

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE

**IBAMA -INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS
NATURAIS RENOVÁVEIS**

**INTRODUÇÃO INTENCIONAL DE MICRORGANISMOS EXÓTICOS EM
TERRITÓRIO NACIONAL PARA UTILIZAÇÃO COMO AGROTÓXICOS
BIOLÓGICOS OU BIORREMEDIADORES**

Consultora: Aline Daniela Lopes Júlio

Setembro/2019

ÍNDICE

PRODUTO II – DOCUMENTO TÉCNICO COM INFORMAÇÕES CIENTÍFICAS SOBRE MICRORGANISMOS E OS POSSÍVEIS IMPACTOS AMBIENTAIS DECORRENTES DA SUA INTRODUÇÃO ALÉM DE METODOLOGIAS E PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE RISCO	2
II.1 Definições e discussão sobre o conceito de espécie microbiana e espécie microbiana exótica, com base em informações científicas.	3
II.1.1 Definições e discussão sobre o conceito de espécie microbiana.....	3
II.1.2 Definições e discussão sobre o conceito de espécie microbiana exótica	5
II.2 Levantamento e discussão de procedimentos e metodologias para a identificação de microrganismos ao nível de espécie.....	7
II.3 Levantamento e discussão de critérios e requisitos para a comprovação da ocorrência natural de microrganismos.	13
II.5 Levantamento, seleção e análise, com base em material técnico e científico, de protocolos e metodologias de avaliação de risco ambiental para controle da introdução no ambiente de microrganismos, não necessariamente exóticos, incluindo seus usos como agentes de controle biológico de pragas e doenças de plantas e biorremediadores.....	19
II.6 Identificação de especialistas, no Brasil e no exterior, capazes de contribuir para a avaliação de risco ambiental da introdução de microrganismos exóticos e em assuntos relacionados a esse tema.	22
Referências.....	31

**PRODUTO II – DOCUMENTO TÉCNICO COM INFORMAÇÕES
CIENTÍFICAS SOBRE MICRORGANISMOS E OS POSSÍVEIS IMPACTOS
AMBIENTAIS DECORRENTES DA SUA INTRODUÇÃO ALÉM DE
METODOLOGIAS E PROTOCOLOS DE AVALIAÇÃO DE RISCO**

II.1 Definições e discussão sobre o conceito de espécie microbiana e espécie microbiana exótica, com base em informações científicas.

II.1.1 Definições e discussão sobre o conceito de espécie microbiana

O nível taxonômico de espécie consiste na unidade básica da diversidade biológica e foi definido por Mayr (1970) como um grupo de organismos que possuem origem monofilética e características em comum que os permitem realizar cruzamento com consequente geração de descendentes férteis. Com base nesse conceito, a capacidade adaptativa ao longo da evolução de uma espécie é mantida por cruzamento (trocas gênicas) intraespecífica. Mesmo sendo um conceito mais antigo, ele ainda é válido atualmente, apesar disso outros autores também propuseram alternativas para o conceito de espécie. Queiroz (2007) revisou esses principais conceitos, entretanto os mesmos se diferem principalmente no enfoque dado por cada autor, podendo ser ecológico, filogenético, evolucionário, monofilético, genealógico, dentre outros. Por exemplo, no conceito ecológico de espécie considera-se a espécie como uma linhagem (ou linhagens intimamente relacionadas) que ocupa uma zona adaptativa ou nicho diferente de outras linhagens e evolui separadamente de todas as linhagens fora de seu alcance (Van Valen, 1976). Contudo, de acordo com Queiroz (2007), todos esses enfoques de conceito de espécie apresentam uma idéia geral de que as espécies são como linhagens de metapopulações que evoluem de forma separada.

Outro fator importante é que a maioria desses conceitos consideram características relacionadas aos macrorganismos, mas quando se trata dos microrganismos, tais conceitos não se adequam na íntegra, tanto por causa da alta densidade das populações microbianas comparadas aos macrorganismos, quanto devido aos diferentes padrões microbianos de reprodução. Além disso, as dificuldades de quantificar ou diferenciar as características morfológicas de alguns microrganismos e a alta frequência de transferência horizontal de genes são fatores que aumentam o desafio de conceituar as espécies microbianas (Hanage et al., 2005).

Para os fungos, embora sejam organismos eucariotos, o fato de apresentarem dois estágios em seu ciclo de vida tem dificultado a determinação das características que definem uma dada espécie devido às características morfológicas muito distintas entre esses ciclos, sendo um padrão morfológico na forma sexual/teleomófica e outro na forma assexual/anamórfica. Além disso, os fungos são capazes de realizar interações intraespecíficas que podem originar novas variantes dentro de uma mesma espécie (Ramsdale, 1999) podendo

ser chamadas de raças. Sendo assim, muitas tentativas de definição de espécie para os fungos têm sido feitas (Kurtzman & Robnett, 1997; Shin et al., 2003; Gibas et al., 2004). Mais recentemente, a Comissão Internacional de Taxonomia de Fungos definiu que uma espécie fúngica deve ser definida com base em caracteres fenotípicos, nicho ecológico, morfologia, fisiologia e marcadores moleculares. Para alguns gêneros ainda deve-se analisar o perfil bioquímico de extratos produzidos (Sharma et al., 2015).

No caso dos procariotos, existem maiores discordâncias ainda sobre como esta unidade pode ser definida, mas existem vários trabalhos que buscaram fazer essa discussão. Por exemplo, o conceito de espécie para os procariotos foi definido por Rosselló-Mora & Amann (2001) como um agrupamento monofilético e genomicamente coerente de organismos individuais que mostram um alto grau de similaridade geral com relação a muitas características independentes e é diagnosticável por uma propriedade fenotípica discriminativa. Para Cohan (2002), as espécies bacterianas devem ser definidas à partir dos ecótipos, que são populações de organismos que ocupam o mesmo nicho ecológico e apresentam divergência eliminada pela seleção natural. Esses ecótipos são acessados mediante o uso de abordagens baseadas em sequências de marcadores moleculares universais. A espécie de procarioto pode ser definida ainda como um grupo de isolados testados por métodos padronizados que apresentam coerência genômica, compartilhando entre si um alto grau de similaridade para características independentes, o seja, que são encontrada apenas naquele grupo de linhagens de uma mesma espécie e não, necessariamente, em outras espécies (Stackebrandt et al., 2002). Outra questão importante é o uso do conceito de procariotos tanto para Bactéria quanto Archaea. De fato foi realizada uma consulta na página do Comitê Internacional de Sistemática de Procariontes e não foi encontrada uma definição formal e recente para os procariotos que separasse o conceito de espécie de bactéria do conceito de espécie de arqueas.

Nos últimos anos, os taxonomistas têm definido as espécies bacterianas baseando-se em caracteres genéticos e expressos que garantam cepas monofiléticas e com elevada coerência, tanto genômica quanto fenotípica (Rosselló-Móra & Amann, 2015). Essa definição surgiu mediante o uso da abordagem polifásica para identificação bacteriana (Gevers et al., 2006). Na abordagem polifásica, busca-se obter um consenso da classificação de espécie através da análise de vários métodos, sendo eles relacionados às características fenotípicas, genotípicas e monofiléticas (Rosselló-Móra & Amann, 2015). Entretanto segundo esses autores, para o futuro, o conceito de espécies de organismos procariotos deverá incluir, obrigatoriamente, o sequenciamento do genoma com alta qualidade de no mínimo espécies tipo/referência dado ao avanço das novas tecnologias de sequenciamento de nova geração que tem permitido gerar dados com alta produtividade.

Com relação aos vírus, o conceito de espécie foi definido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus em 1991 como uma classe politética de vírus que constitui uma linhagem replicante e ocupa um nicho ecológico específico. Essa característica politética significa que para discriminar as espécies não se pode eleger apenas uma característica, mas devem ser utilizadas várias características como padrões do genoma, presença de reações cruzadas antigênicas, faixa e reações do hospedeiro, tropismo tecidual, tipo de vetor e via de transmissão (Van Regenmortel, 1992). Para os vírus de RNA que se replicam sem mecanismos de reparo e por isso apresentam frequência de mutação na ordem de 10^3 a 10^5 , o conceito de quase-espécies foi proposto, dado o elevado número de mutantes gerados (Domingo et al., 1995). As classificações de espécies virais mais atuais se baseiam na similaridade de sequência com pontos de corte definidos de acordo com cada clado viral (Simmonds, 2015). Além disso, para os dados de metagenômica viral, como não se tem as informações a respeito dos possíveis hospedeiros ou características das partículas do vírion, essa classificação baseada no genoma é utilizada (Simmonds et al., 2017).

