

Caracterização morfofisiológica, molecular e funcional de *Mycobacterium agroflorens* com potencial para o desenvolvimento de bioinsumos e promoção do crescimento vegetal

Morphophysiological, molecular and functional characterization of *Mycobacterium agroflorens* with potential for the development of bioinputs and plant growth promotion

Luis Gustavo Neres Ferreira Soares¹

Zilmar Timoteo Soares²

Aarão Felipe Ataídes Lima³

Jeam Nunes Moreira⁴

RESUMO

A crescente demanda por sistemas agrícolas sustentáveis tem impulsionado o desenvolvimento de bioinsumos microbianos capazes de reduzir a dependência de fertilizantes minerais e promover maior eficiência no uso dos recursos naturais. Nesse contexto, a prospecção e caracterização de bactérias promotoras do crescimento vegetal constituem uma estratégia promissora para aumentar a produtividade agrícola e contribuir para a conservação ambiental. O presente estudo teve como objetivo caracterizar morfofisiológica, molecular e funcionalmente a cepa experimental *Mycobacterium agroflorens*, avaliando seu potencial para aplicação como bioinsumo agrícola. A pesquisa compreendeu a caracterização macroscópica e microscópica da cepa, cultivo em meio Middlebrook 7H10, avaliação do crescimento sob diferentes condições de temperatura e pH, identificação molecular por sequenciamento do gene 16S rRNA e análises de mecanismos associados à promoção do crescimento vegetal, incluindo produção de fitormônios, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e genes relacionados à interação planta-bactéria. Também foram conduzidos ensaios agronômicos em ambiente controlado para avaliar o desempenho da inoculação em diferentes culturas vegetais, associados ao monitoramento ambiental por sensores conectados à Internet das Coisas

¹ Acadêmico do programa Cientista Aprendiz- UEMASUL, Programa PIBIC Jr.- UEMASUL, Escola Técnica Nova Dinâmica, luisgusair155@gmail.com.br

² Doutor em Educação Professor Associado II, Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, Coordenador de Gestão de Projeto de Educação – CAPES Imperatriz – Maranhão, Zilmar.soares@uemasul.edu.br

³ Médico CRM-MA:17646-MA, Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, São Luís – Maranhão, Telefone: (99) 98481-7605, Aaraofilipe@gmail.com

⁴ Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, Diretor da LAPA/ Diretor de Inovação e Tecnologia do Programa Cientista Aprendiz / UEMASUL, Imperatriz -Maranhão, Jeam.moreira@uemasul.edu.br

(IoT). Os resultados indicaram que *M. agroflorensis* apresentou elevada estabilidade fenotípica, crescimento otimizado a 30 °C e pH 7,0, características morfológicas compatíveis com o gênero *Mycobacterium* e potencial funcional para promover o crescimento vegetal. A inoculação proporcionou incrementos no desenvolvimento das plantas e demonstrou viabilidade para uso em sistemas agrícolas sustentáveis. Os resultados obtidos evidenciam o potencial biotecnológico da cepa como candidata ao desenvolvimento de bioinsumos, contribuindo para estratégias de agricultura de baixo carbono e para o avanço da microbiologia agrícola.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Bioinsumos. Bactérias promotoras do crescimento vegetal. *Mycobacterium agroflorensis*. Microbiologia agrícola. Biotecnologia.

ABSTRACT

The growing demand for sustainable agricultural systems has stimulated the development of microbial bioinputs capable of reducing dependence on mineral fertilizers while improving the efficient use of natural resources. In this context, the prospecting and characterization of plant growth-promoting bacteria represent a promising strategy to increase agricultural productivity and support environmental sustainability. This study aimed to perform the morphophysiological, molecular, and functional characterization of the experimental strain *Mycobacterium agroflorensis*, evaluating its potential for application as an agricultural bioinput. The research included macroscopic and microscopic characterization, cultivation on Middlebrook 7H10 medium, assessment of bacterial growth under different temperature and pH conditions, molecular identification based on 16S rRNA gene sequencing, and investigation of plant growth-promoting mechanisms, including phytohormone production, phosphate solubilization, siderophore production, and genes associated with plant–bacteria interaction. Agronomic assays were also conducted under controlled environmental conditions, combined with Internet of Things (IoT)-based environmental monitoring, to evaluate bacterial inoculation in different crop species. The results demonstrated that *M. agroflorensis* exhibited high phenotypic stability, optimal growth at 30 °C and pH 7.0, morphological characteristics consistent with the genus *Mycobacterium*, and functional traits associated with plant growth promotion. Bacterial inoculation improved plant development and demonstrated promising potential for application in sustainable agricultural systems. These findings highlight the biotechnological potential of *M. agroflorensis* as a candidate for the development of agricultural bioinputs, contributing to low-carbon agriculture and advancing research in agricultural microbiology.

Keywords: Agricultural microbiology. Biotechnology. Bioinputs. Plant growth-promoting bacteria. Sustainable agriculture. *Mycobacterium agroflorensis*.

