacterianas precisa, entretanto, ser submetido a critérios específicos para ter sua validade determinada. Uma nova espécie é tipicamente considerada quando uma bactéria isolada apresenta características fenotípicas e genotípicas distintas em comparação com bactérias já descritas (Ali, 2023). Métodos tradicionais, como testes bioquímicos e isolamento de culturas puras, são inadequados quando utilizados sozinhos para estimar o perfil filogenético de bactérias isoladas em amostras ambientais, mesmo em relação a microrganismos cultiváveis. Esses métodos dependem fortemente da avaliação de características fenotípicas como capacidades metabólicas, atividades enzimáticas e traços morfológicos, que podem não se diferenciar claramente entre diferentes espécies ou estirpes, resultando em baixa precisão na determinação da identificação das bactérias analisadas (Manias et al., 2020). Além disso, essas metodologias são intensivamente consumidoras de tempo e trabalho, dificultando ainda mais o processo de identificação (Ferone et al., 2020).

Dessa forma, técnicas que objetivam a caracterização genômica para a diferenciação de espécies e estirpes são entendidas como complementos necessários para determinar a filogenia desses microrganismos. Métodos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), combinada com o sequenciamento do gene codificante da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA), são amplamente utilizadas para traçar perfis filogenéticos, mesmo que de forma inicial, de organismos procarióticos. Esse gene possui regiões altamente conservadas, permitindo a ancoragem de iniciadores universais, e apresenta regiões hipervariáveis espécie-específicas (Manias et al., 2020).

Até recentemente um isolado bacteriano apresentava menos de 97% de similaridade em seu gene 16S rRNA com qualquer espécie descrita, este se tornava candidato a uma nova espécie (Almaki et al., 2016), enquanto uma janela de 99-99.5% era utilizada para a diferenciação de estirpes de uma mesma espécie (Beye et al., 2017). Contudo, hoje sabe-se que não é possível atribuir um valor de corte que represente de fato a diferenciação entre espécies com base na similaridade do gene que codifica o 16S rRNA, pois há grande variabilidade nos níveis de similaridades entre grupos bacterianos (Kim et al., 2014). Apesar disso, o sequenciamento dessa região e sua comparação com bancos de dados pré-existentes pode gerar percepções valiosas sobre bactérias cultivadas ainda não identificadas.

Esses parâmetros decorrem de estudos iniciais comparando 16S rRNA com hibridização DNA-DNA e posteriormente com a identidade média de nucleotídeos (ANI) como referências (Kim et al., 2014). Embora estes limiares tenham sido derivados de extensas análises comparativas entre espécies bacterianas, eles não se aplicam universalmente, uma vez que certos gêneros, como o *Mycobacterium*, mostram inconsistências de similaridade de sequência devido à variação genética específica da linhagem, excedendo 98,65% de similaridade sem representar a mesma espécie e destacando que os valores limite podem variar dependendo da divergência evolutiva dentro de um gênero (Beye et al., 2017; Li et al., 2020).

Além disso, estudos em cianobactérias e outros grupos refinaram estes limites, sugerindo que uma similaridade de 99% pode ser necessária para detectar espécies crípticas ou linhagens geneticamente semelhantes, mas ecologicamente distintas (Li et al., 2020). Esta variação de limiar destaca que, embora a faixa de 97% a 98,65% seja uma diretriz geral, estudos específicos de linhagens são essenciais para garantir uma classificação taxonômica precisa (Li et al., 2020). Consequentemente, os limiares de similaridade entre genes 16S rRNA são melhores vistos como diretrizes flexíveis, com valores específicos ajustados com base nas características evolutivas de cada grupo bacteriano que permitem certa sensibilidade e especificidade na identificação desses

microrganismos, sejam cultiváveis ou não, ao nível de espécie ou até mesmo de estirpe (Passari et al., 2018).

Além disso, a utilização do MALDI-TOF (do inglês, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) tem se destacado na microbiologia devido à sua alta eficiência na identificação e caracterização de microrganismos a partir de perfis proteômicos específicos. Essa metodologia permite gerar uma “impressão digital” proteômica para cada microrganismo, baseada nas proteínas ribossomais predominantes, o que facilita a diferenciação precisa entre espécies e cepas similares, complementando e corroborando os dados obtidos por técnicas adicionais (Shastry et al., 2020). Essa abordagem também se mostra vantajosa para identificação inicial ao evitar processos longos de análise do perfil bacteriano, reduzindo significativamente o tempo de resposta para identificação microbiana, sendo capaz de processar dezenas de amostras em poucas horas (Clark et al., 2013). Esse nível de resolução também auxilia na construção de bancos de dados de proteínas que são essenciais para análises comparativas e para a descoberta de novas estirpes com propriedades promissoras, integrando-se eficientemente com abordagens de sequenciamento e enriquecendo o panorama da diversidade microbiana em ecossistemas específicos.

No entanto, a precisão do MALDI-TOF pode ser limitada pela sobreposição espectral e pela qualidade das bibliotecas de referência, especialmente quando se trabalha com espécies raras ou intimamente relacionadas. Quando os bancos de dados de referência não têm diversidade suficiente ou não representam adequadamente determinados grupos bacterianos, a capacidade do MALDI-TOF de distinguir com precisão entre organismos estreitamente relacionados pode ser comprometida. Isso é particularmente relevante em gêneros complexos, onde pequenas variações proteicas podem resultar em classificações incorretas (Strejcek et al., 2018). Nesse contexto de aplicabilidade ambiental, é recomendada a combinação do MALDI-TOF com abordagens baseadas em DNA, para garantir maior precisão, especialmente no caso de isolados raros ou recentemente descobertos. Seu uso

A exploração de endofíticos, especialmente as PGPB, revela um potencial significativo para a biotecnologia agrícola sustentável. A bioprospecção e a caracterização filogenética de novas espécies endofíticas são essenciais para expandir o repertório de microrganismos disponíveis para uso como inoculantes, melhorando a produtividade das culturas e a resistência a estresses ambientais. Métodos moleculares avançados, como o sequenciamento do gene 16S rRNA, juntamente com abordagens complementares como o MALDI-TOF, são cruciais para a caracterização filogenética de endofíticos isolados a partir de amostras ambientais, uma vez que permitem uma identificação precisa e uma compreensão mais profunda do seu perfil molecular.

Com o avanço contínuo dessas técnicas, a exploração de microrganismos endofíticos pode revolucionar a agricultura, oferecendo soluções eficazes e sustentáveis para os desafios globais de produção de alimentos e gestão ambiental. A escolha de cepas oriundas de ambientes desafiadores, como aquelas associadas a plantas halófitas, como a *Atriplex nummularia*, pode facilitar a seleção de microrganismos aptos a prosperar e contribuir para os vegetais em condições adversas.

1.3 A microbiota da halófita *Atriplex nummularia* e seu potencial promotor de crescimento vegetal

O gênero *Atriplex*, que inclui mais de 400 espécies vegetais, é amplamente encontrado em regiões áridas e semiáridas ao redor do mundo, sendo conhecido por sua adaptação a solos salinos. A *A. nummularia*, conhecida como erva-sal, é uma das espécies mais representativas desse gênero, e é classificada como uma planta halófita facultativa, ou seja, é capaz de sobreviver tanto em solos com alta salinidade quanto em solos com baixa concentração de sal. Essa habilidade se deve a dois mecanismos principais: o acúmulo de sais em seus tecidos, especialmente nas folhas, e a expulsão ativa de sais por glândulas especializadas. Esses mecanismos permitem que a planta tolere condições de seca e salinidade extremas (Kelley et al., 1982; Freire et al., 2016).

Há um grande potencial na captação e exploração biotecnológica de ambientes extremos similares ao que abriga tal espécie halófita. A produção de fitohormônios como AIA, associado ao crescimento radicular, auxilia no aumento da superfície de contato destas raízes com o solo, permitindo que as plantas tenham acesso facilitado a regiões de menor salinidade (Ahmad et al., 2023). Esses microrganismos podem, em adição, produzir e/ou estimular o acúmulo de osmoprotetores como prolina, glicina betaína e trealose nos tecidos vegetais. Esses compostos estabilizam as estruturas celulares e mantêm o equilíbrio hídrico, permitindo que as plantas sobrevivam ao estresse osmótico causado pela alta salinidade (Tomulescu, 2022). Ainda, certas bactérias sequestram ou excluem ativamente íons de sódio (Na^+) da rizosfera ou de suas próprias células, reduzindo os efeitos tóxicos na planta. Este tamponamento iônico evita danos às vias metabólicas das plantas (Sánchez-Mendoza et al., 2022).

Tais atributos, que aparentam ter relação com a resiliência à salinidade, tornam bactérias bioprospectadas a partir de halófitas candidatas especialmente interessantes para produção de inoculantes. Por exemplo, ensaios com espécies de *Halomonas* e *Bacillus* em solos salinos demonstraram aumento da produção de trigo e arroz, ao mesmo tempo que reduziram a

dependência de fertilizantes químicos, tornando esta uma estratégia agrícola sustentável (Shurigin et al., 2022; Ahmad et al., 2023).

O desenvolvimento de biotecnologias agrícolas que exploram a microbiota de espécies halófitas como a *A. nummularia*, oriunda de um ambiente desafiador, apresenta um potencial sustentável significativo para produção de tecnologias promotoras de crescimento. Ao isolar e aplicar tais microrganismos, é possível criar inoculantes que aumentam a resiliência das culturas a condições climáticas extremas, uma necessidade urgente em face das mudanças climáticas e da degradação do solo em várias regiões do mundo (Yadav et al., 2017).

Entretanto, poucos estudos focaram especificamente na microbiota dessas espécies vegetais. Há a investigação na literatura em relação à espécies bacterianas associadas a *Atriplex canescens* e *Atriplex torreyi*, a partir de cultivo asséptico e sequenciamento massivo do gene 16S rRNA, revelando que a predominância de gêneros bacterianos *Staphylococcus* e *Beijerinckia*, enquanto outros gêneros, como *Geobacillus*, *Clostridium*, *Escherichia* e *Sporobacter*, foram detectados em níveis muito baixos (Lucero, Mary E., et al., 2011).

Estudos específicos sobre a microbiota da *A. nummularia* revelam que essa planta possui comunidades bacterianas distintas em diferentes compartimentos, como folhas, raízes e solo rizosférico, variando de acordo com as características edafoclimáticas dos locais onde cresce. Os gêneros comuns identificados incluem *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*, todos conhecidos por seus papéis na promoção do crescimento de plantas e na tolerância ao estresse salino (Monteiro et al., 2022).

Em solos salinizados do nordeste brasileiro, onde a erva-sal foi analisada, verificou-se que a composição da microbiota endofítico foliar é mais influenciado pela planta hospedeira, enquanto a microbiota do solo reflete fatores ambientais externos. Já a comunidade microbiana das raízes é influenciada tanto pela planta quanto pelo ambiente, criando um gradiente de complexidade onde o solo hospeda uma diversidade microbiana maior que as raízes e folhas (Monteiro et al., 2022).

Essa estruturação microbiana ressalta o papel adaptativo da microbiota em ambientes de salinidade elevada, essencial para a sobrevivência e crescimento de halófitas. Apesar da escassez de estudos sobre a microbiota de plantas do gênero *Atriplex*, suas comunidades microbianas apresentam um potencial considerável para contribuir na adaptação das plantas a estresses abióticos, modulando processos fisiológicos e bioquímicos (Kavamura et al., 2013; Moreira e Cardoso, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

Diante do crescimento populacional projetado para as próximas décadas, e dos impactos negativos das mudanças climáticas na produtividade agrícola, torna-se crucial buscar soluções inovadoras para garantir a segurança alimentar. Eventos meteorológicos extremos, temperaturas elevadas, períodos prolongados de seca e a salinização dos solos ameaçam reduzir a capacidade de produção e qualidade das culturas agrícolas. Esses desafios exigem a adoção de uma abordagem multifacetada, baseada no uso de tecnologias sustentáveis, na reavaliação da aplicação de práticas agrícolas tradicionais e na implementação de novas estratégias biotecnológicas.