II.1.2 Definições e discussão sobre o conceito de espécie microbiana exótica

A respeito do conceito de espécie exótica, um conceito bastante generalista é proposto por Montgomery (2011) no qual a espécie exótica ou não nativa ocorre quando a espécie não é nativa de um lugar e vive fora de sua gama de distribuição nativa, visto que chegou lá por atividade humana, acidental ou deliberada, podendo ser referida como espécie introduzida, alienígena, exótica, não nativa e espécie não indígena, que são termos intercambiáveis. Para Coblenz (1990) também os organismos exóticos são organismos não nativos de um ecossistema, nos quais foram introduzidos como resultado da atividade humana. Tais organismos podem ser planta, animal, ou microrganismo e as principais preocupações em torno desses organismos giram em torno do fato deles serem capazes de deslocar espécies nativas através de competição, extirpar espécies nativas através da predação ou causando doença, e reduzir a biodiversidade através da degradação do habitat, aumento da erosão, e talvez efeitos sobre a reciclagem de nutrientes.

Adicionalmente, o termo espécie exótica geralmente está implícito na definição de espécie invasora, uma vez que espécies invasoras são não nativas, que foram introduzidas pelo homem e que podem causar prejuízos aos ecossistemas e economias locais (Hettinger, 2012). As invasões biológicas, portanto, ocorrem mediante o transporte de uma espécie nativa de uma região para outra região em que essa espécie não é nativa, sendo que estas regiões geralmente

estão separadas por barreiras geográficas (oceanos, montanhas) e após a introdução a espécie não nativa/exótica se torna exageradamente abundante (Williamson, 1996).

Algumas outras definições para organismos exóticos foram encontradas em diferentes trabalhos mas, em geral, são redundantes e de certa forma, retomam os conceitos e principais idéias já apresentados, com apenas algumas variáveis. Segundo De Silva (1989), o termo exótico(s) e introdução (s), por exemplo, são termos usados como sinônimos para definir a transferência de organismos de um país para outro. Sala e colaboradores (2000) consideram organismos exóticos apenas como organismos que foram introduzido em um ambiente que não é o seu ambiente natural. Blackburn e colaboradores (2014) definem espécies alienígenas/exóticas como espécies movidas pela atividade humana além dos limites de sua faixa nativa, para áreas onde não ocorrem naturalmente. Assim, segundo Vitule & Prodocimo (2012) pode-se afirmar que além dos termos espécie introduzida, espécie exótica, espécie não nativa, espécie alóctone e variantes poderem ser consideradas sinônimos, denotam de forma generalizada e simplificada: “toda e qualquer espécie transportada pelo ser humano e solta, intencional ou acidentalmente, fora de sua área de distribuição e ocorrência natural (FAO, 2006).

Mais recentemente Sagoff (2018), menciona a dificuldade ou até mesmo impossibilidade de apresentar um conceito científico de espécies exóticas que seja consenso entre os pesquisadores, o que leva justamente ao uso desses conceitos vagos e generalistas. Neste trabalho discute-se, ainda, o fato de que alguns pesquisadores defendem que a distinção entre espécies nativas e não nativas possa ser baseada em fatores geográficos e históricos apenas, independente do envolvimento humano. Mas que muitos outros defendem que o envolvimento humano faz toda a diferença e está implícito no conceito de espécie exótica. Entretanto, um problema nesse caso deriva do fato de muitas espécies chegarem em novos lugares como resultado de mudanças climáticas ou fenômenos ambientais, como tsunamis, que são, de certa forma, resultados indiretos da atividade humana, mas que não haveria assistência humana direta nessas situações. Isso leva a debates sobre que tipos, graus de envolvimento e atividades humanas seriam consideradas adequadas para se enquadrar nessas definições.

Para os microrganismos, não foi encontrada uma definição diferenciada ou específica de espécie exótica. Na verdade, o uso do conceito exótico não é tão comum para os microrganismos, os trabalhos geralmente não tratam deles como sendo a espécie exótica em questão e muitos têm investigado o efeito de espécies exóticas como plantas na estrutura da comunidade microbiana (Van der Putten et al., 2007; Callaway, 2008, Inderjit, 2010). Nos trabalhos encontrados nos quais menciona-se espécies exóticas de microrganismos, essa expressão é utilizada para designar microrganismos que não são nativos ou indígenas de um

determinado território, mas que chegaram nele naturalmente ou de forma intencional, se tornando a partir daí espécies invasoras ou seja, conceitos que coincidem e são comumente usado para organismos exóticos em geral, conforme já mencionado. Inclusive, nas buscas em artigos científicos para microrganismos, especificamente, o termo exótico não é tão comumente empregado, encontra-se um uso maior de termos como “não-indígenos”, “não nativos” “invasores” e até mesmo “alienígenas”.

Mais recentemente, legislações brasileiras de acesso ao patrimônio genético e a partir das quais foi criado O Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Lei Nº 13.123 de 20 de maio de 2015 e o Decreto Nº 8.772 de 11 de maio de 2016), trazem a definição de como considerar o microrganismo exótico. No parágrafo único do 2º artigo da Lei 13.123 considera-se “parte do patrimônio genético existente no território nacional, para os efeitos desta Lei, o microrganismo que tenha sido isolado a partir de substratos do território nacional, do mar territorial, da zona econômica exclusiva ou da plataforma continental”, ou seja, todos os demais seriam considerados exóticos. Já no Decreto Nº 8.772 define-se que o microrganismo não será considerado patrimônio genético nacional, subentendendo-se, portanto, que seria considerado exótico, quando for comprovado que “foi isolado a partir de substratos que não sejam do território nacional, do mar territorial, da zona econômica exclusiva ou da plataforma continental”.

II.2 Levantamento e discussão de procedimentos e metodologias para a identificação de microrganismos ao nível de espécie

A identificação ao nível de espécie é imprescindível para os mais distintos usos dos microrganismos como na indústria, agricultura, medicina, além de auxiliar nas regulações de quarentenas e nas definições de patentes. Alguns termos abaixo do nível de espécie também são definidos, como o termo tipo (ou Type) que se refere a um conjunto de linhagens dentro de uma espécie, podendo ser chamado também de biótipos ou sorotipos e o termo estirpe que se refere a uma linhagem ou um único isolado de uma dada espécie (Sandle, 2016). Essas descrições são importantes porque embora na maioria das vezes a identificação ao nível de espécie seja suficiente, em outras situações também é importante determinar as diferenças entre espécies, ou seja, o que caracteriza uma dada linhagem e/ou biótipos, sejam eles de importância clínica, ambiental ou econômica, dado que variações relevantes em relação à esses aspectos ainda podem existir numa mesma espécie.

Os caracteres morfológicos e fisiológicos foram os únicos utilizados na identificação das espécies microbianas antes do desenvolvimento das técnicas de comparação genômica, o

que ocorreu a partir da década de 60. Desde então, passou-se a considerar, além das características morfológicas/fisiológicas, a relação do conteúdo G + C (guanina + citosina) e a porcentagem de hibridação DNA-DNA entre genomas (Rosselló-Móra & Amann, 2015). Em seguida, outro marco na identificação de espécies microbianas foi a reconstrução genealógica baseada nos genes do RNA ribossômico proposta por Carl Woese, que alterou totalmente a configuração das árvores filogenéticas anteriores (Woese, 1987).

Nos últimos anos para a identificação microbiana ao nível de espécie é proposta a abordagem polifásica (Gevers et al., 2006), a qual se adequa à exigência dos taxonomistas e consiste em se utilizar um amplo conjunto de parâmetros com intuito de obter um consenso entre eles e, assim, chegar numa identificação com o mínimo possível de contraditoriedade. Para tanto, na abordagem polifásica avalia-se a combinação de várias categorias de informações como características fenotípicas, genômicas e de monofilia do microrganismo (Rosselló-Móra & Amann, 2015).

Em relação às características monofiléticas, a reconstrução filogenética ainda é considerada um método interessante para a identificação taxonômica dos microrganismos porque auxilia na visualização das proximidades evolutivas entre eles, podendo ser observado o agrupamento monofilético quando os membros pertencem a uma dada espécie (Rosselló-Móra & Amann, 2015). Essa metodologia utiliza das sequências de genes housekeeping, que são marcadores filogenéticos moleculares, ou seja, possuem regiões conservadas dentro dos mais diferentes filos microbianos e regiões variáveis/hipervariáveis que permitem a discriminação dos táxons ao nível de espécie (Ludwig & Schleifer, 1994). Os genes do RNA ribossomal ainda tem sido os mais utilizados nesse método, em especial o gene rRNA 16S para bactérias e Archaeas e o gene rRNA 18S e 28S, além da região espaçadora interna transcrita (ITS), para os fungos. Contudo, existe uma ampla discussão entre os taxonomistas microbianos a respeito de qual o ponto de corte de similaridade entre esses genes deve ser usado para garantir uma coerência genômica entre as espécies. Por exemplo, para o rRNA 16S o valor acima de 97% de similaridade entre os organismos foi por muito tempo usado, mas esse valor foi substituído para valores acima de 98,7–99% como proposto por Stackebrandt (2006).