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial e a necessidade de ampliar a produção de alimentos de forma sustentável têm impulsionado a busca por tecnologias capazes de aumentar a produtividade agrícola sem comprometer os recursos naturais. Estima-se que a demanda global por alimentos continue crescendo nas próximas décadas, exigindo sistemas produtivos mais eficientes, resilientes e ambientalmente responsáveis. Nesse

cenário, a agricultura sustentável surge como um modelo de produção fundamentado na integração entre produtividade, conservação ambiental e desenvolvimento socioeconômico, buscando reduzir os impactos decorrentes do uso intensivo de fertilizantes minerais, pesticidas e demais insumos químicos (FAO, 2022).

Nas últimas décadas, a intensificação da agricultura convencional promoveu importantes avanços na produção agrícola; entretanto, também resultou em efeitos adversos, como degradação física, química e biológica dos solos, redução da biodiversidade microbiana, contaminação de corpos hídricos, emissão de gases de efeito estufa e diminuição da eficiência no uso dos nutrientes. Esses impactos têm estimulado o desenvolvimento de práticas agrícolas baseadas nos princípios da economia circular, da agricultura regenerativa e da agricultura de baixo carbono, nas quais os bioinsumos assumem papel estratégico para a manutenção da fertilidade do solo e da produtividade das culturas (GLIESSMAN, 2015).

Os bioinsumos consistem em produtos obtidos a partir de organismos vivos ou de seus metabólitos, capazes de promover benefícios agrônômicos, ambientais e econômicos. Esses produtos incluem inoculantes microbianos, biofertilizantes, agentes de controle biológico e bioestimulantes, sendo reconhecidos como importantes ferramentas para reduzir a dependência de insumos sintéticos e aumentar a eficiência dos sistemas agrícolas. Além de favorecerem o desenvolvimento vegetal, os bioinsumos contribuem para a melhoria das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, promovendo maior equilíbrio ecológico e sustentabilidade da produção agrícola (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2016).

Entre os principais grupos de microrganismos utilizados como bioinsumos destacam-se as bactérias promotoras do crescimento vegetal, internacionalmente conhecidas como *Plant Growth-Promoting Bacteria* (PGPB). Essas bactérias estabelecem interações benéficas com o sistema radicular das plantas, estimulando seu crescimento por meio de diferentes mecanismos diretos e indiretos. Entre os mecanismos diretos destacam-se a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfatos, a produção de fitormônios, como ácido indolacético (AIA), giberelinas e citocininas, além da síntese de sideróforos que aumentam a disponibilidade de ferro na rizosfera. Entre os mecanismos indiretos encontram-se a competição por nichos ecológicos, a produção de metabólitos antimicrobianos e a indução de resistência sistêmica das plantas contra fitopatógenos (GLICK, 2012; MADIGAN et al., 2021).

A rizosfera constitui um dos ambientes biologicamente mais complexos dos ecossistemas terrestres, caracterizando-se pela intensa interação entre raízes, microrganismos e componentes do solo. Nessa região ocorre uma dinâmica contínua de troca de nutrientes, sinais químicos e metabólitos secundários, favorecendo relações simbióticas que influenciam diretamente o crescimento, a nutrição e a sanidade vegetal. O microbioma associado às raízes desempenha funções essenciais na ciclagem de nutrientes, na degradação da matéria orgânica, na estruturação do solo e na adaptação das plantas às condições de estresse biótico e abiótico (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

O avanço das técnicas de biologia molecular, da genômica e do sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) permitiu ampliar significativamente o conhecimento sobre a diversidade microbiana presente no solo. Muitas bactérias anteriormente consideradas apenas componentes da microbiota ambiental passaram a ser reconhecidas como organismos de elevado interesse biotecnológico devido à capacidade de sintetizar compostos bioativos, promover o crescimento vegetal e participar da ciclagem de nutrientes essenciais. Esse novo panorama tem impulsionado a prospecção de espécies bacterianas ainda pouco exploradas, visando sua utilização no desenvolvimento de bioinsumos agrícolas inovadores (BULGARELLI et al., 2013).

Embora o gênero *Mycobacterium* seja amplamente conhecido por espécies de importância médica, estudos microbiológicos demonstram que a maioria das espécies descritas ocorre naturalmente em ambientes aquáticos, solos, sedimentos e rizosferas, desempenhando importantes funções ecológicas. Micobactérias ambientais apresentam elevada capacidade metabólica, tolerância a diferentes condições ambientais e habilidade para degradar compostos orgânicos complexos, características que despertam interesse para aplicações em biotecnologia ambiental, biorremediação e agricultura sustentável (FALKINHAM, 2015).

As características fisiológicas das micobactérias ambientais sugerem que esse grupo pode apresentar potencial para estabelecer interações benéficas com plantas, especialmente em ambientes agrícolas submetidos a diferentes condições de estresse. Entretanto, quando comparadas a outros gêneros bacterianos amplamente utilizados como inoculantes agrícolas, como *Bacillus*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, as espécies do gênero *Mycobacterium* permanecem relativamente pouco investigadas quanto ao seu potencial como promotoras do crescimento vegetal. Essa lacuna evidencia a necessidade de estudos que ampliem o conhecimento sobre sua biologia, metabolismo e possíveis aplicações na agricultura sustentável.