Na procura de soluções promissoras, destaca-se o potencial da exploração e inoculação vegetal com bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal. Essa abordagem pode melhorar a resiliência das plantas a estresses ambientais. Dessa forma, é fundamental cultivar e identificar novas linhagens de bactérias endofíticas capazes de se associar a plantas em ambientes extremos, priorizando a expansão do reservatório de espécies utilizadas no desenvolvimento de inoculantes, que é caracterizado atualmente pela alta redundância taxonômica e dificuldades na aplicação em campo e em escala comercial.

Em 2020, o Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (LABEM) isolou mais de 700 espécies de bactérias endofíticas da *A. nummularia* provenientes de áreas salinizadas do Nordeste brasileiro. Esse processo de bioprospecção utilizou raízes e folhas da planta como fonte de inóculo, que foi cultivado em diversos meios de cultura, incluindo um meio alternativo feito a partir do extrato da própria planta, revelando um amplo e inédito potencial biotecnológico a ser explorado. Contudo, boa parte dos microrganismos selecionados permaneceu sem identificação, sendo necessário o uso de técnicas moleculares para fazer a descrição da diversidade associada a essa planta. Assim, o presente projeto se propõe a expandir o estudo da microbiota vegetal, identificando aqueles microrganismos com traços PGPBs que ainda não haviam sido caracterizados.

Investir em práticas inovadoras é crucial para enfrentar os desafios agrícolas futuros, e apenas através da integração de novas biotecnologias e abordagens sustentáveis é possível garantir uma agricultura resiliente e eficiente, capaz de assegurar a segurança alimentar em um cenário de aumento das mudanças climáticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Caracterização taxonômica de estirpes contendo traços promotores de crescimento vegetal isoladas da halófito *A. nummularia* de solos salinizados do Nordeste brasileiro, catalogando o banco de estirpes do laboratório.

3.2 Objetivos específicos

1. Seleção de estirpes isoladas de *A. nummularia*, estocadas em ultrafreezer no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana (LABEM), que apresentam traços promotores de crescimento testados previamente, para os próximos passos;
2. Identificação de bactérias selecionadas através da utilização da técnica MALDI-TOF;
3. Sequenciamento, através da técnica de Sanger, do gene 16S rRNA a partir do DNA extraído de bactérias não identificáveis através da técnica de MALDI-TOF;
4. Composição de árvore filogenética e tabela de espécies isoladas de *A. nummularia*, através do sequenciamento do gene 16S rRNA e MALDI-TOF.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Identificação de banco de estirpes isoladas de *Atriplex nummularia* por MALDI-TOF

Foram selecionadas 81 estirpes isoladas de *A. nummularia* testadas anteriormente por outros membros do grupo de pesquisa com pelo menos um traço promotor de crescimento vegetal, como a presença dos genes *nifH*, *acdS*, e/ou capacidade de síntese de ácido indol-acético (AIA). Bactérias proveniente das raízes estão codificadas pela letra R seguida de seu número de identificação, enquanto isolados de folha estão codificadas pela letra F seguida de seu número.

Estes microrganismos foram submetidos, em duplicata, a identificação utilizando o MALDI-TOF. Para isso, as bactérias estocadas no freezer a -80 °C foram descongeladas e reativadas através do cultivo em ágar triptona de soja (TSA) à 30°C por 24h. Aquelas que não apresentaram crescimento inicial foram submetidas a uma etapa extra de cultivo em Caldo Triptona Soja (TSB), prescindindo aquele em meio sólido.

Uma pequena porção da massa microbiana cultivada em placas de petri foi colhida com a ponta de um palito de madeira e aplicada até homogeneização em três regiões delimitadas de uma placa metálica de 96 pontos. Após a aplicação das colônias na superfície, foi aplicado 1µL de ácido fórmico (70%) em cada amostra. Em seguida, mediante a secagem do primeiro reagente, foi depositado 1µL de matriz CHCA (alfa-ciano-4-hidroxicinâmico), com concentração de 10 mg/mL. A placa metálica foi inserida no equipamento de MALDI-TOF, e as análises de identificação foram conduzidas conforme o procedimento recomendado pelo fabricante.

Os dados foram gerados utilizando o MALDI-TOF do modelo Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), localizado no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM, CCS, UFRJ), onde foram processados por dois programas distintos. Um deles, flexControl™ (Bruker®, Alemanha), capacita-se na configuração e operação dos espectrômetros de massa, enquanto o segundo, MALDI Biotyper® (Bruker®, Alemanha), é especializado na interpretação e identificação de microrganismos com base nos espectros obtidos.

A interpretação dos resultados foi feita a partir da avaliação do *score value*, variando de 1,700 a 3,000, o qual reflete o grau de correspondência de qualidade entre os espectros das amostras e aqueles presentes no banco de dados (Quadro 1). A partir desses valores atribuídos a cada bactéria, foi feita a divisão deste em 2 grupos. O primeiro, referente àquelas que obtiveram *score value* entre 3.000 e 2.000, foram considerados adequadamente identificados e foram incorporados ao banco de dados do laboratório. O segundo grupo inclui aquelas com *score value*

entre 1.999 ... 0.000. Estas foram submetidas a identificação por sequenciamento genético, conforme descrito no tópico a seguir (Figura 1).

Quadro 1 - Faixa de valores e interpretação do *score value* retirada do aparelho MALDI-TOF.

Faixa	Interpretação
2.300...3.000	Identificação de espécies altamente provável
2.000...2.299	Identificação segura de gênero, identificação provável de espécie
1.700...1.999	Provável identificação de gênero
0.000...1.699	Identificação não confiável

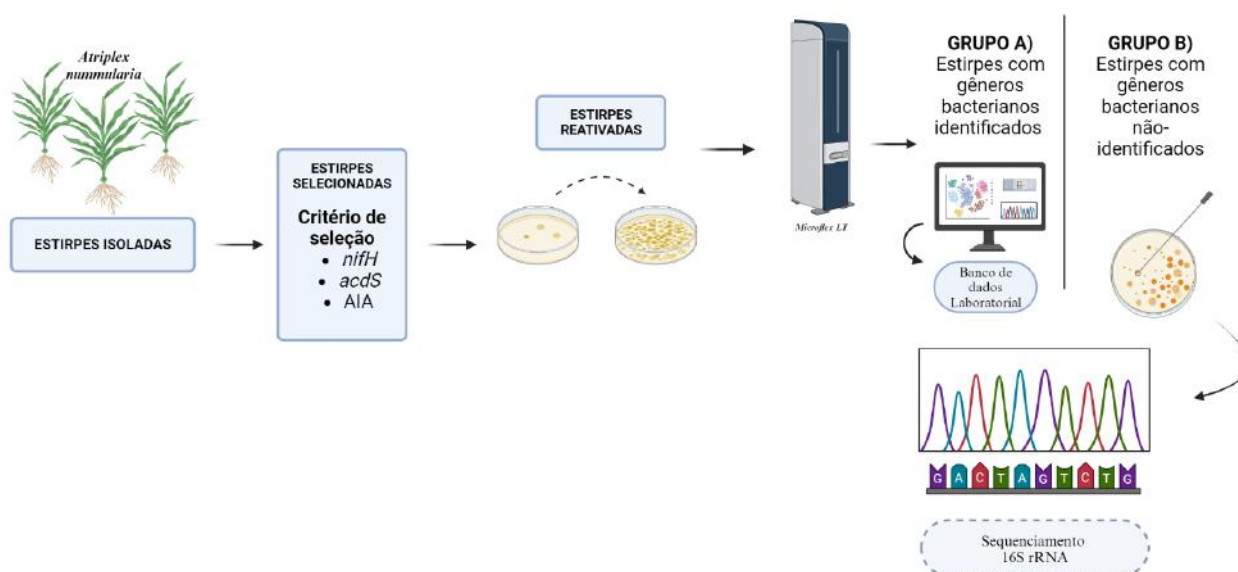


Figura 1: Processo de seleção, reativação, análise e identificação das estirpes bacterianas isoladas de *A. nummularia*, destacando as etapas de triagem por traços de interesse, análise por MALDI-TOF e sequenciamento do gene 16S rRNA para isolados de gênero não identificado.

4.2. Extração do DNA genômico e PCR para amplificação do gene 16S rRNA

Bactérias submetidas ao sequenciamento genético foram descongeladas e reativadas conforme descrito anteriormente. Após o crescimento, as culturas foram submetidas a extração do seu material genético através do kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo as orientações do fabricante.

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada utilizando o material genético extraído através de reações de PCR com um volume final de 50 μ L, utilizando os iniciadores universais 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3') (1 μ L) e 1492r (5'-TAC GGC TAC CTT GTT

ACG ACT T-3') (1 μ L) (Lane et al., 1991), GoTaq® G2 Master Mixes (Promega) (25 μ L), água mili-Q estéril (22,5 μ L) e amostra de DNA (0,5 μ L).

As reações se deram utilizando um termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA), em um ciclo de aquecimento inicial da solução a 94°C durante 3 minutos. Em seguida, foram realizados 30 ciclos de desnaturação do DNA a 94 °C por 30 segundos, hibridação dos iniciadores à 50 °C por 30 segundos, e extensão do DNA a 72 °C por 1 minuto e 40 segundos. Após a conclusão da PCR, as amostras foram preservadas a -20°C e a amplificação verificada por análise de eletroforese em gel de agarose (2% agarose, 70-150 volts, 20 minutos). A purificação do material obtido foi feita utilizando o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), de acordo com as orientações do fabricante, e a quantificação do produto purificado através do fluorímetro Qubit® (Invitrogen, EUA).

4.3 Sequenciamento e análise do gene que codifica a subunidade 16S rRNA

Os fragmentos de DNA extraídos foram encaminhados para Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA), localizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS/UFRJ, para o sequenciamento do gene 16S rRNA através do método de Sanger, com os iniciadores 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) (Caporaso et al., 2011), 927R (CCGTCAATTCMTTTRAGT) (Lane et al., 1991), e 785F (Klindwort et al., 2013). (GGATTAGATACCCBGGTAGTC).

O sequenciamento foi seguido por uma análise de bioinformática realizada utilizando o software UGENE (v2, Ugene Team, Rússia). As sequências obtidas foram processadas para a montagem de *contigs*, utilizando o comando *sequence quality trimmer*, com um limiar de 30. A montagem foi realizada utilizando o algoritmo CAP3. Aquelas em que a montagem pelo algoritmo não foi possível, foi realizada a tentativa de montagem manual, através da sobreposição das sequências. As sequências montadas foram separadas em dois grupos: aquelas com tamanho superior a 785 pares de bases (pb) e as menores que este limite. As sequências com mais de 785 pb foram utilizadas tanto para a construção da árvore filogenética. Para a montagem da árvore, essas sequências foram alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW. A árvore foi construída pelo método de Maximum Likelihood (ML), com suporte estatístico baseado em 1000 replicações de *bootstrap*, garantindo a confiabilidade dos agrupamentos filogenéticos. Para cada *contig*, foi realizado o download de duas sequências de referência mais similares, através do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information), e incorporados na árvore.