Alguns autores, mais recentemente, sugerem que para fins taxonômicos, a reconstrução filogenética utilizando o 16S rRNA deve assegurar o uso de sequências completas desse gene e com alta qualidade de alinhamento considerando a sua estrutura secundária, já que ela interfere na conformação do rRNA (Yarza et al., 2014). A estrutura secundária do rRNA 16S é altamente preservada, contendo em torno de 50 hélices, as quais podem chegar a um pareamento de 67% dos resíduos, proporcionando uma homologia de posições nas sequências que serão utilizadas nos alinhamentos múltiplos das análises filogenéticas (Ludwig & Schleifer,

1994). Entretanto, tem se observado que para muitos organismos a análise de apenas um gene não é suficiente para atingir uma resolução taxonômica ao nível de espécie com uso das abordagens filogenéticas. Por isso, foi desenvolvida a abordagem de MLST (multi locus sequence typing) (Maiden et al.,1998). Essa técnica se baseia nas reconstruções filogenéticas utilizando vários genes housekeeping. Dentre esse genes pode-se citar alguns usados na identificação de procariotos como: carbamato-quinase (*arcC*), shiquimato desidrogenase (*aroE*), glicerol-quinase (*glpF*), guanilato-quinase (*gmk*), fosfato acetiltransferase (*pta*), triosefosfato isomerase (*tpi*), acetil coenzima A acetiltransferase (*yqiL*), glicose-6-fosfato isomerase (*glp*), DNA girase, subunidade B (*gyrB*), malato-lactato desidrogenase (*mdh*), metionil-tRNA sintetase (*metG*), fosforibosilaminoimidazol sintetase (*purM*), trephononimidazol sintetase (*purM*), tetronona sintetase (*dtdS*), descarboxilase de diaminopimelato (*lysA*), subunidade alfa da transhidrogenase (*pntA*), dihidroorotase (*pyrC*) e triptofanase (*tnaA*) (Maiden et al., 1998; Spratt,1999). Para os fungos, são usados genes que codificam algumas proteínas, como RNA polimerase II (*rpb1* e *rpb2*), b-tubulina (*beta-Tub*), calmodulina (*cal*), γ -actina (*act*), ATP sintase (*atp6*), o fator de alongamento da tradução alfa-1 (EF-1alfa), um polissacarídeo da cápsula (*cap59*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd1*), lacase (*lac1*), fosfolipase B1 (*plb1*), superóxido dismutase de manganês (*sod1*), genes de orofidina monofosfato pirofosforilase (*ura5*) e a região do espaço intergênico 1 (Meyer et al., 2009; Sharma et al., 2015). Além disso, para uma robusta identificação taxonômica estima-se que é necessário analisar no mínimo cinco genes e para organismos com proximidade filogenética pode ser necessário utilizar até 20 desses genes (Stackebrandt et al., 2002; Soria-Carrasco et al., 2007).

No que diz respeito à coerência genômica, na revisão escrita por Rosselló-Móra & Amann (2015) sugere-se que a hibridação DNA-DNA, antes considerada padrão ouro para a identificação das espécies, não precisa mais ser utilizada porque com os avanços no sequenciamento de nova geração, o cálculo da identidade genômica pode ser realizado *in silico*. Além disso, a técnica de MLSA (multilocus sequence analysis) apesar de ainda ser muito utilizada para a identificação das espécies em nível genômico não é competitiva, pois depende da construção de muitos pares de primers em função de cada organismo de interesse, o que onera os custos e aumenta o tempo de obtenção dos resultados. Em seguida, esses autores sugerem que para a obtenção da coerência genômica deve-se primeiro sequenciar o genoma da estirpe tipo com alta qualidade para posteriormente avaliar os parâmetros de identidade média de nucleotídeo (ANI), no qual valores acima de 96% de identidade média caracteriza a mesma espécie e o cálculo de regressão da assinatura de tetranucleotídeo (TETRA), no qual espécies para serem consideradas similares devem apresentar valores acima de 0.999 de regressão.

A ANI é uma medida de relação genética entre os genomas que considera os genes conservados entre eles e os genes específicos da linhagem, o que contribui para a eficiência da resolução filogenética. Uma vantagem do uso dessa medida é o fato dela ser baseada na identidade de um grande número de genes, diferentemente dos dados gerados à partir de um único gene como os genes 16S ou 18S rRNA. Além disso, os valores de ANI não são, significativamente, afetados pela variação das taxas evolutivas ou pela transferência horizontal de genes (Arahal, 2014). Os valores de ANI apresentam uma alta correlação linear com os valores experimentais de hibridação DNA-DNA e o valor padrão de 70% de hibridação DNA-DNA se correlaciona com valores de ANI acima de 94% (Konstantinidis & Tiedje, 2005). Para calcular os valores de ANI nas comparações genômicas foram projetadas a ferramenta JSpecies que se baseia algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997) e outra ferramenta chamada de MUMmer (Kurtz et al., 2004) capaz de realizar de forma rápida os alinhamentos. Além disso, um cálculo estatístico baseado nas frequências de tetranucleotídeos (TETRA) e que não depende de alinhamento foi desenvolvido. Nesse caso, o índice de correlação de assinatura de tetranucleotídeo, geralmente se correlaciona com o ANI, podendo contribuir para a decisão de quando dois organismos devem ser classificados na mesma espécie. O cálculo de TETRA se baseia no fato de que o codon usage de cada tipo de genoma determina uma dada frequência que é característica da espécie, considerando que são possíveis mais de 256 combinações dos grupos de sequências contendo tetranucleotídeos. Assim, genomas intimamente relacionados apresentarão uma distribuição semelhante dessas assinaturas, o que levará a um elevado valor de correlação. Em contrapartida, quando os genomas apresentarem divergência, os valores dessas assinaturas apresentaram maior dispersão e, portanto, menor valor de correlação (Arahal, 2014).

As análises fenotípicas são importantes para complementar as previsões baseadas nas análises do genoma. Dentre as características avaliadas, aquelas relacionadas à aspectos morfológicos incluem: a morfologia das colônias (cor, forma, presença de halo), corpos frutíferos, estruturas de micélios e hifas e morfologia celular e do esporo (forma, tipo de parede). Adicionalmente, outras características que podem ser avaliadas são a presença de pili, fimbria e flagelos e de estruturas do envelope como a cápsula. Para algumas estruturas celulares é necessário o uso de corantes o que auxilia na sua identificação em combinação com a observação microscópica (Mifra, 2019).

Características relacionadas a fisiologia também podem auxiliar na identificação do microrganismo. Dentre elas incluem-se: a faixa de temperatura e pH de crescimento (ótima, máxima, mínima), requisitos nutricionais ou suplementos para o crescimento que podem ser específicos para um dado microrganismo, atividades de enzimas, uso de diferentes fontes de

carbono e nitrogênio, avaliação da produção de ácidos orgânicos e de pigmentos, exigência de oxigênio, tolerância ao sal e capacidade de crescer em meios seletivos, diferenciais ou enriquecidos. Outras avaliações fisiológicas importantes são a suscetibilidade/resistência aos antibióticos, agentes antifúngicos ou antivirais e suscetibilidade/resistência aos metais pesados ou poluentes orgânicos. Testes relacionados à sorologia e à produção de toxinas também são indicados, como Aglutinação, Imunodifusão, Detecção de proteínas específicas (western blotting), teste de antígenos microbianos contra anticorpos específicos, endotoxinas, exotoxinas e micotoxinas (Mifra, 2019). É importante ressaltar que para a avaliação de grande parte dessas características se tem disponíveis inúmeros kits comerciais como Vitek 2 Compact (bioMérieux), Biolog (Hayward, CA, USA) BD Phoenix (BD Diagnostics) e Analytical Profile Index (API) 20 E (bioMérieux), que permitem acessar os resultados de forma rápida.