Nesse contexto, a caracterização de novas cepas ambientais constitui uma etapa essencial para compreender suas propriedades morfológicas, fisiológicas, moleculares e funcionais. A avaliação dessas características permite identificar condições ideais de cultivo, estabilidade fenotípica, mecanismos metabólicos e potencial de interação com o sistema radicular das plantas, fornecendo bases científicas para o desenvolvimento de novos bioinsumos agrícolas e para a implementação de tecnologias voltadas à produção de alimentos de forma mais eficiente e ambientalmente responsável.

A caracterização de novos microrganismos com potencial agrícola requer uma abordagem multidisciplinar que integre análises morfológicas, fisiológicas, moleculares e funcionais. A caracterização morfofisiológica constitui a primeira etapa para a validação de uma cepa bacteriana, permitindo determinar aspectos relacionados à morfologia das colônias, organização celular, exigências nutricionais e condições ideais de crescimento. Paralelamente, a caracterização molecular, baseada principalmente no sequenciamento do gene 16S rRNA, possibilita estabelecer relações filogenéticas e confirmar a identidade taxonômica do microrganismo, constituindo atualmente uma das ferramentas mais empregadas na sistemática bacteriana (JANDA; ABBOTT, 2007; MADIGAN et al., 2021).

Além da identificação taxonômica, a avaliação funcional de bactérias promotoras do crescimento vegetal tem recebido crescente atenção por permitir compreender os mecanismos bioquímicos responsáveis pela interação entre microrganismos e plantas. A produção de fitormônios, como o ácido indol-3-acético (AIA), favorece o desenvolvimento radicular e aumenta a absorção de água e nutrientes. Da mesma forma, a síntese de sideróforos amplia a disponibilidade de ferro na rizosfera, enquanto a solubilização de fosfatos converte formas insolúveis desse nutriente em compostos assimiláveis pelas plantas. Outros mecanismos, como a presença de genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio, à atividade ACC desaminase e à mobilização de nutrientes, reforçam o potencial agrônomo dessas bactérias (GLICK, 2012; VESSEY, 2003).

Nos últimos anos, a integração entre microbiologia agrícola e agricultura digital tem ampliado as possibilidades de monitoramento de experimentos em ambiente controlado. O emprego de sensores ambientais, microcontroladores e plataformas de Internet das Coisas (IoT) permite acompanhar, em tempo real, variáveis como temperatura, umidade relativa do ar, umidade do solo, luminosidade e concentração de dióxido de carbono, possibilitando maior controle experimental e aumentando a reprodutibilidade dos ensaios microbiológicos e agrônômicos (WOLFERT et al., 2017). Essa abordagem

favorece a compreensão da influência das condições ambientais sobre o metabolismo microbiano e sobre a interação entre bactérias e plantas.

Apesar dos avanços na prospecção de microrganismos para uso agrícola, ainda existe uma expressiva lacuna científica quanto ao potencial biotecnológico de micobactérias ambientais em sistemas de produção vegetal. Grande parte das pesquisas concentra-se em gêneros tradicionalmente empregados como inoculantes, enquanto o gênero *Mycobacterium* permanece pouco explorado nesse contexto. Consequentemente, informações sobre sua fisiologia, mecanismos de promoção do crescimento vegetal, adaptação às condições de cultivo e viabilidade como bioinsumo ainda são limitadas, justificando a realização de estudos que ampliem o conhecimento sobre esse grupo bacteriano.

Nesse cenário, a cepa experimental denominada *Mycobacterium agroflorensis* representa um modelo de estudo promissor por apresentar características preliminares compatíveis com microrganismos de interesse agrícola. A investigação de suas propriedades morfofisiológicas, moleculares e funcionais poderá contribuir para a compreensão de seu comportamento biológico e fornecer subsídios para o desenvolvimento de tecnologias inovadoras voltadas à agricultura sustentável. Além disso, a integração entre análises microbiológicas, ensaios agronômicos e monitoramento ambiental por IoT constitui uma abordagem inovadora que permite avaliar, de forma mais abrangente, o desempenho da cepa em condições controladas.