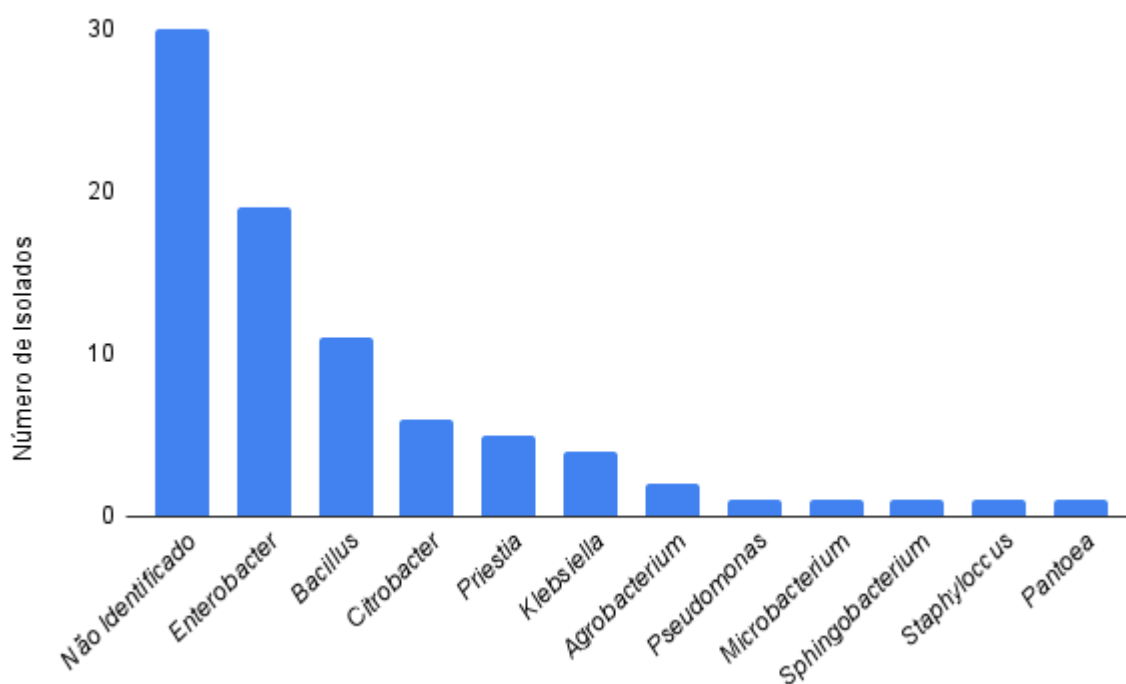
Sequências menores que 785 pb foram analisadas de forma diferenciada: foi utilizado o maior fragmento de *contig* gerado ou, na ausência disso, o maior fragmento individual obtido a partir do sequenciamento com os três *primers* distintos. Essas sequências, e também as maiores que 785 pb, foram submetidas ao algoritmo BLAST para identificação no banco de dados NCBI. O melhor alinhamento (*best hit*), com base na maior homologia e menor *e-value*, foi registrado e utilizado para identificar os isolados.

5. RESULTADOS

5.1 Seleção, reativação e identificação de banco de estirpes isoladas de *Atriplex nummularia* por MALDI-TOF

Foram selecionadas 81 estirpes bacterianas, com a presença dos genes *nifH* e/ou *acdS*, e/ou capacidade de síntese de AIA, para o desenvolvimento do projeto. Essas foram reativadas com sucesso e submetidas à análise por MALDI-TOF (Anexo 1). Dessas, 72 foram isoladas das raízes e 19 das folhas de *Atriplex nummularia*.

A classificação preliminar (Figura 2; Tabela 1), feita através do MALDI-TOF, revelou a seguinte distribuição de gêneros bacteriano: Não identificado (30), *Enterobacter* (19), *Bacillus* (11), *Klebsiella* (4), *Pantoea* (1), *Priestia* (5), *Citrobacter* (6), *Pseudomonas* (1), *Microbacterium* (1), *Sphingobacterium* (1), *Agrobacterium* (1) e *Staphylococcus* (1). Dos isolados não classificáveis (30), 26 seguiram para o sequenciamento pela metodologia de Sanger do gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal.



Do ponto de vista de filo, o filo Pseudomonadota foi predominante devido à alta frequência de gêneros da família Enterobacteriaceae, além de outros gêneros como *Pantoea* (F102, R342) e *Agrobacterium* (R34, R395). O filo Bacillota apresentou ampla contribuição, com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Priestia*. O filo Actinomycetota, embora menos representado, incluiu isolados como *Glutamicibacter* sp. (R139, R159, R389). Apesar da

identificação eficiente em muitos casos, um número significativo de isolados (Figura 2) permaneceu não identificável, evidenciando limitações no método para determinados grupos taxonômicos ou condições de amostra.

No nível de família, os isolados da família Enterobacteriaceae (F153, F353, R335) demonstraram uma ampla diversidade de gêneros e espécies, evidenciando a predominância desse grupo. Além disso, a família Bacillaceae foi bem representada por isolados como *Priestia megaterium* (F300, R132, R181, R297, R390) e várias ocorrências de *Bacillus subtilis*. Outras famílias, como Microbacteriaceae (R157) e Sphingobacteriaceae (com *Sphingobacterium multivorum*, R322), também foram identificadas.

A análise dos isolados submetidos à identificação de consenso taxonômico, utilizando os dados obtidos através do MALDI-TOF, revelou uma diversidade significativa, abrangendo identificações ao nível de espécie, gênero e família, além de alguns isolados não identificáveis (Tabela 1). Dentre os gêneros observados, *Enterobacter* foi o mais representativo, com isolados como *Enterobacter bugandensis* (R99, R108, R118, R341, R389, R400), *Enterobacter ludwigii* (R246) e outros identificados como *Enterobacter sp.* (R89, R285, R292, R298, R306, R325, R327, R334, R348, R359, R381, R391). O gênero *Bacillus* também se destacou, especialmente com *Bacillus subtilis*, identificado em isolados como F22, F283, R7, R101, R111, R122, R246, R272, R273, R278 e R295. Outros gêneros importantes incluem *Citrobacter*, com *Citrobacter freundii* (R13, R77, R94) e *Citrobacter sp.* (R321, R342), além de *Klebsiella*, representada por *Klebsiella pneumoniae* (F182), *Klebsiella aerogenes* (R148, R300, R307) e *Klebsiella sp.* (R242).

Tabela 1. Consenso taxonômico relativo às estirpes submetidas ao MALDI-TOF

Isolado	Consenso Taxonômico	Grau de Taxonomia
F22	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
F102	<i>Pantoea ananatis</i>	Espécie
F283	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Espécie
F153	Enterobacteriaceae	Família
F353	Enterobacteriaceae	Família
F182	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Espécie
F268	<i>Pseudomonas sp.</i>	Gênero
F300	<i>Priestia megaterium</i>	Espécie

F120	Não identificável	-
F244	Não identificável	-
F208	Não identificável	-
F237	Não identificável	-
F241	Não identificável	-
F263	Não identificável	-
F269	Não identificável	-
F301	Não identificável	-
F317	Não identificável	-
F320	Não identificável	-
F321	Não identificável	-
R74	<i>Bacillus sp.</i>	Gênero
R7	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R101	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R111	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R122	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R246	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R272	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R273	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R278	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R295	<i>Bacillus subtilis</i>	Espécie
R13	<i>Citrobacter freundii</i>	Espécie
R77	<i>Citrobacter freundii</i>	Espécie
R94	<i>Citrobacter freundii</i>	Espécie
R301	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Espécie
R321	<i>Citrobacter sp.</i>	Gênero
R342	<i>Citrobacter sp.</i>	Gênero
R97	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Espécie
R108	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Espécie
R118	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Espécie
R400	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Espécie
R341	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Espécie
R389	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Espécie
R246	<i>Enterobacter ludwigii</i>	Espécie
R285	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero

R292	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R298	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R306	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R325	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R327	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R334	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R348	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R359	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R381	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R391	<i>Enterobacter sp.</i>	Gênero
R335	Enterobacteriaceae	Família
R34	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Espécie
R395	<i>Agrobacterium sp.</i>	Gênero
R132	<i>Priestia megaterium</i>	Espécie
R181	<i>Priestia megaterium</i>	Espécie
R297	<i>Priestia megaterium</i>	Espécie
R297	<i>Priestia megaterium</i>	Espécie
R139	<i>Glutamicibacter sp.</i>	Gênero
R159	<i>Glutamicibacter sp.</i>	Gênero
R389	<i>Glutamicibacter sp.</i>	Gênero
R148	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Espécie
R242	<i>Klebsiella sp.</i>	Gênero
R300	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Espécie
R307	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Espécie
R157	<i>Microbacterium sp.</i>	Gênero
R253	<i>Staphylococcus sp.</i>	Gênero
R322	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Espécie
R322	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Espécie
R323	<i>Kosakonia sp.</i>	Gênero
R8	Não identificável	-
R36	Não identificável	-
R115	Não identificável	-
R190	Não identificável	-
R213	Não identificável	-
R255	Não identificável	-
R281	Não identificável	-

R288	Não identificável	-
R309	Não identificável	-
R311	Não identificável	-
R314	Não identificável	-
R324	Não identificável	-
R334	Não identificável	-
R342	Não identificável	-
R349	Não identificável	-
R365	Não identificável	-
R383	Não identificável	-
R397	Não identificável	-
R417	Não identificável	-

5.2 Sequenciamento e análise de bioinformática do gene 16S rRNA

Os contigs foram montados a partir das sequências de 16S rRNA, e apenas aqueles com pelo menos 785 pares de bases foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética (Figura 3). Os seguintes isolados foram incluídos, juntamente com duas sequências mais similares obtidas com o uso da ferramenta BLASTn no banco NCBI: F120, R285, R311, R74, R397, R383, R417, R329, R334, R8 e R324 (R: raiz; F: folha).

F269 e F208 agruparam-se com *Bacillus cereus* (NR 074540.1, NR 115526.1, NR 115714.1) e *Bacillus proteolyticus* (NR 157735.1) com suporte moderado (*bootstrap* 57%), indicando relação filogenética possível. Por outro lado, as estirpes F269, F208 e F237 formaram um clado robusto (*bootstrap* 96%) com *Bacillus cereus* (NR 115714.1), *Bacillus tropicus* (NR 157736.1) e *Bacillus nitratreducens* (NR 157732.1).

O R417 apresentou suporte moderado (68%) ao agrupar-se com *Bacillus tropicus* e *Bacillus nitratreducens*, mas teve um agrupamento muito robusto (100%) com *Priestia megaterium* (NR 117473.1) e *Priestia aryabhatai* (NR 115953.1), indicando maior proximidade com este último gênero.

Os isolados R285 e R311 apresentaram-se destacados do clado formado por *Bacillus licheniformis* (NR 074923.1, NR 118996.1), *Bacillus paralicheniformis* (NR 137421.1), *Bacillus haynesii* e *Bacillus piscis*, sugerindo uma relação mais distante e possível divergência evolutiva em relação a esse grupo. Por outro lado, R329 agrupou-se com essas espécies com suporte

moderado (68%), indicando proximidade genética consistente com o clado maior que inclui o complexo *Bacillus licheniformis*.

Já as estripes F320, F244, F241, F301 e F317 formaram agrupamento consistente (84%) com *Bacillus velezensis*, *Calidifontibacillus erzurumensis* e *Bacillus stercoris*, indicando conservação genética. Já F321 mostrou proximidade moderada (59%) com *Pseudomonas glycinae* e *Pseudomonas kribbensis*, mas alta (100%) com *Pseudomonas soyaе*. R8 agrupou-se com espécies de *Enterobacter* e *Pantoea* com suporte de 89%, mas teve suporte baixo (31%) com outras espécies do complexo *Enterobacteriales*. Os isolados F120 e F263 formaram clado robusto (95%) com *Enterobacter wuhouensis* e *Scandinavium goeteborgense*, embora o clado maior tenha suporte fraco (15%).

R74, R334 e F152 apresentaram padrões de agrupamento mais variados e com valores de *bootstrap* baixos (<50%), o que indica uma relação filogenética mais incerta com as espécies próximas utilizadas como referência.