Além dessas características, aquelas consideradas como quimiotaxonômicas também podem ser investigadas visando obter mais informações a respeito do microrganismo. Dentre elas pode-se citar a análise da composição dos lipopolissacarídeos, tipo de peptidoglicano, açúcares do interior das células e da parede celular, ácidos micólicos, diaminoácidos, sistema quinona, teor de poliamina dos aminoácidos da parede celular e os extratos como o perfil de extrolito, muito utilizado para fungos (Mifra, 2019). Além dos compostos de éster metílico de ácido graxo utilizando a técnica de FAME (Heyrman et al., 1999). Uma técnica bastante usada para a identificação desses compostos é a cromatografia/espectrometria. Dentre elas, a técnica de espectrometria de massa baseada em MALDI-TOF tem sido muito usada (Sharma et al., 2015). MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) que significa dessorção/ionização a laser num tempo de voo assistida a uma matriz. Nesta técnica, as células dos microrganismos são misturadas ou revestidas à matriz, que é uma solução orgânica absorvente de energia. Em seguida, é feita a ionização com pulsos de laser curtos, seguido de aceleração das partículas no vácuo por meio de um campo elétrico. A razão massa/carga dos íons é medida determinando o tempo requerido para eles viajarem (voo) ao longo do tubo de aceleração. Baseados neste tempo de voo, um espectro de massa de peptídeos é gerado para cada amostra (Singhal et al., 2015). A identificação de microrganismos irá ocorrer na comparação do perfil desse espectro com um banco de dados (Dingle & Butler-Wu, 2013). Para a identificação ao nível de espécie geralmente são utilizados espectros de proteínas ribossomais (Dingle & Butler-Wu, 2013).

Entretanto, na revisão de Rosselló-Móra & Amann (2015), esses autores discutem que as técnicas atuais de acesso aos dados fenotípicos para taxonomia são questionadas pela comunidade científica devido ao fato de que muitas vezes a classificação de um novo táxon é feita apenas para uma única linhagem da espécie não levando em consideração, portanto, a

possível versatilidade nas características dentro das espécies. Outras desvantagens dos testes fenotípicos relatadas por esses autores é o preço oneroso para se ter acesso às bibliotecas de referência e aos testes comerciais. As morfologias celulares também são questionadas devido às variações de acordo com os meios de cultura utilizados e, ainda, os métodos quimiotaxonômicos são questionados por causa das distintas interpretações possíveis. Assim, esses autores sugerem que as condições ambientais da origem do isolamento podem ajudar na decisão de quais testes são relevantes para a identificação de um novo táxon. Além disso, é muito importante que tais métodos sejam padronizados e reprodutíveis.

No caso da identificação das espécies virais, tendo em vista o conceito de classe politética, já mencionado no Tópico anterior, várias características precisam ser avaliadas para a definição da espécie e as mesmas irão ser variadas a depender do filo ou família viral. Adicionalmente, pode ainda ocorrer casos de membros de uma espécie que não possuem uma ou outra característica que normalmente seria considerada típica daquela espécie (Van Regenmortel, 2011). Além disso, quando o uso das sequências de nucleotídeos para a identificação das espécies de vírus foi iniciado desde 1980 ficou claro a partir da análises dos primeiros sequenciamentos que as espécies apresentavam características genéticas distintas umas das outras. Desde então houve a dificuldade para se definir um limite de divergência de sequência (ponto de corte) que pudesse ser usado para discriminar as espécies virais. Por exemplo, dentro de uma mesma família viral, os flavivirus, a sequência do gene da RNA polimerase (RdRp) dependente de RNA apresenta diferença de similaridade de apenas 1,5% entre as espécies Bagaza vírus e meningoencefalomielite vírus e de mais de 44% entre os vírus San Perlita e Ilheus. Nesses casos, as espécies são avaliadas quanto às diferenças marcantes relacionadas a sua área geográfica, faixa de hospedeiros e patogenicidade. Dessa forma, o sistema fenotípico de identificação de espécies virais ainda tem sido muito usado e é importante ressaltar que este tipo de classificação tem servido para fins de identificação de grupos de vírus que afetam as áreas médicas, veterinárias e agrícolas (Simmonds & Aiewsakun, 2018). Contudo, os vírus que são descobertos por métodos de sequenciamento de amostras ambientais tem sido catalogados, atualmente, em escala exponencial. Mas as identificações usando apenas informações de sequências têm sido questionadas e sugere-se que as atribuições de espécies baseadas em genômica sejam incorporadas à taxonomia, ou seja, que considere também as características politéticas (Mokili et al., 2012; Simmonds & Aiewsakun, 2018).

II.3 Levantamento e discussão de critérios e requisitos para a comprovação da ocorrência natural de microrganismos.

Quase todas as espécies de animais e plantas possuem uma distribuição limitada no planeta, não só porque requerem um habitat específico, mas também devido a fatores históricos, os quais formaram barreiras impedindo a migração destes organismos (Azevedo & Farjalla, 2010). Para esses macrorganismos, sejam eles vertebrados ou invertebrados, existem critérios mais bem estabelecidos para confirmar sua ocorrência natural, o que também é um processo mais simples. Linnaeus e seus contemporâneos por volta da segunda metade do séc. XVIII iniciaram de maneira crítica e organizada a análise da distribuição e da diversidade de espécies de organismos multicelulares pela terra e, desde então, biólogos têm investigado a distribuição de animais e plantas, sendo este um dos principais objetivos da ecologia (Azevedo & Farjalla, 2010). Por conta disso, não são raras as publicações científicas acerca da diversidade ecológica de diferentes habitats e regiões. Adicionalmente, trabalhos de avaliação da biodiversidade faunística e florística são comumente conduzidos tanto a nível regional quanto local, nacional ou internacionalmente. Esses levantamentos visam à criação de inventários e catalogação da biodiversidade desses ambientes e a confirmação da identidade do organismo se baseia em critérios diversos tais como: análises taxonômicas e moleculares, aspectos biológicos, ecológicos e comportamentais, dados de imagens de captura, dentre outros (Branco & Ribeiro, 2011). Assim, a ocorrência natural de espécies de macrorganismos pode ser determinada confrontando-se os dados de listas de inventários de espécies além de consultas bibliográficas.

Apesar de haver muitos estudos acerca da diversidade, ocorrência e processos de dispersão de animais e de plantas, para os microrganismos esses estudos, até alguns anos atrás, ainda eram muitos restritos. Acreditava-se que para esse grupo, devido ao seu pequeno tamanho, alta abundância, além de outros aspectos de sua biologia, como o curto tempo de geração ou a capacidade de sobreviver às mais diversas condições ambientais, não haveria limites para a dispersão e os mesmos teriam uma distribuição cosmopolita (Green & Bohannan, 2006). Além disso, a probabilidade de dispersão ao acaso, através de vetores, como vento, água e animais, entre outros, aumenta quando a abundância é alta, como é o caso das comunidades microbianas. (Green & Bohannan, 2006). Assim, muitos ecologistas microbianos ainda consideravam as premissas de Baas Becking que afirmou em 1934: "Tudo está em toda parte, mas o ambiente seleciona".

Nos últimos anos, porém, os ecólogos microbianos vêm buscando entender melhor esses processos e se as premissas clássicas eram verdadeiras (Azevedo & Farjalla, 2010). Novas evidências têm sido obtidas e indicam que alguns taxons microbianos podem possuir

distribuições geográficas mais restritas, fornecendo evidência de endemismo microbiano (Whitaker et al, 2003; Green & Bohannan, 2006). Assim, as duas principais correntes ainda existentes no estudo da biogeografia de microrganismo são: 1) microrganismos são amplamente distribuídos, apresentando uma alta riqueza local, entretanto uma baixa riqueza global, e 2) microrganismos apresentam padrões biogeográficos semelhantes aos padrões observados para macrorganismos (Azevedo & Farjalla, 2010).

Possivelmente, a principal limitação acerca não só do número de estudos, mas principalmente de informações menos conflituosas sobre a diversidade, ocorrência e distribuição de microrganismos era o fato de a maioria deles não poderem ser identificados apenas morfológicamente e de, até recentemente, esses estudos se basearem em métodos dependentes de cultivo. Esses métodos envolvem o isolamento e posterior estudo dos microrganismos (Schneider et al., 1998; Cravo-Leurau et al., 2011). O problema do uso deles é a impossibilidade de se obter uma informação completa de todos os microrganismos presentes em uma amostra ambiental, por alguns deles não serem capazes de crescer em laboratório (Amann et al., 1995; Sierra-García et al., 2014). Essa incapacidade está associada ao não conhecimento dos requerimentos nutricionais e fisiológicos de todos os microrganismos, ou ainda, ao estado em que se encontram no ambiente, o que impede a sua ativação e crescimento fora do ambiente natural (Amann et al., 1995). Isso que faz com que apenas uma fração da diversidade microbiana seja conhecida, resultando em uma imagem enviesada a respeito da escala espacial da biodiversidade dos microrganismos (Ogunseitan, 2005; Amann et al., 1995; Mocali & Benedetti, 2010; Sierra-García et al., 2014).