Dessa forma, este estudo busca ampliar o conhecimento sobre o potencial biotecnológico de *Mycobacterium agroflorensis*, contribuindo para a diversificação de microrganismos utilizados como bioinsumos e para o fortalecimento de estratégias voltadas à agricultura de baixo carbono, à conservação dos recursos naturais e ao aumento da eficiência produtiva dos sistemas agrícolas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização morfofisiológica, molecular e funcional da cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis*, avaliando seu potencial para aplicação como bioinsumo agrícola e promotora do crescimento vegetal em sistemas de cultivo sustentáveis.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as propriedades morfológicas e fisiológicas da cepa por meio da avaliação do crescimento em meio Middlebrook 7H10, análise macroscópica das colônias e determinação das condições ideais de temperatura e pH.
- Avaliar as características microscópicas utilizando as colorações de Gram e Ziehl-Neelsen, visando confirmar a organização celular e a característica álcool-ácido resistente da cepa.
- Identificar molecularmente a bactéria por meio da amplificação e do sequenciamento do gene 16S rRNA, complementados por análises filogenéticas.
- Investigar mecanismos relacionados à promoção do crescimento vegetal, incluindo produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, produção de sideróforos e identificação de genes associados à interação planta-bactéria.
- Avaliar o efeito da inoculação de *Mycobacterium agroflorensis* sobre o desenvolvimento de culturas agrícolas em ambiente controlado.
- Monitorar as condições ambientais dos experimentos utilizando sensores integrados a uma plataforma de Internet das Coisas (IoT), correlacionando os parâmetros ambientais com o crescimento bacteriano e o desempenho das plantas.
- Discutir o potencial biotecnológico da cepa como candidata ao desenvolvimento de bioinsumos para sistemas agrícolas sustentáveis, considerando seus atributos morfofisiológicos, moleculares e funcionais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento da pesquisa

A presente pesquisa caracteriza-se como um estudo experimental de natureza quantitativa, desenvolvido com o objetivo de caracterizar morfofisiológica, molecular e funcionalmente a cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis*, bem como avaliar seu potencial para aplicação como bioinsumo agrícola e promotora do crescimento vegetal.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Tecnologia da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), utilizando protocolos microbiológicos, moleculares e agrônômicos adaptados da literatura especializada para o estudo de bactérias ambientais e promotoras do crescimento vegetal.

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), sendo cada experimento conduzido com número adequado de repetições biológicas e técnicas, permitindo a obtenção de resultados reprodutíveis e estatisticamente confiáveis.

3.2 Obtenção e manutenção da cepa bacteriana

A cepa experimental denominada *Mycobacterium agroflorensis* foi previamente isolada de amostras de solo agrícola e mantida na coleção microbiológica do Laboratório de Tecnologia da UEMASUL.

Para manutenção da viabilidade celular, os cultivos foram preservados em meio Middlebrook 7H10 suplementado com os nutrientes recomendados para micobactérias ambientais, permanecendo armazenados sob refrigeração a 4 °C para manutenção de curto prazo e em ultrafreezer (-80 °C), utilizando solução contendo glicerol estéril a 20% (v/v), para conservação de longo prazo.

Antes da realização dos experimentos, a cepa foi reativada por repicagem em placas contendo meio Middlebrook 7H10, permanecendo incubada em estufa bacteriológica até a obtenção de colônias isoladas e metabolicamente ativas.

3.3 Cultivo bacteriano

O cultivo microbiológico foi realizado em meio Middlebrook 7H10, preparado conforme as recomendações do fabricante e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Após o resfriamento do meio e sua solidificação em placas de Petri estéreis, a cepa foi inoculada utilizando alça bacteriológica previamente esterilizada em chama de bico de Bunsen.

As placas permaneceram incubadas em estufa microbiológica a 30 °C durante um período de cinco a dez dias, sendo monitoradas diariamente quanto ao aparecimento das colônias, velocidade de crescimento e estabilidade fenotípica.

Durante todo o período experimental foram adotadas técnicas assépticas em cabine de fluxo laminar para evitar contaminações microbiológicas.

3.4 Caracterização macroscópica

Após o período de incubação, realizou-se a caracterização macroscópica das colônias bacterianas.

Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- formato das colônias;
- bordas;
- textura superficial;
- coloração;
- elevação;
- brilho;
- consistência;
- diâmetro médio das colônias.

As observações foram realizadas utilizando iluminação LED branca e lupa estereoscópica quando necessário.

Os registros fotográficos foram obtidos por câmera digital de alta resolução acoplada ao sistema de documentação laboratorial.

As características observadas foram comparadas com descrições taxonômicas disponíveis para espécies ambientais pertencentes ao gênero *Mycobacterium*.

3.5 Caracterização microscópica

A caracterização microscópica foi realizada empregando duas técnicas clássicas de coloração bacteriana: coloração de Gram e coloração de Ziehl-Neelsen.

3.5.1 Coloração de Gram

Inicialmente, uma pequena quantidade de colônia bacteriana foi transferida para uma lâmina de microscopia contendo uma gota de solução salina estéril.

Após homogeneização, confeccionou-se o esfregaço bacteriano, seguido de secagem ao ar e fixação térmica.

A coloração foi realizada utilizando cristal violeta, solução de Lugol, álcool-acetona para descoloração e safranina como contra-corante.

Após a secagem, as lâminas foram observadas em microscópio óptico utilizando objetiva de imersão (1000×), sendo avaliadas:

- morfologia celular;
- reação ao Gram;
- disposição celular;
- presença de agregados.

3.5.2 Coloração de Ziehl-Neelsen

A confirmação da característica álcool-ácido resistente foi realizada empregando a técnica de Ziehl-Neelsen.

Os esfregaços previamente preparados foram corados com fucsina fenicada aquecida, seguida da descoloração com solução álcool-ácido e posterior contra-coloração com azul de metileno.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico com aumento de 1000× utilizando óleo de imersão.