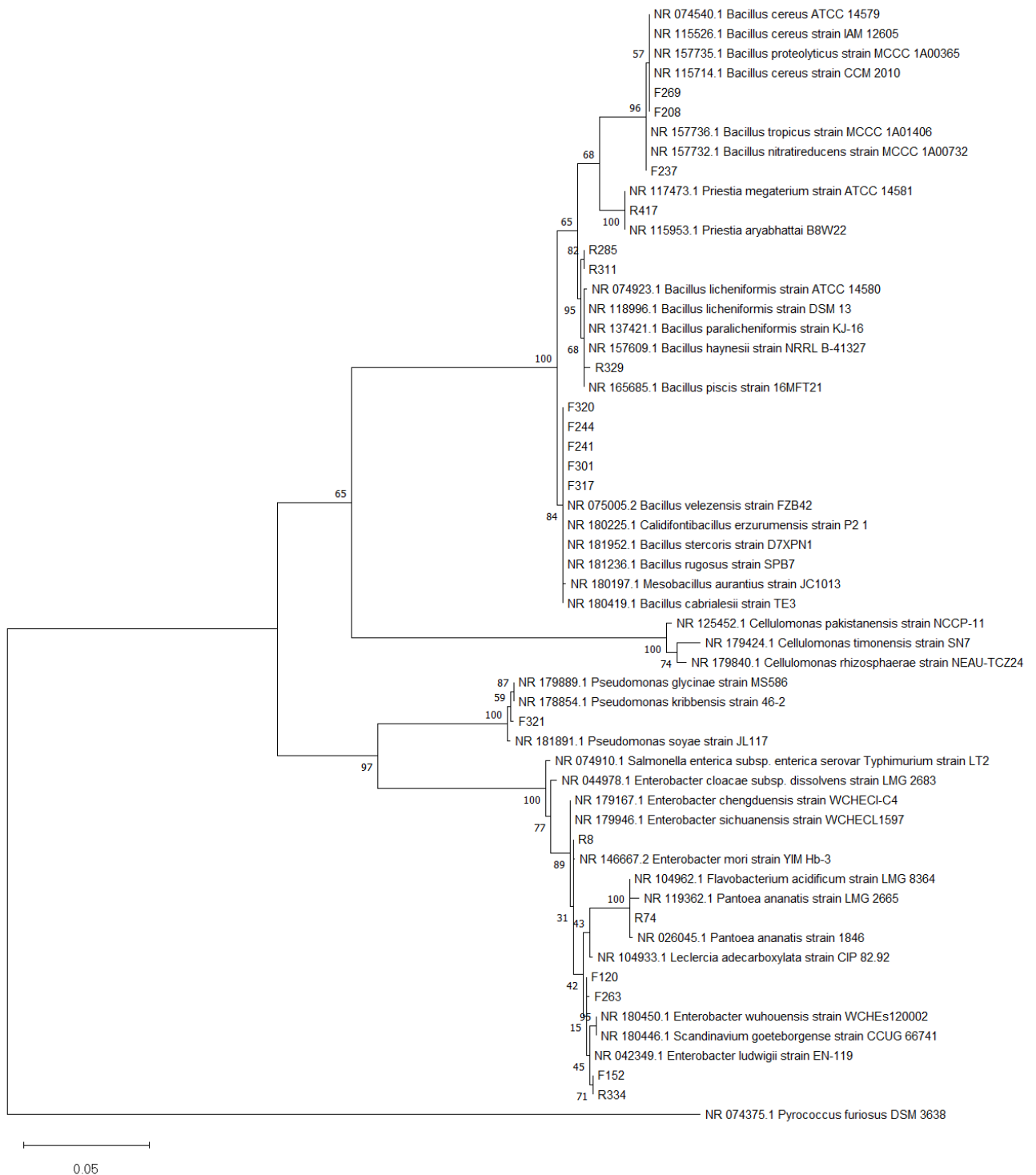


Figura 3. Árvore filogenética de sequências de 16S rRNA inferida por Maximum Likelihood (100 *bootstraps*). As sequências foram alinhadas através do algoritmo ClustalW, e possuem 785 pares de bases. Duas sequências mais próximas de cada isolado foram baixadas através da plataforma NCBI, após a execução de BLAST no banco de dados.

Tabela 2. Análise comparativa de contigs com o banco de dados do NCBI

Isolado	Tamanho (pb)	Sequência mais próxima	Query Cover (%)	% de Identidade	Acesso
F269	1496	<i>Bacillus cereus</i> strain ST06	100%	99,87%	MF496242.1
F208	1496	<i>Bacillus cereus</i> strain NIBSM OsR5	100%	99,80%	KY930705.
R285	1519	<i>Bacillus sonorensis</i> strain 4H8-1	99%	99,60%	OL589555.1
R311	1521	<i>Bacillus aerius</i> strain BAB-2472	99%	99,13%	OL589555.1
F241	1274	<i>Bacillus vallismortis</i> strain KS6	100%	96,55%	KY114489.1
F320	1342	<i>Bacillus sp.</i> strain AAUBC-BGM7	98%	96,29%	MZ577113.1
F317	1020	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 25096	99%	95,05%	OR453686.1
F301	1184	<i>Bacillus stercoris</i> strain D7XPNI	100%	98,12%	AY197613
F244	1110	<i>Bacillus rugosus</i> strain SPB7	100%	97,64%	MK346333
R329	1087	<i>Bacillus sonorensis</i> strain FJAT-46199	100%	94,57%	MK859956.1
F237	1225	<i>Bacillus anthracis</i> strain Pasteur	100%	94,53%	CP076190.1
R385	521	<i>Bacillus velezensis</i> strain FZB42	98%	94,59%	MT762886.1
R255	349	<i>Bacillus tequilensis</i> strain 10b	97%	86,71%	AY197613
R397	896	<i>Bacillus paralicheniformis</i> RSC-3	100%	83,75%	AP023090.1
F152	1510	<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain M004	98%	99,66%	KT462692.1
R8	1420	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100%	99,33%	AF395913.1
F263	1495	<i>Enterobacter asburiae</i> strain RHBSTW-01009	99%	98,86%	CP056126.1
F120	1506	<i>Enterobacter kobei</i> strain Ek72	98%	98,72%	CP088229.1
R327	122	<i>Serratia surfactantfaciens</i> strain YD25	100%	91,87%	CP016948.1
R213	660	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBSI	97%	74,24%	EU036987
F321	1322	<i>Pseudomonas sp.</i> strain B17	99%	99,73%	KY324854.1
R74	1428	<i>Pantoea ananatis</i> LMG 20 m 103	99%	99,23%	CP001875.2
R383	899	<i>Cellulomonas sp.</i> Y8	99%	99,11%	CP041203.1
R417	1511	<i>Priestia megaterium</i> strain H-1 16S	99%	99,93%	KT273285.
R281	546	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain Kp067-M1	100%	96,40%	CP151759.1
R334	1418	<i>Citrobacter amalonaticus</i> strain FDAARGOS_122	99%	97,32%	CP014015.2

Também foi realizada uma análise utilizando o banco de dados BLAST (NCBI) com todas as sequências obtidas após a montagem (Tabela 2), incluindo aquelas que não atingiram o padrão de 785 pares de bases estabelecido para construir a árvore filogenética (Figura 2). Essa seleção possibilitou o aproveitamento das sequências em relação às informações disponíveis em bancos de dados públicos.

O isolado F269, com 1496 pb, foi preliminarmente identificado como *Bacillus cereus* strain ST06, enquanto F208, com o mesmo tamanho, foi associado a *Bacillus cereus* strain NIBSM OsR5, ambos com 100% de cobertura e percentuais de identidade superiores a 99,80%. R285, com 1519 pb, foi relacionado a *Bacillus sonorensis* strain 4H8-1, apresentando 99% de cobertura e 99,60% de identidade. O maior tamanho, de 1521 pb, foi encontrado no isolado R311, atribuído a *Bacillus aerius* strain BAB-2472, com 99% de cobertura e 99,13% de identidade.

O F241, com 1274 pb, foi associado a *Bacillus vallismortis* strain KS6, apresentando 100% de cobertura e 96,55% de identidade. F320, com 1342 pb, foi relacionado a *Bacillus sp.* strain AAUBC-BGM7, com 98% de cobertura e 96,29% de identidade. F317, de 1020 pb, foi preliminarmente identificado como *Bacillus tequilensis* strain 25096, enquanto F301, com 1184 pb, foi associado a *Bacillus stercoris* strain D7XPN1, ambos com coberturas superiores a 97% e identidades acima de 95%. F244, de 1110 pb, foi atribuído a *Bacillus rugosus* strain SPB7.

O R329, com 1087 pb, foi identificado como *Bacillus sonorensis* strain FJAT-46199, enquanto F237, de 1225 pb, foi relacionado a *Bacillus anthracis* strain Pasteur, ambos com coberturas completas. R385, com 521 pb, foi atribuído a *Bacillus velezensis* strain FZB42, e R255, com 349 pb, apresentou a menor sequência, sendo relacionado a *Bacillus tequilensis* strain 10b. R397, de 896 pb, foi associado a *Bacillus paralicheniformis* RSC-3.

Os isolados do gênero *Enterobacter* incluem F152, com 1510 pb, relacionado a *Enterobacter cancerogenus* strain M004; R8, com 1420 pb, associado a *Enterobacter aerogenes*; F263, de 1495 pb, atribuído a *Enterobacter asburiae* strain RHBSTW-01009; e F120, com 1506 pb, identificado como *Enterobacter kobei* strain Ek72.

Já R327, com 122 pb, foi relacionado com a *Serratia surfactantifaciens* strain YD25, enquanto R213, com 772 pb, foi associado à *Serratia marcescens* strain NatBD-9. F321, de 1322 pb, foi atribuído preliminarmente a *Pseudomonas sp.* strain B17, e R74, com 1428 pb, foi relacionado a *Pantoea ananatis* LMG 20 103.

Outros isolados incluem R383, com 899 pb, associado a *Cellulomonas sp.* Y8; R417, com 1511 pb, atribuído a *Priestia megaterium* strain H-1 16S; R281, com 546 pb, relacionado a

Klebsiella pneumoniae strain Kp067-M1; e R334, com 1418 pb, identificado como *Citrobacter amalonaticus* strain FDAARGOS_122.

Dessa maneira, a integração dos dados consolidados com as duas técnicas levou às seguintes classificações em nível de gênero: *Bacillus* (31 isolados), *Enterobacter* (23), *Citrobacter* (7), *Priestia* (6), *Klebsiella* (5), *Pantoea* (2), *Agrobacterium* (2), *Pseudomonas* (2), *Serratia* (2), *Microbacterium* (1), *Sphingobacterium* (1), *Staphylococcus* (1) e *Cellulomonas* (1).

6. DISCUSSÃO

A identificação molecular de endofíticos bacterianos isolados de *A.nummularia* fornece uma base essencial para explorar seu potencial como microrganismos promotores do crescimento de plantas (PGPB), principalmente para o desenvolvimento de produtos como inoculantes vegetais (Ahmad et al., 2023). A investigação realizada permitiu aprofundar o conhecimento sobre a diversidade taxonômica dos endofíticos armazenados no banco de estirpes do laboratório, contribuindo para a estruturação de uma base de dados mais robusta e abrangente, essencial para sustentar futuras aplicações biotecnológicas direcionadas a diferentes ecossistemas.

Entre as ferramentas utilizadas, o MALDI-TOF mostrou-se de grande valia para a identificação microbiana inicial dos isolados bacterianos, revelando-se um método rápido e de custo relativamente acessível. Essa técnica, baseada na análise de impressões digitais proteicas, oferece uma abordagem prática para a triagem e classificação preliminar dos isolados bacterianos. No presente estudo, o MALDI-TOF desempenhou um papel crucial ao permitir a triagem de um grande número de isolados endofíticos de forma ágil, criando um ponto de partida organizado para análises mais aprofundadas.