O crescente advento das análises moleculares, não só a partir do DNA ribossomal, mas também de vários outros genes, conforme discutido no tópico anterior, levou ao desenvolvimento de um grande número de metodologias baseadas no estudo do DNA para a análise da diversidade e função microbiana (Amann et. al., 1995; Torsvik et. al., 1998). Dentre essas técnicas, destacam-se as metagenômicas, ou seja, a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente, independente do seu isolamento e cultivo (Nacke et al., 2011; Simon & Daniel, 2011). Esse termo é derivado do conceito estatístico de meta-análise (processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (análise ampla do material genético de um organismo) e permite o acesso ao material genético coletivo de todos os microrganismos autóctones presentes no ambiente estudado (Schloss & Handelsman, 2003; Handelsman, 2004; Nacke *et al.*, 2011). A extração do DNA é seguida do sequenciamento de alto desempenho ou de nova geração (NGS), a partir da qual milhares de sequências de DNA podem ser analisadas paralelamente com o intuito de elucidar a composição de uma comunidade microbiana (Amann et al., 1995; Greene & Voordouw, 2003;

Goodwin et al., 2016). Essas técnicas têm tornando possível a obtenção de uma visão mais abrangente da diversidade de microrganismos em diferentes habitats (Fierer & Jackson, 2005). Assim, os obstáculos relacionados à subamostragem desses organismos e conhecimento mais escasso sobre sua diversidade estão sendo superados e evidência disso é o crescente número de estudos de biogeografia microbiana.

Com o surgimento dos novos trabalhos com o uso de técnicas cada vez mais modernas, tudo indica que, pelos próximos anos, esse campo tende a se tornar mais robusto, com informações mais completas e confiáveis em relação à diversidade e comprovação da ocorrência natural de microrganismos e isso ajudará a definir critérios mais bem estabelecidos para essa comprovação. Entretanto, atualmente, considerando a complexidade de teorias, escassez de informações mais completas em estudos antigos e que dados mais recentes e com o uso de técnicas modernas ainda se encontram em construção isso ainda é um desafio. Sendo assim, não se encontram critérios oficiais e bem estabelecidos para a comprovação da ocorrência natural de microrganismos em um determinado ambiente ou mesmo país, seja em bancos de dados ou publicações científicas, materiais que foram utilizadas para a construção do presente levantamento. Quando esse tipo de comprovação é necessária, seja para fins acadêmicos ou regulatórios, critérios diferentes vêm sendo adotados, o que faz com que esse ainda seja um campo muito frágil. No Instituto Brasileiro do meio Ambiente (IBAMA), por exemplo, utiliza-se como critério para a comprovação da ocorrência natural de um microrganismo no Brasil apenas a existência de qualquer informação publicada oficialmente e que informe que o microrganismo em questão já foi isolado em território brasileiro. Outras possibilidades são a comprovação de que o microrganismo, mesmo que ainda não tenha sido publicado, tenha sido isolado no Brasil, identificado e depositado em coleções oficiais ou ainda, apenas a comprovação de sua identificação em território brasileiro, mesmo que por técnicas independentes de cultivo.

II.4 Levantamento, com base em material técnico e científico, dos possíveis impactos ambientais decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente, abrangendo agentes de controle biológico de pragas e doenças de plantas e biorremediadores. O levantamento deve indicar também impactos já verificados, com registros em literatura técnica e científica, com destaque para a introdução de espécies exóticas de microrganismos.

Há uma grande dificuldade para a detecção dos microrganismos invasores, em geral, quando comparados aos macrorganismos, o que faz com que haja uma carência de estudos que toquem neste tema, tornando o mesmo muito controverso. É muito difícil também responder

perguntas a respeito de quais características que tornam os microrganismos invasores e quais as propriedades das comunidades residentes e do ambiente que facilitam as invasões. Ainda assim, sabe-se que as invasões microbianas ocorrem ao longo do planeta (Litchman, 2010).

No caso dos microrganismos exóticos sua introdução pode trazer desequilíbrios ecológicos principalmente porque essa ação pode afetar padrões de simbiose, patogenicidade e processos de decomposição já estabelecidos num determinado ambiente (Van der puten et al., 2007). Já foi demonstrado, por exemplo, que o fungo *Phytophthora cinnamomi* introduzido na Austrália, se revelou patogênico em espécies de eucalipto e levou vários deles a morte. Outro fungo, *Armillaria luteobubalina*, também introduzido na Austrália, provocou a morte de 38% da vegetação de ecossistemas litorâneos (Van der puten et al., 2007). A alga invasora *Didymosphenia geminata* foi capaz de reduzir significativamente a comunidade de macroinvertebrados bentônicos em um rio do Canadá (Litchman, 2010).

O microrganismo exótico não só pode interagir com espécies nativas, mas também pode interferir nas condições abióticas de determinado ecossistema, possibilitando mudanças na composição dos microrganismos nativos. Cianobactérias exóticas, fixadoras de nitrogênio, por exemplo, podem alterar significativamente o aporte de nitrogênio em ecossistemas aquáticos invadidos por elas. Portanto, a diversidade e capacidade metabólica dos microrganismos introduzidos num ambiente pode alterar a disponibilidade de nutrientes como nitrogênio, fósforo e microelementos e influenciar os ciclos biogeoquímicos (Litchman, 2010). Por isso, seja interagindo diretamente com as espécies nativas ou com o ecossistema invadido, o impacto mais visível da introdução de espécies exóticas ou invasoras é a possibilidade de eliminação ou diminuição de populações de espécies nativas.

A possibilidade de alteração de fatores abióticos em um ecossistema provocada por microrganismos exóticos pode promover ainda a invasão de outros organismos. Um exemplo relacionado a esse impacto ocorreu em Portugal, em que a introdução de bactérias fixadoras de nitrogênio nativas da Austrália, propiciou a invasão de uma espécie não nativa de leguminosa no país (Rodriguez-echeverría, 2010). Essa situação interrompeu ainda relações de mutualismo que aconteciam entre espécies nativas de leguminosas e de bactérias fixadoras de nitrogênio. Isso mostra que a introdução de espécies exóticas pode ainda influenciar as relações simbióticas já existentes entre as espécies nativas (Thakur et al., 2019).

Outro estudo demonstrou que plantas da Nova Zelândia associadas a fungos micorrízicos exóticos tiveram sua biomassa reduzida comparada a associações dessas mesmas plantas com fungos micorrízicos nativos. Esse tipo de efeito pode provocar impactos ambientais e econômicos consideráveis principalmente em áreas que estão em processo de recuperação e na agricultura (Thakur et al., 2019).

A invasão simultânea de organismos ou coinvasão, também pode ser muito comum em situações em que microrganismos estabelecem relações simbióticas com plantas ou animais. Geralmente a associação entre fungos micorrízicos e plantas promovem o estabelecimento de ambos os organismos num novo ambiente. Já a introdução de animais associados a microrganismos está mais relacionada à introdução de novas doenças no ambiente, uma vez que esse microrganismo pode ser patogênico e encontrar novos hospedeiros entre as espécies nativas (Lymbery et al., 2014; Thakuret al., 2019). Lymbery e colaboradores (2014) afirmam também que 85% dos parasitas que foram cointroduzidos com seus hospedeiros são mais virulentos e letais para as espécies nativas comparado ao seu hospedeiro original. Além disso, coinvasões que incluem microrganismos aumentam a chance de estabelecimento de outras espécies exóticas e a possibilidade de modificação na composição de espécies nativas (Rivett et al., 2018).

Muitas espécies exóticas foram introduzidas no ambiente com o objetivo controlar pragas e doenças de plantas. Apesar de ser uma alternativa sustentável para esse fim, esse método tem recebido críticas de estudiosos por causa da observação de efeitos danosos em organismos não alvo (Messing & Wright, 2006). De fato, é preciso entender que qualquer tentativa de limitar o crescimento de uma população de determinada espécie ou eliminá-la, poderá afetar outras espécies e ter um impacto no ambiente (Howarth, 1991). Portanto, de modo geral, um dos principais problemas associados à liberação de organismos exóticos no ambiente como agentes de controle biológico é a possível interação entre esse organismo e espécies não alvo do controle (Howarth, 1991; Van Lenteren et al., 2003). Para verificar possíveis interações com espécies não alvo é importante analisar três fatores: a capacidade de estabelecimento do organismo introduzido no ambiente, sua capacidade de dispersão e a especificidade do organismo introduzido com a espécie alvo.