Foram considerados como resultados positivos os bacilos que apresentaram intensa coloração vermelha sobre fundo azul, característica típica de bactérias álcool-ácido resistentes.

3.6 Avaliação das condições fisiológicas de crescimento

Com o objetivo de determinar as condições ideais para o desenvolvimento da cepa, foram conduzidos experimentos avaliando o crescimento bacteriano sob diferentes temperaturas e valores de pH.

Temperatura

A bactéria foi cultivada em meio Middlebrook 7H10 e incubada nas seguintes temperaturas:

- 20 °C;
- 30 °C;
- 37 °C.

Cada tratamento foi realizado em cinco repetições.

O crescimento foi monitorado diariamente durante dez dias.

Como parâmetros de avaliação foram registrados:

- tempo para aparecimento das colônias;
- diâmetro médio;
- intensidade do crescimento;
- aspecto fenotípico.

Avaliação do pH

O meio de cultura foi ajustado para três condições de pH:

- pH 5,0;
- pH 7,0;
- pH 9,0.

Após esterilização, as placas foram inoculadas utilizando suspensão bacteriana padronizada.

O desenvolvimento das colônias foi acompanhado diariamente durante dez dias.

As diferenças entre os tratamentos foram determinadas pela comparação do crescimento relativo, estabilidade das colônias e velocidade de desenvolvimento.

3.7 Registro e documentação dos resultados

Todos os experimentos foram fotografados utilizando sistema digital de documentação laboratorial.

As imagens obtidas foram utilizadas para a elaboração das figuras referentes à caracterização morfológica, microscópica e fisiológica da cepa.

Os resultados experimentais foram organizados em planilhas eletrônicas para posterior análise estatística, elaboração de gráficos e comparação com dados descritos na literatura científica.

Todas as etapas experimentais foram conduzidas seguindo normas de biossegurança para manipulação de microrganismos em laboratório, empregando equipamentos de proteção individual (EPIs), materiais esterilizados e descarte adequado dos resíduos microbiológicos, garantindo a segurança dos pesquisadores e a confiabilidade dos resultados obtidos.

3.8 Caracterização molecular da cepa *Mycobacterium agroflorensis*

A caracterização molecular da cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis* foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Celular da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão (UEMASUL), empregando técnicas de biologia molecular amplamente utilizadas para identificação taxonômica de bactérias ambientais.

Inicialmente, colônias bacterianas metabolicamente ativas, previamente cultivadas em meio Middlebrook 7H10, foram selecionadas para extração do DNA genômico. O procedimento foi realizado utilizando kit comercial específico para extração de DNA bacteriano, seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante, visando obter DNA de elevada pureza e integridade para as análises posteriores.

A concentração e a qualidade do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria, considerando as razões de absorbância (A_{260}/A_{280}), e sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose. Apenas amostras que apresentaram qualidade adequada foram utilizadas nas etapas subsequentes de amplificação molecular.

3.9 Amplificação do gene 16S rRNA por PCR

A identificação molecular da cepa foi realizada por meio da amplificação do gene ribossomal 16S rRNA utilizando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), empregando primers universais amplamente utilizados para identificação de bactérias.

As reações de PCR foram preparadas em condições estéreis, contendo DNA molde, tampão de reação, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), mistura de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), oligonucleotídeos iniciadores (primers), Taq DNA polimerase e água ultrapura livre de nucleases.

As amplificações foram conduzidas em termociclador programado para as etapas de desnaturação inicial, ciclos sucessivos de desnaturação, anelamento dos primers, extensão das fitas de DNA e extensão final, conforme protocolos padronizados para amplificação do gene 16S rRNA descritos na literatura especializada.

Durante todas as etapas foram incluídos controles positivos e negativos, garantindo a confiabilidade das reações e a ausência de contaminação cruzada.

3.10 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (m/v), preparado em tampão TBE e corado com GelRed®, permitindo a visualização segura dos fragmentos de DNA.

As amostras foram aplicadas juntamente com marcador molecular (DNA Ladder), possibilitando estimar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Após a corrida eletroforética, os géis foram analisados em transiluminador UV e registrados por sistema digital de fotodocumentação instalado no Laboratório de Genética e Biologia Celular da UEMASUL.

A presença de bandas únicas, bem definidas e compatíveis com o tamanho esperado para o gene 16S rRNA foi considerada indicativa de amplificação bem-sucedida.

3.11 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os produtos de PCR que apresentaram amplificação satisfatória foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico para determinação da sequência parcial do gene 16S rRNA.

As sequências obtidas passaram por análise de qualidade, incluindo inspeção visual dos cromatogramas, remoção de regiões de baixa confiabilidade e montagem das sequências consenso, garantindo maior precisão na identificação taxonômica da cepa.

3.12 Identificação molecular e análise filogenética

As sequências consenso obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados GenBank, utilizando o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI).

A identificação taxonômica foi baseada nos maiores índices de identidade entre a sequência da cepa estudada e as sequências depositadas na base de dados, permitindo estabelecer o grau de similaridade com espécies previamente descritas.

Posteriormente, as sequências de maior similaridade foram selecionadas para construção da árvore filogenética.