Embora apresente inúmeras vantagens, a aplicação do MALDI-TOF na microbiologia ambiental enfrenta limitações significativas devido à sua dependência de bancos de dados espectrais abrangentes. Estudos apontam lacunas consideráveis nessas bibliotecas, especialmente no que diz respeito às bactérias associadas a plantas, frequentemente sub-representadas (Han et al., 2023). Além disso, o MALDI-TOF enfrenta desafios na diferenciação de espécies intimamente relacionadas, já que perfis de massa de proteínas sobrepostos podem dificultar a identificação em nível específico (Ringer et al., 2023).

Neste trabalho, as limitações da técnica foram utilizadas de forma estratégica para facilitar a triagem e a seleção dos isolados bacterianos, ao aprofundar o estudo nos isolados em que a técnica não conseguiu identificar. A análise das discrepâncias nos espectros de massa permitiu identificar isolados que apresentavam maior distância em relação aos perfis registrados, destacando-os como alvos de interesse para maior investigação. Para os isolados cujo gênero não pôde ser sequer determinado, o sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal foi essencial, fornecendo uma resolução molecular necessária para compreender suas posições filogenéticas. Essa etapa foi complementada pela construção de uma árvore filogenética, que revelou padrões evolutivos e destacou a diversidade entre os isolados, como evidenciado pelos valores de *bootstrap* e agrupamentos identificados.

A análise filogenética revelou uma ampla diversidade taxonômica entre os isolados endofíticos sequenciados, abrangendo gêneros como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Pantoea*. Essa heterogeneidade reflete a complexidade das interações microbianas nos ambientes ocupados por endofíticos. Entre os isolados, as estirpes F269, F208 e F237 formaram um agrupamento robusto (*bootstrap* 96%) com espécies como *Bacillus cereus*, *Bacillus tropicus* e *Bacillus nitratreducens*, indicando forte conservação genômica e proximidade filogenética. Esses resultados corroboram estudos prévios, como o de Yarza et al. (2008), que destacam a eficácia de árvores baseadas no gene 16S rRNA para delimitar relações evolutivas dentro do gênero *Bacillus*.

Por outro lado, os isolados R285 e R311 se destacaram do grupo principal que inclui *Bacillus licheniformis* e *Bacillus paralicheniformis*, sugerindo divergências genéticas significativas. Esse afastamento pode indicar a emergência de novas linhagens dentro do complexo *Bacillus*. A literatura científica aponta que divergências genéticas significativas em árvores filogenéticas baseadas no gene 16S rRNA frequentemente refletem variações adaptativas ou metabólicas que caracterizam novas espécies bacterianas (Patel & Gupta, 2020). Por exemplo, estudos como o de Patel e Gupta (2020) ressaltam que divergências dentro de complexos filogenéticos de *Bacillus* frequentemente correspondem a estirpes com características funcionais inéditas ou potencial biotecnológico específico. Essa noção é corroborada por Ludwig et al. (2021), que destaca que variações dentro de complexos como o de *Bacillus licheniformis* podem sinalizar linhagens crípticas ou eventos de especiação ainda não reconhecidos. O isolado R329 agrupou-se com *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus haynesii* e *Bacillus piscis* (*bootstrap* 68%), sugerindo uma relação intermediária, com possível divergência no perfil do gene, reforçando a hipótese de que ele possa representar uma estirpe em processo de diferenciação.

O comportamento do isolado R417 também é notável, formando um clado fortemente suportado (*bootstrap* 100%) com *Priestia megaterium* e *Priestia aryabhatai*, enquanto exibe uma relação moderada com *Bacillus tropicus* e *Bacillus nitratreducens* (*bootstrap* 68%). Esses grupos pertencem à mesma família, Bacillaceae, o que explica a proximidade filogenética observada e sugere ancestralidade compartilhada. Patel e Gupta (2020) reforçam que gêneros dentro de Bacillaceae, como *Bacillus* e *Priestia*, apresentam relações filogenéticas próximas devido a padrões evolutivos conservados, apesar de divergências adaptativas. Assim, o agrupamento de R417 pode ser entendido como reflexo de relações evolutivas consistentes dentro da família, alinhando-se às classificações recentes que destacam a coesão genética entre os membros desse clado.

O baixo suporte filogenético observado para isolados como R74, R397, R383, R334 e R324 (<50%) indica incertezas que podem ser atribuídas às limitações do uso exclusivo do gene 16S rRNA. Esses isolados podem representar linhagens altamente divergentes ou posições filogenéticas incertas, destacando a necessidade de análises complementares, como sequenciamento do genoma completo, para maior resolução. Entretanto, esses padrões de agrupamento filogenético também podem apontar para possíveis linhagens, reforçando a importância de abordagens mais resolutivas, como o sequenciamento genômico completo, para confirmar seu status taxonômico (Gomila et al., 2015). Já a proximidade de F120 e F263 com *Enterobacter wuhouensis* e *Scandinavium goeteborgense* (bootstrap 95%) aponta para uma forte conservação genética.

A predominância de isolados relacionados ao gênero *Bacillus* ressalta sua facilidade de cultivo, porém também sua relevância ecológica e funcional em ambientes vegetais, corroborando noções pré-estabelecidas na literatura sobre sua atuação no crescimento vegetal, controle de patógenos e manutenção da saúde do hospedeiro (Fan et al., 2019). Há indicações que espécies como *Bacillus tequilensis*, *Bacillus sonorensis* e *Bacillus stercoris* possuem propriedades bioquímicas que facilitam a produção de compostos bioativos, como sideróforos, auxinas e antibióticos naturais, promovendo não apenas o crescimento radicular, mas também a resistência sistêmica induzida (Chen et al., 2021). Por exemplo, *B. tequilensis* tem sido descrito por sua capacidade de secretar ácido indolacético em rizosferas de gramíneas, estimulando o desenvolvimento de raízes secundárias. Similarmente, *B. sonorensis* apresenta potencial para sintetizar compostos voláteis antimicrobianos que suprimem fungos fitopatogênicos em hortaliças de grande importância agrícola, como o tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Gómez-Lama et al., 2020). Tais características multifuncionais reforçam a capacidade do gênero *Bacillus* de não apenas colonizar tecidos vegetais, mas também estabelecer interações mutualísticas que favorecem a produtividade e a resiliência das plantas cultivadas.

Paralelamente, a atribuição de isolados a *Enterobacter cancerogenus* (F152) e *Enterobacter aerogenes* (R8) sugere que os gêneros da família Enterobacteriaceae também têm papéis cruciais no ambiente endofítico, como a fixação de nitrogênio e a modulação de estresses abióticos (Compant et al., 2010). Isolados de *Serratia* (R327, *Serratia marcescens*) e *Pseudomonas* (F321) destacam a produção de metabólitos antimicrobianos e a proteção contra herbívoros, enquanto *Pantoea ananatis* (R74) demonstra um papel ambivalente, sendo endófito benéfico ou patógeno oportunista, dependendo do contexto (Walterson & Stavrínides, 2015).

A alta abundância de isolados de *Enterobacter* em tecidos vegetais reflete sua capacidade de colonizar nichos endofíticos e desempenhar funções ecológicas importantes, como a

promoção do crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio e da síntese de hormônios vegetais. No entanto, a presença de *Enterobacter* também levanta preocupações significativas devido ao seu potencial como patógeno oportunista em humanos, com espécies como *Enterobacter cancerogenus* e *Enterobacter aerogenes* frequentemente associadas a infecções hospitalares, como septicemia e infecções do trato urinário (Sanders & Sanders, 1997). Esse duplo papel coloca limitações na aplicação direta desses isolados como inoculantes agrícolas, considerando os riscos associados à disseminação de patógenos humanos em sistemas agrícolas e ambientais. Além disso, a transferência horizontal de genes de resistência a antibióticos, frequentemente observada em *Enterobacter* e outros membros da família Enterobacteriaceae, exacerba as preocupações sobre o uso indiscriminado desses microrganismos em práticas agrícolas (Tóth et al., 2016). Assim, embora as interações benéficas entre *Enterobacter* e plantas sejam bem documentadas, o desenvolvimento de inoculantes seguros requer abordagens rigorosas de seleção e manipulação genética para mitigar os riscos potenciais à saúde humana.

Na legislação brasileira, o uso de microrganismos do gênero *Enterobacter* como biofertilizantes ou inoculantes agrícolas é estritamente proibido, principalmente devido ao seu potencial de patogenicidade em humanos e aos riscos associados à transferência de genes de resistência a antibióticos. De acordo com o Decreto nº 4.074 de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802 de 1989, qualquer organismo geneticamente modificado ou com risco comprovado à saúde pública e ambiental é restrito em sistemas agrícolas (Brasil, 2002). Além disso, a Resolução Normativa nº 16 de 2018 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) estabelece critérios rigorosos para a aprovação de microrganismos geneticamente modificados, limitando o uso de mutações que possam potencialmente aumentar a virulência ou disseminação de genes de resistência a antibióticos (CTNBio, 2018). Essas regulamentações refletem uma abordagem cautelosa, que prioriza a segurança sanitária e ambiental ao mesmo tempo em que orienta o desenvolvimento de biotecnologias agrícolas sustentáveis no país.

Finalmente, gêneros menos comumente encontrados em ambientes endofíticos, como *Cellulomonas* (R383) e *Citrobacter* (R334), ampliam a compreensão sobre a complexidade e heterogeneidade desses nichos ecológicos, sugerindo que essas bactérias podem ter desenvolvido adaptações específicas para a degradação de compostos complexos ou para a exploração de recursos ambientais únicos. A identificação desses microrganismos reforça a importância de se explorar de forma abrangente as bactérias endofíticas cultiváveis que possuem características de promoção do crescimento vegetal, uma vez que isso pode revelar gêneros não frequentemente observados nesse contexto, mas com grande potencial para desempenharem papéis mais eficientes na produção biotecnológica. Um exemplo notável na literatura é o gênero

Burkholderia, particularmente *Burkholderia phytofirmans*, que, embora inicialmente associado a habitats diversos, demonstrou grande eficácia como promotor de crescimento vegetal. Existem evidências que essa espécie pode induzir resistência sistêmica em plantas, além de melhorar a tolerância a estresses abióticos, como seca e salinidade, características essenciais para cultivos em condições adversas (Compant et al., 2008). De forma semelhante, o gênero *Methylobacterium*, comumente isolado de superfícies foliares, mas também encontrado em ambientes endofíticos, desempenha um papel crucial ao metabolizar metanol liberado pelas plantas hospedeiras, promovendo crescimento radicular e aumento da biomassa foliar (Corpe, 1985). Esses exemplos reforçam como a investigação de gêneros bacterianos menos explorados pode ampliar significativamente o escopo de aplicações biotecnológicas, fornecendo soluções inovadoras para a agricultura sustentável e o manejo de estresses ambientais em culturas agrícolas.

Embora os dados obtidos forneçam conclusões iniciais valiosas sobre a filogenia e a diversidade desses isolados, é imprescindível a realização de estudos complementares. O gene 16S rRNA tem sido há muito tempo uma pedra angular da taxonomia bacteriana por sua constante conservação, mas a utilização do mesmo também apresenta suas limitações. A qualidade do sequenciamento, por exemplo, influencia diretamente o tamanho das leituras: regiões com maior conteúdo de GC ou repetições podem gerar dificuldades na amplificação e leitura precisa, resultando em sequências mais curtas (Clarridge, 2004). Biologicamente, a presença de múltiplos operons de 16S rRNA em muitos genomas bacterianos pode levar a variações na amplificação, pois diferentes cópias do gene podem variar em sequência ou ser amplificadas com eficiência desigual (Hutchinson & Templeton, 2018). Esses múltiplos operons podem ainda introduzir ambiguidades, dificultando a correta classificação ou montagem de *contigs* (Johnson et al., 2019).