Para avaliar a capacidade de um organismo se estabelecer no ambiente, considera-se o número de gerações que permanecem no ambiente, a sobrevivência nas estações seca ou chuvosa, quente ou fria. Já a capacidade de dispersão do organismo visa compreender se ele é capaz de alcançar outras áreas. Em relação aos microrganismos, é necessário considerar que possuem uma maior rapidez na sua capacidade de dispersão comparados aos macrorganismos. Assim, mesmo que o organismo não se estabeleça na área de interesse, se for, por ventura, capaz de colonizar outras áreas, estabelecendo-se nelas, é preciso avaliar sua capacidade de interagir ou não com espécies não alvo (Van Lenteren et al., 2003 ; Litchman, 2010).

A hibridização também é outro impacto decorrente da introdução de organismos no ambiente, principalmente em relação aos microrganismos (Howarth, 1991). É preciso considerar uma possível transferência horizontal de material genético entre os microrganismos

exóticos e a microbiota indígena que possa acarretar na possibilidade do microrganismo em diminuir ou aumentar, com o tempo, a sua virulência em relação ao hospedeiro. Um exemplo relacionado a essa situação foi publicado por Hufbauer (2002). Esse estudo mostrou que um parasitoide usado para controle biológico de pulgões teve sua virulência reduzida, o que provocou uma perda da capacidade desse parasitoide em controlar a população de pulgões. Em contrapartida, o fungo do gênero *Ophiostoma*, parasita de ulmeiros, árvores nativas da Europa, teve sua virulência aumentada devido ao fluxo gênico interespecífico envolvendo uma espécie exótica na Holanda (Brasier, 2001).

Outro efeito da transferência horizontal de genes entre microrganismos pode ser a ampliação do seu espectro de hospedeiros. Nesse caso, o microrganismo usado para fins de controle biológico se adapta a novos hospedeiros e pode atingir espécies não alvo (Howarth, 1991; Van Lenteren et al., 2003; Messing & Wright, 2006). Essa situação ocorreu na Europa em que a hibridização interespecífica de protozoários do gênero *Phytophthora* resultou na infecção de um novo hospedeiro. Esse hospedeiro é a planta conhecida por amieiro (*Alnus*), que não era infectada por esse microrganismo anteriormente (Van der putten et al., 2007). A introdução de microrganismos exóticos também pode trazer impactos à saúde pública, já que alguns microrganismos podem produzir toxinas. Alguns microrganismos patogênicos de insetos, por exemplo, que podem ser usados em programas de controle biológico, causam alergias em seres humanos (Howarth, 1991). Outro exemplo, refere-se a cianobactérias que invadiram parte da Europa e América do Norte, e são capazes de produzir hepatotoxinas que comprometem a saúde de vários invertebrados, aves e mamíferos (Litchman, 2010).

Por outro lado, estudos e pesquisadores também vêm apontando que, considerando que nos últimos 100 anos vários inimigos naturais exóticos foram importados, criados em massa e liberado como agentes de controle biológico, são relativamente poucos os efeitos ambientais negativos reportados por essas liberações. Segundo Van Lenteren e colaboradores (2003), por exemplo, apesar do uso de organismos exóticos nem sempre ser ausente de risco, os problemas resultantes do uso de técnicas de controle biológico possivelmente estarão mais relacionados ao aumento de realização dessas atividades por pessoas sem treinamento em áreas de identificação, avaliação de risco e liberação ambiental desses agentes, do que pelo uso desses organismos em si.

Dessa forma, o maior problema não seria propriamente a utilização do microrganismo exótico como agente de controle biológico, mas sim uma incorreta seleção do agente, otimização do processo ou avaliação de risco do seu uso, já que várias alternativas podem ser realizadas para, ao menos, limitar a possibilidade dele vir a causar efeitos negativos no ecossistema em geral. Para minimizar tanto o estabelecimento quanto a dispersão dos

organismos introduzidos, uma alternativa tem sido a engenharia genética que pode impossibilitar ou limitar a reprodução desses organismos no ambiente (Howarth, 1991). Além disso, a avaliação da especificidade da interação do organismo a ser introduzido com seu hospedeiro ou presa é outro fator que pode minimizar ou prevenir interações entre o organismo introduzido e organismos que não são alvos (Van Lenteren, 2003).

No caso de organismos cuja ação de controle decorre da fitofagia, não se espera, por exemplo, que ele represente risco grave mesmo que se estabeleça e disperse bem se for um agente de controle biológico monofágico, que se alimenta de um único organismo. Adicionalmente, uma correta e sistemática avaliação de risco pode discriminar entre agentes que possuem baixos índices de riscos, os quais devem ser priorizados, e os que representam índices moderados ou altos. Ainda assim, esses riscos devem ser considerados com ressalvas, sendo necessário também o julgamento crítico de especialistas em controle biológico para conceder ou não permissão para liberação do agente (Van Lenteren, 2003).

Em suma, são muitas as dificuldades relacionadas à compreensão e avaliação de impactos ambientais relacionados à introdução de microrganismos exóticos, seja devido às questões já levantadas e, até mesmo, à dificuldade em se identificar a nível de espécie os microrganismos exóticos, apesar dos avanços científico já discutidos. Isso ocorre devido a baixa quantidade de características morfológicas que sustentam comparações entre espécies, além da frequência com que a transferência horizontal de genes acontece no ambiente.

II.5 Levantamento, seleção e análise, com base em material técnico e científico, de protocolos e metodologias de avaliação de risco ambiental para controle da introdução no ambiente de microrganismos, não necessariamente exóticos, incluindo seus usos como agentes de controle biológico de pragas e doenças de plantas e biorremediadores.

Uma avaliação de risco ambiental requer o levantamento de informações das consequências da introdução de organismos no ambiente. Geralmente essa avaliação de risco está associada a um relatório de manejo de risco, o qual tem por objetivo selecionar e implementar ações que impeçam ou reduzam a chance de ocorrência de determinado risco ambiental (Andersen et. al., 2004).

Para uma avaliação de risco é necessário conhecer o máximo de informações possíveis sobre a espécie que se pretende introduzir no ambiente, a vulnerabilidade do ambiente que receberá essa espécie, o seu potencial de se estabelecer no ambiente e de alcançar novas áreas, bem como suas formas de dispersão, presença de inimigos naturais, predadores ou parasitas,

além dos custos associados aos processos de contenção dessa espécie (Andersen et al., 2004; Stohlgren et al., 2006). É necessário avaliar também em termos quantitativos e qualitativos a disponibilidade de recursos ambientais e a vulnerabilidade do ecossistema, conhecer a abundância e distribuição das espécies nativas e as relações ecológicas que estabelecem uma com as outras, bem como características abióticas que compõem o ecossistema como temperatura, clima, altitude, precipitação, pH, dentre outros (Stohlgren et al., 2006).

Em relação ao ambiente que receberá uma espécie não nativa, para que os estudos de avaliação de risco adquiram real confiabilidade, todos os parâmetros descritos anteriormente também devem ser analisados em épocas diferentes, tais quais como verão e inverno, período seco e chuvoso, e por diversas vezes (Stohlgren et al., 2006). O maior desafio para avaliação de risco ambiental é quantificar, mapear e prever as interações que irão se firmar entre a espécie e o ambiente, as quais determinarão o estabelecimento da espécie invasora. A partir da possibilidade de estabelecimento dessa espécie, os custos socioeconômicos e ambientais também devem ser incorporados na avaliação de risco, uma vez que pode ocorrer fenômenos como a extinção de espécies nativas, impactos em espécies de interesse econômico, riscos para a saúde humana, alteração na ciclagem de nutrientes (Stohlgren et al., 2006).

No caso dos microrganismos exóticos, não só a avaliação de risco quanto a detecção de possíveis impactos são ainda mais desafiadoras porque, com exceção dos organismos patogênicos, é muito difícil detectar invasões e efeitos provocados por esses organismos no ambiente (Cowan et al., 2018; Litchman, 2010; Thakur et al., 2019). Entretanto, conforme apresentado anteriormente, são inúmeros os riscos associados à sua liberação. Por isso é necessário realizar uma correta e sistemática avaliação de risco do uso deles antes dessa liberação, seja para uso como agentes de controle biológico ou remediadores, por exemplo. Como esses organismos são dinâmicos e apresentam uma ampla gama de funções e atividades são muitas também as possibilidades na avaliação de risco ambiental para controle da sua introdução.