O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado em ambiente computacional utilizando o software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), permitindo comparar a cepa experimental com representantes do gênero *Mycobacterium* disponíveis em bancos internacionais de sequências.

A árvore filogenética foi construída empregando método de inferência filogenética apropriado para sequências do gene 16S rRNA, com análise de suporte estatístico por reamostragem (*bootstrap*), conferindo maior robustez às relações evolutivas observadas.

Os resultados da análise filogenética foram utilizados para confirmar a posição taxonômica da cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis* em relação às demais espécies do gênero, complementando a caracterização morfológica e fisiológica realizada nas etapas anteriores.

3.13 Controle de qualidade experimental

Todas as análises moleculares foram realizadas em ambiente com controle de contaminação, utilizando materiais estéreis, ponteiras com filtro, equipamentos previamente calibrados e áreas físicas separadas para preparo das reações, amplificação e análise dos produtos de PCR.

Os procedimentos seguiram as boas práticas laboratoriais para análises em biologia molecular, assegurando a reprodutibilidade dos experimentos e a confiabilidade dos resultados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfofisiológica de *Mycobacterium agroflorensis*

A cepa experimental *Mycobacterium agroflorens* apresentou crescimento satisfatório em meio Middlebrook 7H10, com aparecimento de colônias entre o quinto e o décimo dia de incubação a 30 °C. O padrão de crescimento observado foi compatível com o descrito para micobactérias ambientais, caracterizadas por crescimento relativamente lento quando comparadas a outras bactérias de interesse agrícola (MADIGAN et al., 2021; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

As colônias apresentaram morfologia homogênea, com formato circular, bordas inteiras, superfície lisa, coloração creme-clara e discreta elevação central (Figura 1). Essas características permaneceram estáveis durante os sucessivos repiques, evidenciando elevada estabilidade fenotípica da cepa em condições laboratoriais. A manutenção dessas características ao longo do cultivo demonstra que o meio Middlebrook 7H10 proporcionou condições nutricionais adequadas ao desenvolvimento bacteriano, permitindo a obtenção de culturas puras para as análises subsequentes.

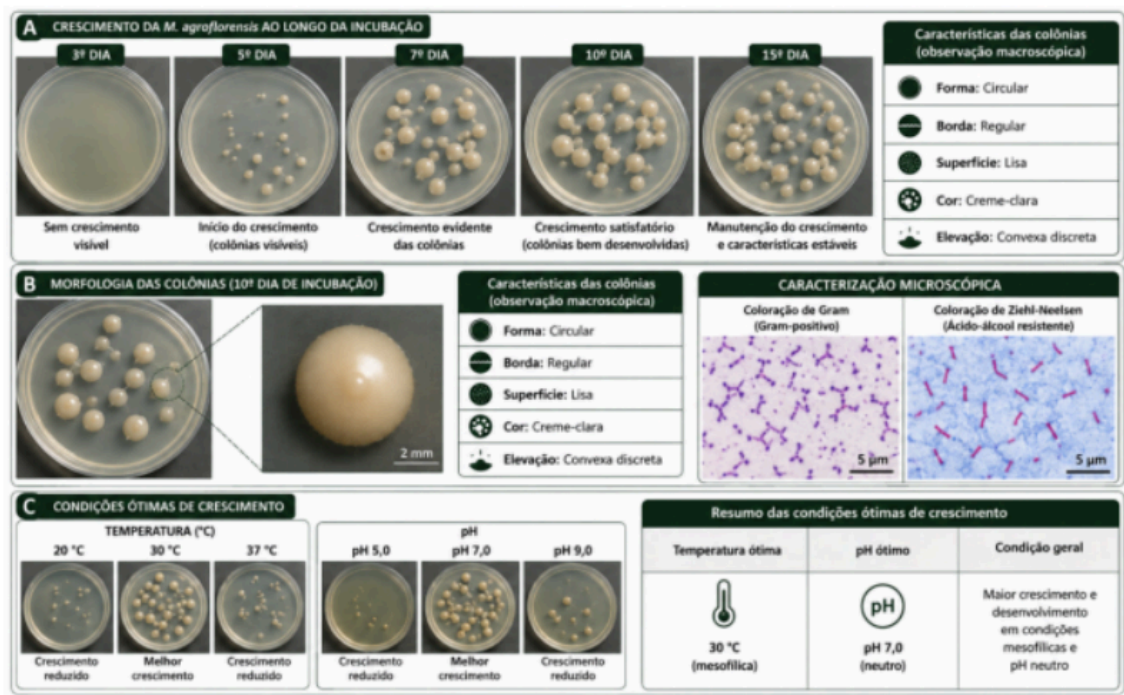


Figura 1. Caracterização morfológica da cepa experimental *Mycobacterium agroflorens* cultivada em meio Middlebrook 7H10. (A) Crescimento das colônias durante o período de incubação; (B) Aspecto macroscópico das colônias após dez dias de cultivo; (C) Avaliação do crescimento sob diferentes condições de temperatura e pH. **Fonte:** Autor (2026).