Ainda, embora seu sequenciamento completo permita maior resolução do que abordagens parciais, ainda é insuficiente para distinguir de forma precisa espécies filogeneticamente próximas em certos casos. Por exemplo, dentro do gênero *Pseudomonas*, espécies como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* compartilham alta similaridade em suas sequências 16S rRNA, o que muitas vezes impede uma delimitação clara entre elas (Gomila et al., 2015).

Considerando esses fatores, a análise do genoma completo seria vantajosa por permitir explorar variações em genes específicos relacionados a funções metabólicas ou ambientais, como a produção de metabólitos secundários ou a tolerância a condições adversas, revelando diferenças adaptativas importantes. Estudos genômicos de *Pseudomonas* têm identificado

diferenças sutis, mas ecologicamente relevantes, em ilhas genômicas e genes de biossíntese de compostos bioativos, que são cruciais para entender o papel dessas espécies em interações planta-microrganismo (Loper et al., 2012). Assim, enquanto o gene 16S rRNA continua sendo uma ferramenta valiosa para análises preliminares, o sequenciamento genômico completo proporciona uma visão abrangente e resolutive para a distinção e caracterização funcional de isolados ambientais.

Dessa maneira, abordagens integrativas, como genômica comparativa, proteômica e análise funcional, serão fundamentais para validar as identificações preliminares e desvendar as complexas relações evolutivas e funcionais desses microrganismos, expandindo o acervo de informações referente a estes isolados. Adaptar bibliotecas para refletir a diversidade microbiana regional, particularmente para ecossistemas únicos, como habitats salinos, pode aumentar a aplicabilidade de ferramentas, como o MALDI-TOF, em estudos ambientais (Kumar et al., 2014). O desenvolvimento desses bancos de dados também apoiaria a identificação de táxons raros ou novos, expandindo o escopo da pesquisa voltada para a análise molecular de endófitos, como o presente trabalho.

Como já ressaltado, o aprofundamento do conhecimento sobre a identidade molecular de endofíticos oriundos de ambientes salinos, que demonstram características promissoras de resistência e promoção de crescimento vegetal, é essencial para impulsionar a produção de produtos biotecnológicos. Em um nível filogenético, compreender esses microrganismos é importante porque permite traçar relações evolutivas entre diferentes espécies e identificar características adaptativas únicas associadas a condições extremas. Essa análise pode revelar genes ou vias metabólicas conservadas que desempenham papéis fundamentais na tolerância ao estresse salino, além de identificar linhagens específicas com potencial biotecnológico (Barajas González et al., 2024). Essas compreensões enfatizam a relevância dos endofíticos promotores de crescimento vegetal como ferramentas promissoras para aumentar a produtividade agrícola, sendo a identificação molecular um passo crítico para compreender a complexidade desses isolados ainda não explorados integralmente e guiar o desenvolvimento de aplicações agrícolas. A identificação de possíveis linhagens inéditas de isolados pode ampliar significativamente o potencial biotecnológico desses microrganismos, gerando novos metabólitos e compostos bioativos com aplicações em biofertilizantes, biocontrole e biorremediação, promovendo soluções sustentáveis na agricultura e gestão ambiental.

6. CONCLUSÕES

1. A análise realizada pelo MALDI-TOF identificou alguns dos isolados endofíticos de *A. nummularia*, selecionados por seus traços de promoção de crescimento vegetal, dos gêneros *Enterobacter*, *Bacillus*, *Priestia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Citrobacter* e *Pseudomonas*;
2. A utilização do MALDI-TOF para uma triagem inicial dos isolados foi importante para se excluir bactérias possivelmente patogênicas, como as do gênero *Enterobacter*, de futuros estudos;
3. O sequenciamento do gene 16S rRNA confirmou a identificação de diversas espécies, não classificáveis por MALDI-TOF, incluindo *Bacillus cereus*, *Priestia megaterium* e *Enterobacter ludwigii*;
4. A construção da árvore filogenética, com base nas sequências de 16S rRNA, revelou agrupamentos consistentes para várias estirpes, como por exemplo F231. Certas estirpes indicaram possíveis divergências evolutivas, sugerindo a presença de variantes ainda pouco exploradas, como a R334.
5. Alguns isolados apresentaram relações filogenéticas pouco claras, podendo apontar para possíveis novas estirpes. Assim, são necessárias análises complementares, como o sequenciamento genômico completo, para determinar sua classificação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[AGRICULTURE]. Bacterial endophytes and their contributions to alleviating drought and salinity stresses in wheat: A systematic review of physiological mechanisms. *Agriculture*, v. 14, n. 5, 2024. DOI: 10.3390/agriculture14050769.

ADELOYE, Abiodun A. Global warming impact: flood events, wet-dry conditions and changing scene in world food security. 2010.

AHMED, S.; SA, T.; WALITANG, D. I. Bioinoculant-assisted host salt tolerance. In: *Advances in Agricultural Biotechnology*. 2024. DOI: 10.1016/b978-0-443-13193-6.00009-9.

ALI, S. Characterization of new bacterial species based on phenotypic and genotypic distinctiveness. *Journal of Microbial Identification*, 2023.

ALMAKI, M.; et al. Criteria for determining new bacterial species. *Microbial Taxonomy*, 2016.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics*, 2010.

ANGELL, I. L.; NILSEN, M.; CARLSEN, K. C. L.; et al. De novo species identification using 16S rRNA gene nanopore sequencing. *PeerJ*, 2020.

ARNOLD, A. E.; MEJÍA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 2003.

BANKEVICH, A.; NURK, S.; ANTIPOV, D.; GUREVICH, A. A.; DVORKIN, M.; KULIKOV, A. S.; LESIN, V. M.; NIKOLAEV, S. I.; PHAM, S.; PRJIBELSKI, A. D.; PYSHKIN, A. V.; SPROCH, P.; TROSHCHYN, M.; VASILINETSKII, A. M.; PETROV, N. A.; FUYONG, D.; APELTSEV, N.; KOROBAYNIKOV, A. V.; PEVZNER, P. A.; KAPITONOV, V. V.; MIRONOV, A. A.; GUREVICH, A.; TESLER, G.; ALEKSEYEV, M. A.; PIROZHENKO, D. A. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, v. 19, n. 5, p. 455-477, 2012.

BARAJAS GONZÁLEZ, J. A. et al. NaCl modifies biochemical traits in bacterial endophytes isolated from halophytes: towards salinity stress mitigation using consortia. *Plants*, v. 13, n. 12, 2024. DOI: 10.3390/plants13121626.

BAŞTAŞ, K. K.; KUMAR, A. *Omics Technologies in the Plant–Microbe Interactions*. In: *Microorganisms for Sustainability*. 2023. DOI: 10.1007/978-981-99-3947-3_13.

BERG, Gabriele et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, v. 8, p. 1-22, 2020.

BEYE, M.; et al. Differentiation of bacterial strains within the same species. *Bacterial Genomics*, 2017.

BHARTI, N.; et al. Enhancing nutrient uptake efficiency in plants: role of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant and Soil*, 2016.

BITA, Craita E.; GERATS, Tom. Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, v. 4, p. 273, 2013.

BLAHA, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; MIRZA, M. S.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of the ACC deaminase gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 15, n. 3, p. 355-365, 2006.

BLAHA, Didier et al. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 56, n. 3, p. 455-470, 2006.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, v. 10, p. 421, 2009.

CAMPOS-AVELAR, Ixchel et al. The Mitigation of Phytopathogens in Wheat under Current and Future Climate Change Scenarios: Next-Generation Microbial Inoculants. *Sustainability*, v. 15, n. 21, p. 15250, 2023.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, suppl. 1, p. 4516-4522, 2011.

CAUDILL, M. T.; BRAYTON, K. A. The use and limitations of the 16S rRNA sequence for species classification of *Anaplasma* samples. *Microorganisms*, 2022.

CHALONER, Thomas M.; GURR, Sarah J.; BEBBER, Daniel P. Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change. *Nature Climate Change*, v. 11, n. 8, p. 710-715, 2021.

CHAUDHARY, Parul; KHATI, Priyanka; CHAUDHARY, Anuj; GANGOLA, Saurabh; KUMAR, Rajeev; SHARMA, Anita. Bioinoculation using indigenous *Bacillus* spp. improves growth and yield of *Zea mays* under the influence of nanozeolite. 2021. DOI: 10.1007/S13205-020-02561-2.

CHINNASWAMY, A.; DE LA COBA PEÑA, T.; STOLL, A.; DE LA PEÑA ROJO, D.; BRAVO, J.; RINCÓN, A.; PUEYO, J. J. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria (PGPB) from *Larrea divaricata* Cav., with potential use in phytoremediation of mining soils. *Environmental Sustainability*, v. 3, n. 2, p. 272-284, 2023.

CHRISTENSEN, J. J.; GREUB, G.; KOSTRZEWSKI, M.; et al. MALDI-TOF MS: Challenges and limitations in microbial identification. *Clinical Chemistry*, v. 67, p. 37-50, 2021.

Clark, A. E.; Kaleta, E. J.; Arora, A.; Wolk, D. M. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 3, p. 547-603, 2013.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.

COMPANT, S.; SAMSON, R.; MOHAMMED, S.; et al. The role of endophytes in the resistance of plants to drought and their potential for biofertilizer applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1-20, 2019.

CUSTER, Gordon F. Unearthing opportunity amid declining plant-beneficial bacteria. *Trends in Plant Science*, 2024.

DARKAZANLI, Mohamad; KISELEVA, Irina. New surface sterilization protocols for isolation of endophytic bacteria from plants (black turtle beans, peas, and barley). *AIP Conference Proceedings*, 2021. DOI: 10.1063/5.0069149.

DE MELO, Hidelblandi Farias et al. Water potential in soil and *Atriplex nummularia* (phytoremediator halophyte) under drought and salt stresses. *International journal of phytoremediation*, v. 20, n. 3, p. 249-255, 2018.

DE OLIVEIRA, Ariádila Gonçalves et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, v. 7, n. 3, p. 26, 2012.

DE SOUZA, Edivan Rodrigues et al. Biomass, anatomical changes and osmotic potential in *Atriplex nummularia* Lindl. cultivated in sodic saline soil under water stress. *Environmental and Experimental Botany*, v. 82, p. 20-27, 2012.

DI FALCO, Salvatore; CHAVAS, Jean-Paul. Rainfall shocks, resilience and the dynamic effects of crop biodiversity on the productivity of the agroecosystem. *Land Economics*, v. 84, n. 1, p. 83-96, 2008.

DUDEJA, S. S. et al. *Bacterial endophytes: Molecular interactions with their hosts*. *Journal of Basic Microbiology*, 2021. DOI: 10.1002/JOBM.202000657.

EIDA, A. A.; ZAHER, W. A.; TRIPATHI, B. N.; ANSARI, M. I. Phylogenetic and Functional Characterization of Bacterial Endophytes from Dates Under Different Irrigation Regimes. *Frontiers in Microbiology*, 2020.

EL-TARABILY, Khaled A. et al. Growth promotion of *Salicornia bigelovii* by *Micromonospora chalcea* UAE1, an endophytic 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing actinobacterial isolate. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1694, 2019.

EL-TARABILY, Khaled A. et al. Polyamine-producing actinobacteria enhance biomass production and seed yield in *Salicornia bigelovii*. *Biology and Fertility of Soils*, v. 56, p. 499-519, 2020.

EREN, A. M.; ESEN, Ö. C.; QUINN, R. A.; MURAT EREN, A.; MCGLOTHLIN, J. W.; FOSTER, J. T.; DUSHAY, J. A.; POLZ, M. F.; BINDER, H. J.; MARK WELCH, J. L. Anvi'o: An advanced analysis and visualization platform for 'omics data. *PeerJ*, 2015.

ESWAR, Deepthi; KARUPPUSAMY, Rajan; CHELLAMUTHU, Selvi. Drivers of soil salinity and their correlation with climate change. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, v. 50, p. 310-318, 2021.

Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FERONE, M.; CASABURI, A.; BARONE, A.; VITIELLO, G.; CIANCIULLI, A.; MARTELLI, G.; LOMBARDI, S. Molecular techniques for microbial characterization. *Microbial Techniques and Applications*, 2020.

FIERER, Noah. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, v. 15, n. 10, p. 579-590, out. 2017.

FONSECA, E. T.; ROCHA, T. M.; SILVA, A. L.; MARTINS, P. S. Advanced techniques in bacterial isolation and cultivation. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 5, p. 1293-1302, 2017.

FREIRE, M. B. G.; SOUZA, E. R.; FREIRE, F. J. Fitorremediação de solos afetados por sais. *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados*. Fortaleza, INCT, Sal, p. 459-470, 2010.

FULL-LENGTH 16S rRNA gene sequencing combined with adequate database selection improves the description of Arctic marine prokaryotic communities. *Annals of Microbiology*, v. 73, 2023.

GABY, J. C.; BUCKLEY, D. H. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *PLoS One*, v. 7, n. 7, e42149, 2012.

GAO, X.; LIN, H.; REVANNA, K. V.; DONG, Q. A Bayesian taxonomic classification method for 16S rRNA gene sequences with improved species-level accuracy. *BMC Bioinformatics*, 2017.

GHEYI, Hans Raj; DA SILVA DIAS, N.; DE LACERDA, C. F. *Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados*. Fortaleza: INCTSal, 2010.

GLICK, Bernard R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, v. 2012, n. 1, p. 963401, 2012.

GUPTA, R. M.; KALE, P. S.; RATHI, M. L.; et al. Isolation, characterization and identification of endophytic bacteria by 16S rRNA partial sequencing technique from roots and leaves of *Prosopis cineraria*. *Asian Journal of Plant Science & Research*, v. 5, p. 39-46, 2015.

HAN, S.; YANG, J.; HE, X.; et al. Differentiation and identification of endophytic bacteria from *Populus* based on mass fingerprints and gene sequences. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 17, p. 13449-13461, 2023.

HASSLER, C. et al. Horizontal gene transfer and recombination impact on the phylogenetic accuracy of microbial taxa. *Genome Biology and Evolution*, 2022.,

HUTCHINSON, J. M.; TEMPLETON, A. Primer bias and variation in 16S rRNA operons complicate bacterial community analyses. *Microbial Ecology*, v. 76, n. 2, p. 349–356, 2018. DOI: 10.1007/s00248-018-1220-7.

ISHIYAMA, D.; CREVELIN, E.J.; MELO, I.S. Molecular identification and enzyme activity of endophytic fungi isolated from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). *Phytochemistry Letters*, 18, 49-55. DOI: 10.1016/j.phytol.2016.06.001.

JANNI, Michela et al. Plant responses to climate change, how global warming may impact on food security: a critical review. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1297569, 2024.

JAYANTHI, D.; SEBASTIAN, L. M. *Isolation of Endophytic Actinobacteria from Flowers, Fruits, and Seeds of Higher Plants*. In: *Methods in Molecular Biology*. 2022. DOI: 10.1007/978-1-0716-1728-1_16.

JHA, Bhavanath; GONTIA, Iti; HARTMANN, Anton. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. *Plant and Soil*, v. 356, p. 265-277, 2012.

JOHNSON, J. S. et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 5029, 2019. DOI: 10.1038/s41467-019-13036-1.

KANDEL, S. L.; JOUBERT, P. M.; DOTY, S. L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, v. 5, n. 4, p. 77, 2017.

KANG, Yeeun et al. Molecular bases of heat stress responses in vegetable crops with focusing on heat shock factors and heat shock proteins. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, p. 837152, 2022.

KANNAPIRAN, E. et al. Inoculation effect of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria to promote growth of black gram (*Phaseolus mungo* Roxb; Eng). *Annals of Biological Research*, v. 2, n. 5, p. 615-621, 2011.

KANTER, David R.; BELL, Andrew R.; McDERMID, Sonali Shukla. Precision agriculture for smallholder nitrogen management. *One Earth*, v. 1, n. 3, p. 281-284, 2019.

KIEPAS, A. B.; HOSKISSON, P. A.; PRITCHARD, L. *16S rRNA phylogeny and clustering is not a reliable proxy for genome-based taxonomy in Streptomyces*. *bioRxiv*, 2023. DOI: 10.1101/2023.08.15.553377.

KIM, M. et al. *Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014. DOI: 10.1099/IJS.0.059774-0.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHLEPER, C.; WALTER, F.; VON MALTZAHN, G.; PEEPLAU, J.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; LLOYD, K. G.; GLÖCKNER, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. 1, p. e1, 2013.

KUMAR, V.; DUBEY, S. K.; DUBEY, R. C.; et al. Regional adaptations of MALDI-TOF for microbial typing: A review of advancements and applications. *Microbiology Research*, v. 13, p. 85-92, 2014.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKERBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (ed.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. London: Academic Press, 1991. p. 115-175.

- LATA, H.; LI, X. C.; SILVA, B.; et al. Identification of IAA-producing endophytic bacteria from micropropagated *Echinacea* plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 87, p. 203-209, 2006.
- LEISNER, Courtney P.; POTNIS, Neha; SANZ-SAEZ, Alvaro. Crosstalk and trade-offs: plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses. *Plant, Cell & Environment*, v. 46, n. 10, p. 2946-2963, 2023.
- LI, X.; HUO, S.; XI, B. *Updating the resolution for 16S rRNA OTUs clustering reveals the cryptic cyanobacterial genus and species. Ecological Indicators*, 2020. DOI: 10.1016/J.ECOLIND.2020.106695.
- LI, Yan et al. Rhizobacterial communities of five co-occurring desert halophytes. *PeerJ*, v. 6, p. e5508, 2018.
- MANIAS, D. A.; MONK, J. M.; CHURCH, G. M. Assessing the capabilities of traditional and molecular techniques for bacterial identification. *Microbial Identification*, 2020.
- MANO, H.; TANAKA, F.; NAKAMURA, C.; KAGA, H.; MORISAKI, H. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants. *Microbes and Environments*, v. 22, n. 2, p. 175-185, 2007.
- MARTIN, G.; BAZIN, M.; ALVAREZ, G.; GARCIA, J. Global significance of nitrogen-fixing microorganisms. *Nitrogen Cycle Studies*, 2022.
- MARTIN, Thomas Newton et al. *Microrganismos Promotores de Crescimento, Fixadores de Nitrogênio e Solubilizadores na Cultura da Soja. Tecnologias Aplicadas para o Manejo Rentável e Eficiente da Cultura da Soja*, p. 69, 2022.
- MEHTA, Mausmi P.; BUTTERFIELD, David A.; BAROSS, John A. Phylogenetic diversity of nitrogenase (nifH) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 2, p. 960-970, 2003.
- MEHTA, S.; CANNON, W.; HENDERSON, R.; KENNEDY, C. Characterization of the nifH gene in nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 20, p. 5633-5640, 2003.
- MISHRA, Avinash; TANNA, Bhakti. Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. *Frontiers in plant Science*, v. 8, p. 252363, 2017.
- MOHITE, Bhavna. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013.
- MOLYNEUX, Nicholas et al. Climate change and population growth in Timor Leste: Implications for food security. *Ambio*, v. 41, n. 8, p. 823-840, 2012.
- Monteiro, D. A.; Barbosa, C. S. F.; Martins, L. F.; Rachid, C. T. C. C. The bacteriome of the halophyte *Atriplex nummularia* (old man saltbush) in salt-affected soils - an ecological model. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022. DOI: 10.1093/femsec/fiac135.
- MONTEIRO, Douglas A. et al. The bacteriome of the halophyte *Atriplex nummularia* (old man saltbush) in salt-affected soils-an ecological model. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 98, n. 12, p. fiac135, 2022.
- MONTEIRO, Douglas Alfradique. O bacterioma da halófito *Atriplex nummularia* (erva-sal) em solos afetados por sais e sua modulação por tipo de solo e salinidade. 2023. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- MOOSMAYER, Daniela; MAIWALD, Stefan; HOLZ, Cordula; TUGENDREICH, Stefan; RÖNNING, Per; JUCKER, Manfred. A unique structural model of a small-molecule kinase inhibitor bound to an active kinase and its implications for the design of potent and selective inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 23, p. 7235-7242, 2014.

- MOREIRA, F. M. S.; CARDOSO, E. J. B. N. Biological nitrogen fixation and the role of soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 2020.
- MUHTARI, Kasim; SAILAJA, Inampudi; SHEKHAWAT, B. S.; KAURA, Sushila; MEHTA, S. C. Identification of bacterial endophytes isolated from different medicinal plants. *International journal of biomedical and clinical analysis*, v. 4, n. 1, 2024. DOI: 10.61797/ijbca.v4i1.331.
- Nascimento, C. S. Manejo integrado de uva e erva sal (*Atriplex nummularia*) para fins de fitorremediação no Semiárido Paraibano. *Dissertation*, 2023. DOI: 10.52446/cursoengbiotecnologiaccsa.2019.tccmon.nascimento.
- OVIÑAÑO, M.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, A. MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology: Identification and beyond. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 27, n. 1, p. 106-115, 2021.
- Oviño, M.; Rodríguez-Sánchez, B. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 39, n. 4, p. 192-201, 2021.
- PANDA, A.; BARIK, S. Application of bacterial endophytes in sustainable agriculture. *Microbial Applications in Agriculture*, 2020.
- PARIHAR, Parul et al. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, v. 22, p. 4056-4075, 2015.
- PASSARI, A. K.; SINGH, G.; SINGH, P.; SINGH, R. P.; SINGH, B. P. Molecular and functional characterization of endophytic bacteria associated with ethnomedicinal plants. *Frontiers in Microbiology*, 2018.
- PAUL, B. S. *Concatenated 16S rRNA sequence analysis improves bacterial taxonomy. F1000Research*, 2023. DOI: 10.12688/f1000research.128320.3.
- PEDROTTI, Alceu et al. Causes and consequences of the process of soil salinization. *Revista Eletronica Em Gestao Educacao E Tecnologia Ambiental*, v. 19, n. 2, p. 1308-1324, 2015.
- PENG, Wanxi et al. A review of historical and recent locust outbreaks: Links to global warming, food security and mitigation strategies. *Environmental research*, v. 191, p. 110046, 2020.
- PHAM, Van Hong Thi; KIM, Jaisoo. Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 9, 2012. DOI: 10.1016/J.TIBTECH.2012.05.007.
- PHYLOGENETIC trees of closely related bacterial species and subspecies based on frequencies of short nucleotide sequences. *PLOS ONE*, v. 18, n. 7, 2023.
- PHYLOGENIES of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, v. 11, 2023.
- PRIYANKA, P.; KUMAR, S.; SHARMA, S. Development of bacterial bioformulations using response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, 2024. DOI: 10.1093/jambio/lxae263.
- RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LIU, D.; LOCKHART, P. J. Molecular characterization of plant-associated endophytic bacteria. *Environmental Microbiology*, v. 21, n. 3, p. 831-845, 2019.
- RINGER, M.; KOTROCZÓ, Z.; MOHÁCSI-FARKAS, C.; et al. The current level of MALDI-TOF MS applications in the detection of microorganisms: A short review of benefits and limitations. *Microbiological Research*, v. 14, p. 80-90, 2023.
- ROSSI-TAMISIER, M. et al. *Cautionary tale of using 16S rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015. DOI: 10.1099/IJS.0.000161.
- SAHU, P.; TILGAM, Jyotsana; MISHRA, Sushma; HAMID, Saima; GUPTA, Amrita Das; JAYALAKSHMI, K.; VERMA, Satish K.; KHARWAR, Ravindra N. Surface sterilization for isolation of endophytes: ensuring what (not) to grow. *Journal of Basic Microbiology*, v. 62, n. 1, 2022. DOI: 10.1002/jobm.202100462.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; et al. The role of beneficial endophytes in promoting plant growth: Biological mechanisms and practical applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 907-920, 2016.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OUDEMANS, P.; DRIGGERS, P. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents. *Environmental Microbiology Reports*, v. 8, n. 5, p. 844-857, 2016.