Não se encontra na literatura uma única metodologia ou protocolo universal de avaliação de risco da introdução ambiental de microrganismos, sejam eles exóticos ou não. Entretanto, a maioria dos países utiliza alguma forma de regulamentação relativa à importação de organismos exóticos voltados principalmente para uso no controle biológico de pragas. Adicionalmente, se observa ainda um aumento significativo desse rigor como resultado dos acordos alcançados pela ONU na Convenção sobre Diversidade Biológica (Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB), 2002) como uma abordagem para impedir a propagação de espécies exóticas invasoras (Van Lenteren, 2003). Em diferentes Normativas que tratam da importação e liberação ambiental de microrganismos, sejam eles exóticos ou não, as quais

foram levantadas e consultadas para a elaboração do produto I, observa-se a utilização, não só pelo Brasil, mas também por diversos outros países como EUA, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, dentre outros, além da união Europeia, protocolos detalhados e com a especificação de testes, avaliações e relatórios de dados que são necessários nesse processo. Há ainda códigos de condutas internacionais para a importação e liberação de agentes exóticos de controle biológico, como o código da FAO de 1995, cujo objetivo é justamente estabelecer procedimentos para a importação, exportação e liberação segura desses agentes em nível aceitável, internacionalmente, para que tais procedimentos possam ser utilizados quando a legislação nacional de qualquer país for inadequada ou não existir.

De modo geral, dentre os riscos mais preocupantes em relação à introdução intencional de microrganismos, a possibilidade dele se tornar uma praga ou um patógeno humano é uma das que mais prevalece. A capacidade de causar doença, tanto ao homem quanto aos animais ou vegetais depende do potencial de patogenicidade e virulência dos microrganismos, portanto, o uso de metodologias que permitam acessar essa característica é imprescindível. Para tanto, deve ser realizado testes de toxicidade/ecotoxicidade, os quais irão determinar o grau em que uma substância (toxina) ou um organismo pode causar danos a outros organismo vivo. De preferência, os testes devem ser realizados *in vivo* para avaliar os efeitos nos mais diferentes organismos e devem ser investigadas diferentes doses para determinar níveis críticos de concentrações letais. Além disso, quando os testes *in vivo* não forem possíveis, testes de patogenicidade/toxicidade *in vitro* em plantas, animais ou culturas de células humanas podem ser usados (CEPA, 1999).

Para a análise de toxicidade pode-se basear na quantidade máxima do ingrediente ativo ou na quantidade de células microbianas que caracteriza a concentração máxima de perigo (MHC) ou dose máxima de risco (MHD). Além disso, outros cálculos de parâmetros ecotoxicológicos podem ser feitas nas análises de toxicidade, como Taxa média Efetiva (ER50) Dose média Letal (LD50) ou Sem Efeito Observado da Concentração (NOEC) e o valor TER (relação toxicidade /exposição). Além dessa forma de acessar a toxicidade do microrganismo, pode-se também investigar os genes/proteínas que estão presentes no genoma de um dado microrganismo, desde que se tenha o sequenciamento do seu genoma disponível, em busca de fatores de virulência. Dentre os fatores de virulência pode-se citar a presença de genes para a expressão de Hemolisina e Serralisina para bactérias, assim como fatores de virulência que são reguladores de transcrição (BvgA), expressão de fímbrias e de bombas de efluxo de drogas e genes que conferem resistência aos mais diferentes compostos antimicrobianos (Bakour et al., 2016). Para os fungos foi criado o banco de dados de fatores de virulência (Lu et al., 2012) que permite acessar enzimas relacionados à síntese de toxinas e à biodegradação.

Além da toxicidade é de fundamental importância realizar também ensaios de patogenicidade do agente microbiológico de controle, além de avaliar sua infectividade, persistência e especificidade em relação ao organismo-alvo. Geralmente essas avaliações são feitas através de testes em fases distintas. Nos testes necessários para a avaliação de risco do uso de agentes de controle biológico realizado pelo IBAMA, por exemplo, em uma primeira fase por meio de bateria de testes de curta duração organismos testes ou indicadores não-alvo recebem doses altas do agente de controle. Novas fases com testes mais específicos são realizadas e planejadas caso a caso, se efeitos adversos forem observadas nas anteriores com o objetivo de se obter informações mais específicas, tais como efeitos dose-resposta ou efeitos crônicos (MAPA/ANVISA/IBAMA, 2006). É muito comum também e presente no regimento de vários países a imposição do cultivo em quarentena desses organismos antes do lançamento no ambiente, para que os testes sejam feitos de forma controlada e em situações que simulem o melhor possível o ambiente natural. Outro ponto em comum em muitas Resoluções é a necessidade de avaliação ambiental do microrganismo, a fim de se verificar os mecanismos pelos quais um microrganismo é introduzido em um ambiente receptor, além de sua expressão e destino ambiental (CEPA, 1999).

II.6 Identificação de especialistas, no Brasil e no exterior, capazes de contribuir para a avaliação de risco ambiental da introdução de microrganismos exóticos e em assuntos relacionados a esse tema.

- **Itamar Soares de Melo**

Pesquisador Embrapa Meio Ambiente

itamar.melo@embrapa.br

Atualmente é pesquisador de Microbiologia Ambiental da EMBRAPA e é orientador de cursos de pós-graduação: Microbiologia Aplicada e Biotecnologia da Universidade de São Paulo. Ele fez seu pós-doutorado no King's College e no Birkbeck College, London University. A pesquisa do Dr. Melo está focada no desenvolvimento de um entendimento básico de como avaliar e controlar a atividade microbiana em ambientes perturbados e extremos. Ele tem influenciado áreas de pesquisa na área de ciências ambientais, com esforços em biodiversidade e bioprospecção nos manguezais brasileiros, no Bioma Caatinga e na Antártica. Algumas linhas de pesquisa incluem estudos sobre diversidade bacteriana de mangue e uso de fungos no controle biológico de doenças de plantas, ecologia de endófitos e biorremediação de solos contaminados.

- **Fernando Dini Andreote**

Professor do Departamento de Ciência do Solo (LSO) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP/ESALQ).

fdandreo@usp.br

Professor Associado em Microbiologia do Solo na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Engenheiro agrônomo e Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas pela mesma instituição. Livre Docente em Biologia do Solo pela ESALQ/USP. Coordenador da Área de Microbiologia do Solo junto a Sociedade Brasileira de Microbiologia. Representa a International Society for Microbial Ecology (ISME) no Brasil, e é Membro Afiliado a Academia Brasileira de Ciências. Atua na área de Microbiologia do Solo e Ambiental, com enfoque em análises independentes de cultivo de comunidades microbianas. Estuda comunidades microbianas em áreas naturais, como os biomas Mata Atlântica, Caatinga e Manguezais, e em áreas de produção agrícola. Tem como objetivo principal gerar conhecimento para o desenvolvimento de uma agricultura mais produtiva e sustentável, tendo a biologia do solo como base de inovação.

- **Rodrigo Mendes**

Pesquisador Embrapa Meio Ambiente

rodrigo.mendes@embrapa.br

Rodrigo Mendes é Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Meio Ambiente, onde atua como pesquisador no Laboratório de Microbiologia Ambiental. Trabalhou como pesquisador associado (Postdoctoral Fellow - NWO grant) no grupo de Ecologia Bacteriana e Genômica do Laboratório de Fitopatologia da Universidade de Wageningen. Foi pesquisador visitante na Universidade de Lausanne, Suíça, no Lawrence Berkeley National Lab, Estados Unidos, no Rothamsted Research, Reino Unido, e professor convidado no Instituto Isaac Newton da Universidade de Cambridge, Reino Unido. Em 2011 publicou uma importante descoberta na revista Science revelando como comunidades bacterianas defendem naturalmente as plantas contra infecções causadas por patógenos de solo. Em colaboração com diversos grupos de pesquisa internacionais seus projetos focam no estudo do microbioma das plantas (rizosfera).

- **Vera Lúcia dos Santos**

Professora do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

verabio@gmail.com

Vera Lúcia possui graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (1990), mestrado em Microbiologia Agrícola (1992) e doutorado em Genética e Melhoramento pela Universidade Federal de Viçosa (1997) e pós-doutorado nas áreas de Microbiologia ambiental e Biotecnologia ambiental pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Tem experiência na área de Biotecnologia e Microbiologia, com ênfase em Microbiologia Industrial e ambiental e genética de Microrganismos. Atualmente é professora associada 3 (DE) da UFMG e Chefe do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. É bolsista de produtividade em pesquisa (2) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e orientador pleno do Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG (nível 7), Mestrado Profissional e do Curso de Especialização em Microbiologia Aplicada, o qual coordena desde 2015.