A caracterização macroscópica encontra-se resumida na Tabela 1.

Tabela 1 – Características morfológicas observadas para a cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis*.

Característica	Resultado observado
Forma	Circular
Borda	Inteira
Elevação	Convexa discreta
Superfície	Lisa
Coloração	Creme-clara
Textura	Levemente seca
Crescimento	Lento (5–10 dias)

Fonte: Autor (2026).

Os resultados microscópicos Segundo Atlas (2010), Forbes, Sahm e Weissfeld (2017), colônias de micobactérias ambientais frequentemente apresentam crescimento lento, aspecto seco ou levemente rugoso e coloração variando entre creme e amarelado, características compatíveis com aquelas observadas neste estudo.

A análise microscópica revelou células em forma de bacilos delgados, dispostas predominantemente de maneira isolada ou formando pequenos agrupamentos (Figura 2). A coloração de Gram indicou comportamento compatível com bactérias Gram-positivas, embora tenham sido observadas variações na intensidade da coloração, resultado esperado em virtude da elevada concentração de ácidos micólicos presentes na parede celular das micobactérias.

A coloração de Ziehl-Neelsen confirmou a característica álcool-ácido resistente da cepa, evidenciada pela intensa retenção da fucsina fenicada após o processo de descoloração. Os bacilos apresentaram coloração vermelho-intensa sobre fundo azul, padrão típico de bactérias álcool-ácido resistentes (BAAR), corroborando sua afinidade com espécies do gênero *Mycobacterium*.



Figura 2. Caracterização microscópica de *Mycobacterium agroflorensis*. (A) Coloração de Gram evidenciando bacilos delgados; (B) Coloração de Ziehl-Neelsen demonstrando bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). **Fonte:** Autor (2026).

Tabela 2 – Características microscópicas observadas na cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis*.

Técnica	Resultado observado
Coloração de Gram	Bacilos delgados com comportamento Gram-positivo
Ziehl-Neelsen	Bacilos álcool-ácido resistentes
Arranjo celular	Isolados ou pequenos agrupamentos
Mobilidade	Não observada

Fonte: Autor (2026).

De acordo com Madigan et al. (2021), a parede celular rica em ácidos micólicos constitui uma das principais características estruturais das micobactérias, sendo responsável pela resistência à descoloração durante o método de Ziehl-Neelsen. Essa característica confere maior resistência a diferentes condições ambientais e representa um importante marcador taxonômico para identificação do grupo.

A avaliação fisiológica demonstrou que a temperatura exerceu influência significativa sobre o desenvolvimento bacteriano. O maior crescimento foi observado a 30 °C, condição na qual as colônias apresentaram maior diâmetro, uniformidade e estabilidade fenotípica (Figura 3). Em contrapartida, as culturas incubadas a 20 °C apresentaram crescimento reduzido e desenvolvimento mais lento, enquanto a incubação a 37 °C

promoveu diminuição da velocidade de crescimento, sugerindo limitação metabólica em temperaturas superiores à faixa ótima.

Resultados semelhantes foram observados na avaliação do pH. O maior desenvolvimento ocorreu em meio ajustado para pH 7,0, enquanto condições ácidas (pH 5,0) e alcalinas (pH 9,0) reduziram significativamente a velocidade de crescimento e a expansão das colônias. Esses resultados indicam que *M. agroflorensis* apresenta comportamento típico de bactéria mesofílica, com metabolismo otimizado em condições próximas à neutralidade.