SARTI, G. C. et al. Inoculation with biofilm of *Bacillus subtilis* promotes the growth of *Lactuca sativa*. *Sustainability*, v. 15, n. 21, 2023. DOI: 10.3390/su152115406.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A. K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SENA, L. et al. *Exploring the potential of endophyte-plant interactions for improving crop sustainable yields in a changing climate*. *Frontiers in Plant Science*, 2024. DOI: 10.3389/fpls.2024.1349401.

SHAHID, Izzah; HAN, Jun; HANOQ, Sharoon; MALIK, Kauser A.; BORCHERS, Christoph H.; MEHNAZ, Samina. Profiling of Metabolites of *Bacillus* spp. and Their Application in Sustainable Plant Growth Promotion and Biocontrol. 2021. DOI: 10.3389/FSUFS.2021.605195.

Shastri, R. P.; Krishnappa, M. D.; Saifuddin, M. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry: A rapid technique for identification and characterization of microbial isolates. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 1, n. 3, p. 35-42, 2020.

SHASTRY, V. M.; GUPTA, A.; RAGHAVAN, V.; SINGH, A. MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight for microbial characterization. *Journal of Proteomics*, v. 231, p. 104012, 2020.

SILVA-CARDOSO, Inaê Mariê de Araújo; MEDEIROS, Marcos Barros de; GOMES, A. C. M. M.; SOUZA, André Luis Fachini de; SCHERWINSKI-PEREIRA, Jonny Everson. Use of electron microscopy for the detection of contaminant endophytic bacteria in vitro. *Methods in Molecular Biology*, 2024. DOI: 10.1007/978-1-0716-3954-2_5.

STREJCEK, M. et al. *Whole-Cell MALDI-TOF MS Versus 16S rRNA Gene Analysis for Identification and Dereplication of Recurrent Bacterial Isolates*. *Frontiers in Microbiology*, 2018. DOI: 10.3389/FMICB.2018.01294.

SYAFIQ, Tuan Muhammad; NUSAIBAH, Syed Ali; RAFII, Mohd Y. Effectiveness of Bioinoculants *Bacillus cereus* and *Trichoderma asperellum* as Oil Palm Seedlings Growth Promoters. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2021. DOI: 10.47836/PJTAS.44.1.09.

SYD ALI, Nusaibah. *Bacillus* spp.: A bio-inoculant factory for plant growth promotion and immune enhancement. In: *Sustainable Agriculture and Agronomy*. 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-821667-5.00021-X.

TASKILA, Sanna. Improved enrichment cultivation of selected food-contaminating bacteria. *Finnish Food Safety Authority*, 2010.

THANGAVELU, R.; GOPAL, V.; KUMAR, M.; KUMAR, R. Identification and characterization of endophytic bacteria from different plant species. *Journal of Plant Pathology*, v. 104, n. 2, p. 341-355, 2022. KAVAMURA, V. N.; et al. Understanding the soil microbiome: biological insights and methodological advances. *Environmental Microbiology*, 2013.

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, p. 4673-4680, 1994.

UGENE Team. UGENE: Universal Network Enabled Analysis Kit. Russia: UGENE Team, v2.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, p. 315-322, 1990.

YADAV, A. N.; et al. Role of plant microbiome in biotic stress management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017.

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K. Endophytic fungi: role in sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 102, n. 5, p. 1919-1925, 2018.

ZHANG, K.; LIN, R.; CHANG, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, Z. 16S-FASAS: an integrated pipeline for synthetic full-length 16S rRNA gene sequencing data analysis. *PeerJ*, 2022.

ANEXOS

ANEXO 1

Isolado	1ª Identificação (Score)	2ª Identificação (Score)
F22	<i>Bacillus subtilis</i> (2.05)	<i>Bacillus subtilis</i> (2.05)
F102	<i>Pantoea ananatis</i> (2.03)	<i>Pantoea ananatis</i> (1.81)
F120	Identificação impossível (1.19)	Identificação impossível (1.17)
F153	<i>Klebsiella aerogenes</i> (2.10)	<i>Priestia megaterium</i> (1.75)
F182	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.03)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (2.41)
F268	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (1.83)	Identificação impossível (1.62)
F283	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2.04)	<i>Enterobacter hormaechei</i> (2.36)
F283	<i>Bacillus subtilis</i> (2.05)	<i>Bacillus subtilis</i> (2.05)
F300	<i>Priestia megaterium</i> (1.76)	<i>Priestia megaterium</i> (1.99)
F353	<i>Klebsiella aerogenes</i> (2.10)	<i>Priestia megaterium</i> (1.75)
R7	<i>Bacillus subtilis</i> (1.96)	<i>Bacillus subtilis</i> (1.88)
R8	Identificação impossível (1.32)	Identificação impossível (1.33)
R13	<i>Citrobacter freundii</i> (2.39)	<i>Citrobacter freundii</i> (2.42)
R34	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (2.17)	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (2.01)
R36	Identificação impossível (1.66)	Nenhum pico encontrado (0.00)
R50	<i>Enterobacter roggenkampii</i> (2.38)	<i>Enterobacter roggenkampii</i> (2.40)
R74	<i>Bacillus licheniformis</i> (1.83)	<i>Bacillus licheniformis</i> (1.74)
R77	<i>Citrobacter freundii</i> (2.47)	<i>Citrobacter freundii</i> (2.51)
R89	<i>Enterobacter bugandensis</i> (1.89)	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1.86)
R94	<i>Citrobacter freundii</i> (2.36)	<i>Citrobacter freundii</i> (2.34)
R97	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1.89)	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1.80)
R99	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.19)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.11)
R101	<i>Bacillus subtilis</i> (2.12)	<i>Bacillus subtilis</i> (2.08)
R108	<i>Enterobacter bugandensis</i> (1.94)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (1.94)
R111	<i>Bacillus subtilis</i> (2.05)	<i>Bacillus subtilis</i> (2.24)
R115	Identificação impossível (1.44)	Nenhum pico encontrado (0.00)
R118	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.23)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.13)
R122	<i>Bacillus subtilis</i> (2.14)	<i>Bacillus subtilis</i> (1.93)
R132	<i>Priestia megaterium</i> (2.08)	<i>Priestia megaterium</i> (2.00)
R139	<i>Glutamicibacter endophyticus</i> (1.76)	Identificação impossível (1.30)
R148	<i>Klebsiella aerogenes</i> (2.24)	<i>Klebsiella aerogenes</i> (2.21)
R157	<i>Microbacterium maritypicum</i> (1.86)	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (1.83)
R159	<i>Glutamicibacter endophyticus</i> (1.71)	Identificação impossível (1.50)
R181	<i>Priestia megaterium</i> (2.11)	<i>Priestia megaterium</i> (2.07)

R190	<i>Identificação impossível (1.61)</i>	<i>Identificação impossível (1.53)</i>
R213	Nenhum pico encontrado (0.00)	Nenhum pico encontrado (0.00)
R242	<i>Klebsiella aerogenes (1.76)</i>	Identificação impossível (1.68)
R246	<i>Enterobacter ludwigii (2.21)</i>	<i>Enterobacter ludwigii (2.14)</i>
R246	<i>Bacillus subtilis (2.30)</i>	<i>Bacillus subtilis (2.25)</i>
R253	<i>Staphylococcus succinus (1.70)</i>	<i>Staphylococcus gallinarum (1.84)</i>
R255	Identificação de organismo (1.57)	Identificação de organismo (1.57)
R272	<i>Bacillus subtilis (2.12)</i>	<i>Bacillus subtilis (2.09)</i>
R273	<i>Bacillus subtilis (2.08)</i>	<i>Bacillus subtilis (2.08)</i>
R278	<i>Bacillus subtilis (2.06)</i>	<i>Bacillus subtilis (2.05)</i>
R281	Identificação impossível (1.35)	Identificação impossível (1.24)
R285	<i>Enterobacter roggenkampii (2.09)</i>	<i>Enterobacter ludwigii (2.05)</i>
R288	Identificação impossível (1.42)	Identificação impossível (1.29)
R292	<i>Enterobacter kobei (2.38)</i>	<i>Enterobacter roggenkampii (2.41)</i>
R295	<i>Bacillus subtilis (2.05)</i>	<i>Bacillus subtilis (2.00)</i>
R297	<i>Priestia megaterium (2.28)</i>	<i>Priestia megaterium (1.77)</i>
R298	<i>Enterobacter roggenkampii (2.37)</i>	<i>Enterobacter bugandensis (2.33)</i>
R300	<i>Klebsiella aerogenes (2.48)</i>	<i>Klebsiella aerogenes (2.39)</i>
R301	<i>Citrobacter amalonaticus (2.34)</i>	<i>Citrobacter amalonaticus (2.36)</i>
R306	<i>Enterobacter ludwigii (2.10)</i>	<i>Enterobacter bugandensis (2.08)</i>
R307	<i>Klebsiella aerogenes (2.26)</i>	<i>Klebsiella aerogenes (2.23)</i>
R309	Identificação impossível (1.68)	Identificação impossível (1.38)
R311	Identificação impossível (1.56)	Nenhum pico encontrado (0.00)
R314	Identificação impossível (1.47)	Identificação impossível (1.46)
R321	Identificação impossível (1.52)	<i>Citrobacter amalonaticus (1.83)</i>
R322	<i>Sphingobacterium multivorum (1.91)</i>	<i>Sphingobacterium multivorum (1.91)</i>
R323	Identificação impossível (1.41)	<i>Kosakonia cowanii (1.88)</i>
R324	Identificação impossível (1.69)	<i>Identificação impossível (1.69)</i>
R325	<i>Enterobacter bugandensis (1.83)</i>	<i>Enterobacter cancerogenus (1.82)</i>
R327	<i>Enterobacter hormaechei (1.76)</i>	Identificação impossível (1.58)
R334	Identificação impossível (1.38)	Identificação impossível (1.36)
R334	<i>Enterobacter bugandensis (1.91)</i>	Identificação impossível (1.55)
R335	<i>Enterobacter cancerogenus (1.96)</i>	<i>Kluyvera ascorbata (1.92)</i>
R341	<i>Enterobacter bugandensis (1.91)</i>	<i>Enterobacter bugandensis (1.80)</i>
R342	Identificação impossível (1.62)	Identificação impossível (1.61)
R342	<i>Citrobacter amalonaticus (1.79)</i>	<i>Citrobacter koseri (1.77)</i>
R342	<i>Pantoea anthophila (2.16)</i>	<i>Pantoea agglomerans (1.78)</i>
R348	<i>Enterobacter ludwigii (2.19)</i>	<i>Enterobacter kobei (2.13)</i>
R349	Identificação impossível (1.45)	Identificação impossível (1.27)

R359	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1.71)	Identificação impossível (1.58)
R365	Identificação impossível (1.06)	Identificação impossível (1.02)
R381	<i>Enterobacter hormaechei</i> (1.88)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.01)
R383	Identificação impossível (1.44)	Identificação impossível (1.62)
R389	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.18)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.14)
R389	<i>Glutamicibacter endophyticus</i> (1.89)	Identificação impossível (1.38)
R390	<i>Priestia megaterium</i> (1.78)	<i>Priestia megaterium</i> (1.74)
R391	<i>Enterobacter cancerogenus</i> (2.21)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.03)
R395	Identificação impossível (1.42)	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (1.96)
R397	Identificação impossível (1.69)	Identificação impossível (1.66)
R400	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.14)	<i>Enterobacter bugandensis</i> (2.03)
R417	Identificação impossível (1.45)	Identificação impossível (1.44)