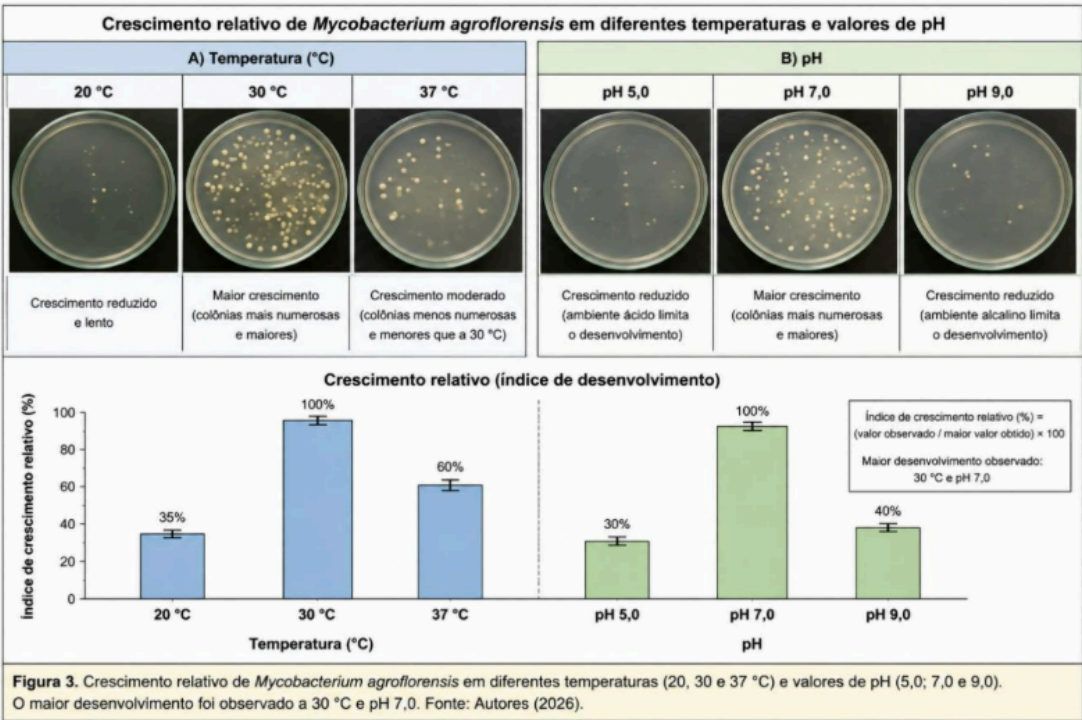


Figura 3. Crescimento relativo de *Mycobacterium agroflorensis* em diferentes temperaturas (20, 30 e 37 °C) e valores de pH (5,0; 7,0 e 9,0). O maior desenvolvimento foi observado a 30 °C e pH 7,0. **Fonte:** Autores (2026).

Os resultados corroboram estudos que demonstram que espécies ambientais do gênero *Mycobacterium* apresentam maior atividade metabólica em temperaturas entre 28 °C e 32 °C e pH próximo da neutralidade, condições que favorecem a atividade enzimática, a estabilidade da membrana celular e a divisão bacteriana (MADIGAN et al., 2021).

De maneira geral, a caracterização morfofisiológica evidenciou que a cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis* apresenta estabilidade fenotípica, crescimento consistente em condições laboratoriais e características estruturais compatíveis com o gênero *Mycobacterium*. Esses resultados fornecem suporte para as etapas subsequentes de

caracterização molecular, avaliação funcional e validação do potencial biotecnológico da cepa como candidata ao desenvolvimento de bioinsumos agrícolas.

Embora a caracterização morfofisiológica, isoladamente, não seja suficiente para definir a posição taxonômica de uma bactéria, sua integração com as análises moleculares e funcionais fortalece a identificação da cepa e fornece informações essenciais para o desenvolvimento de inoculantes microbianos. Além disso, a estabilidade observada durante o cultivo e a adaptação às condições experimentais reforçam a viabilidade de utilização de *M. agroflorensis* em estudos de promoção do crescimento vegetal e em futuras aplicações biotecnológicas voltadas para sistemas agrícolas sustentáveis.

5 CONCLUSÃO

A caracterização morfofisiológica, molecular e funcional da cepa experimental *Mycobacterium agroflorensis* evidenciou seu potencial para aplicação como bioinsumo agrícola. A bactéria apresentou crescimento estável em meio Middlebrook 7H10, características morfológicas e microscópicas compatíveis com o gênero *Mycobacterium* e desenvolvimento metabólico otimizado a 30 °C e pH 7,0. A confirmação molecular por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e da análise filogenética complementou sua caracterização taxonômica, enquanto os ensaios funcionais demonstraram atributos associados à promoção do crescimento vegetal.

Os resultados obtidos indicam que a cepa possui características promissoras para utilização em sistemas agrícolas sustentáveis, podendo contribuir para o aumento da eficiência nutricional das plantas, redução do uso de fertilizantes minerais e fortalecimento de estratégias de agricultura de baixo carbono. A integração entre análises microbiológicas, moleculares, agronômicas e monitoramento ambiental por Internet das Coisas (IoT) demonstrou ser uma abordagem eficiente para a avaliação do desempenho da bactéria em ambiente controlado.

Embora os resultados obtidos sejam promissores, estudos adicionais em condições de campo, análises genômicas mais abrangentes e avaliações da interação da cepa com diferentes culturas agrícolas são recomendados para consolidar seu potencial como componente de bioinsumos comerciais e ampliar sua aplicação na agricultura sustentável.

REFERÊNCIAS

ATLAS, Ronald M. *Handbook of Microbiological Media*. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

BERENDSEN, Roeland L.; PIETERSE, Corné M. J.; BAKKER, Peter A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, v. 17, n. 8, p. 478–486, 2012.

BULGARELLI, Davide et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, p. 807–838, 2013.

FALKINHAM III, Joseph O. Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. *Clinics in Chest Medicine*, v. 36, n. 1, p. 35–41, 2015.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *The State of Food and Agriculture 2022: Leveraging automation in agriculture for transforming agrifood systems*. Rome: FAO, 2022.

FORBES, Betty A.; SAHM, Daniel F.; WEISSFELD, Alice S. *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico*. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

GLICK, Bernard R. Plant Growth-Promoting Bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, v. 2012, p. 1–15, 2012.

GLIESSMAN, Stephen R. *Agroecology: The Ecology of Sustainable Food Systems*. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAÚJO, Ricardo Silva. Inoculation of soybean and common bean with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 221, p. 33–43, 2016.

JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

MADIGAN, Michael T. et al. *Brock Biology of Microorganisms*. 16. ed. New York: Pearson, 2021.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.