- **Zilda Maria de Araujo Ribeiro**

Analista em Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

zilda.ribeiro@embrapa.com.br

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília (1976) e mestrado em Fitopatologia pela Universidade de Brasília (1993), com dissertação sobre controle biológico da murcha do tomateiro. Trabalha como bióloga para a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária desde 1977. Até 1989, desenvolveu atividades de organização de informação científica na Embrapa Sede. A partir de 1990, passou a atuar na área de pesquisa, desenvolvendo suas atividades na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde atualmente é Analista em Pesquisa no Laboratório de Virologia de Insetos. Tem experiência na área de Fitopatologia e Microbiologia, trabalhou com fungos fitopatogênicos para controle biológico de plantas invasoras. Desde 1999, participa de projetos de pesquisa com ênfase em Virologia de insetos, atuando principalmente nos seguintes temas: controle biológico, vírus entomopatogênicos, baculovírus, multiplicação viral em cultura de células de insetos e insetos pragas agrícolas. Participa da organização do evento "Encontro do Talento Estudantil" da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desde 1999, que vem coordenando a partir de sua décima primeira edição em 2006

- **Sueli Correa Marques de Mello**

Pesquisadora em Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

sueli.mello@embrapa.com.br

Possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de Brasília, área de concentração Engenharia Rural, mestrado em Ciências Biológicas com concentração em Fitopatologia e doutorado em Fitopatologia, também pela Universidade de Brasília. Atualmente é pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e colabora no Curso de Pós-Graduação em Fitopatologia da UnB, como professora da Disciplina Controle Biológico de Fitopatógenos, orientadora de Mestrado e Doutorado. Tem experiência na área de produção

vegetal, pesquisa na avaliação e conservação de germoplasma vegetal em condições de campo, assistência técnica a agricultores, diagnóstico e controle de pragas e doenças, patologia de sementes. Na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia desenvolve pesquisa em conservação de recursos genéticos microbianos e controle biológico. Responde pelo Banco de Recursos Genéticos Microbianos do CENARGEN, junto ao Conselho de Patrimônio Genético (CGEN). É membro do Grupo de Microrganismos da Rede de Recursos Genéticos dos Países do Cone Sul (Regensur-Procisur).

- **Rose Gomes Monnerat Solon de Pontes**

Pesquisadora em Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

rose.monnerat@embrapa.com.br

É graduada Ciências Biológicas pela Universidade de Brasília (1984), realizou o doutorado em Agronomia na Ecole Nationale Agronomique de Montpellier (1995) e pos-doutorado na Universidade de Cardiff (2011). É pesquisadora A da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia uma das unidades da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, onde coordena o Grupo de pesquisas em controle biológico e a Plataforma de Criação de insetos. É presidente do Portfólio de Controle Biológico da Embrapa, professora associada da pós-graduação da Agronomia na Universidade de Brasília e Membro Suplente do Conselho Superior da Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Bacterologia, atuando principalmente nos seguintes temas: controle biológico, produtos biológicos a base de *Bacillus thuringiensis* e de *Bacillus sphaericus*. É responsável pelos projetos de desenvolvimento de bioinseticidas à base de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que originaram produtos para controle de *Culex* spp., *Anopheles* spp., *Aedes* spp., *Simulium* spp, *Anticarsia gemmatalis*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera* spp.

- **Rogério Biaggioni Lopes**

Pesquisador em Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

rogerio.lopes@embrapa.com.br

Possui graduação em Engenharia Agrônoma pela Universidade de São Paulo, ESALQ-USP (1995), mestrado (1999) e doutorado (2005) em Entomologia pela Universidade de São Paulo, ESALQ-USP e atuou como cientista visitante por um ano (2015-2016) no Bio-Protection Research Centre, Nova Zelândia. Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) desde 2008. Experiência na área de Entomologia, com ênfase em Patologia e Controle Microbiano de Pragas, atuando principalmente nos seguintes temas: identificação e caracterização de fungos de invertebrados, patologia de insetos e ácaros, produção e formulação de fungos, coleções de microrganismos, aplicação de microrganismos para o controle de pragas em sistemas agrícolas.

- **Maria Elita Batista de Castro**

Pesquisadora Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

elita.castro@embrapa.com.br

Possui graduação em Ciências Biológicas (modalidade Biologia Molecular) pela Universidade de Brasília (1975), mestrado em Biologia Molecular pela Universidade de Brasília (1988) e doutorado em Virologia Molecular pela Universidade de Brasília / Texas Tech University (TX-USA) (1995). Trabalha na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desde 1978, e exerce o cargo de Pesquisador na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) desde 1988. Atua como Curadora da Coleção de Vírus de Invertebrados do CENARGEN desde 1996. Também é Pesquisadora Colaboradora Plena pelo Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília (UnB) e professora credenciada pelo programa de pós-graduação da Biologia Molecular da mesma Universidade (UnB). Tem experiência na área de Biologia Molecular, com ênfase em Virologia de insetos, atuando principalmente nos seguintes temas: biologia molecular de baculovirus, cultura de células de insetos, e controle biológico de pragas agrícolas e florestais.

- **Carlos Augusto Rosa**

Professor Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

carlrosa@icb.ufmg.br

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (1984), mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia) pela Universidade Federal de Minas Gerais (1989), doutorado em Ciências (Microbiologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (1993), e pós-doutorado no Department of Plant Sciences da University of Western Ontario, Canadá. Professor Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Atualmente exerce o cargo de Diretor do ICB da UFMG (2018-2022). Foi vice-diretor do ICB da UFMG (mandato 2014-2018). É membro do comitê assessor (CA) do CNPq na área de Microbiologia e Parasitologia (2017-2020). Já foi coordenador do Centro de Extensão do ICB, Colegiado do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da UFMG, Núcleo de Apoio a Pesquisa (NAPq) do ICB. Atua em disciplinas de graduação e de pós-graduação. Tem experiência na área de pesquisa em Microbiologia, com ênfase em Micologia. A principal linha de pesquisa desenvolvida é sobre taxonomia de leveduras, participando da descrição de mais de 80 espécies novas para a ciência. Curador do acervo de leveduras e bactérias da Coleção de Microorganismos e Células da UFMG (credenciada como fiel depositária de amostra do componente do patrimônio genético pelo CGEN). Também atua nos seguintes temas: Biodiversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros, diversidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, e fermentação para a produção de cachaça, cervejas especiais e queijos artesanais. Além disso, desenvolve pesquisas relacionadas com microbiologia de ecossistemas aquáticos, produção de

substâncias antimicrobianas por leveduras e fungos filamentosos, caracterização fisiológica e molecular de leveduras de interesse clínico. Atualmente, como uma das principais linhas de pesquisa, atua na bioprospecção de leveduras da biodiversidade brasileira capazes de fermentar D-xilose para a produção de bioetanol, tendo descrito diversas novas espécies de leveduras com esta característica biotecnológica.

- **Marcos Rogério Tótola**

Professor Titular da Universidade Federal de Viçosa (UFV)

totolaufv@gmail.com

Possui graduação em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (1984), mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa (1993) e doutorado em Fisiologia Vegetal pela Universidade Federal de Viçosa (1998). Atualmente é professor Titular da Universidade Federal de Viçosa. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase em Ecologia Microbiana, Microbiologia Ambiental e do Petróleo e Microbiologia dos Solos, atuando principalmente nos seguintes temas: biorremediação, biocimentação, avaliação de comunidades microbianas por meio de métodos moleculares, avaliação e interpretação de indicadores microbiológicos de qualidade de solos e águas e avaliação da sustentabilidade ambiental da produção agrícola e florestal.

- **Alexandre Soares Rosado**

Professor Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Professor Visitante na UC Davis (Universidade da Califórnia - Davis)

asrosado@micro.ufrj.br

Professor Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Professor Visitante na UC Davis (Universidade da Califórnia - Davis). Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas, Mestre em Ciências (Microbiologia), Doutor em Ciências (Microbiologia) pela UFRJ e Wageningen University and Research (WUR), Wageningen, Holanda. Diretor do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (2010-2014), Vice-Presidente da Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM = 2009 -2013), Pesquisador Associado do AquaRio, foi membro da CTNBIO (sub-área Meio Ambiente e sub-área Vegetal) e de grupos técnicos do Ministério do Meio Ambiente, Embrapa, SBM e MCTI. Editor associado dos periódicos científicos: Journal of Microbiological Methods, BMC Microbiology e Frontiers in Microbiology (tendo sido ainda Editor Associado dos periódicos: Brazilian Journal of Microbiology (BJM) e International Journal of Biodiversity). Foi um dos fundadores da ECOCYCLE (Startup de Biotecnologia e Serviços Ambientais/BioRio) e do Pólo de Biotecnologia BIOINOVAR da UFRJ. É membro permanente dos programas de Pós Graduação em ciências (Microbiologia- conceito 7) e de Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (conceito 6) e membro colaborador de programas de pós

graduação da Coppe, UERJ e IB-UFRJ. Tem formado recursos humanos altamente qualificados, que estão empregados e atuando como docentes/pesquisadores em instituições científicas do Brasil e no exterior. Recebeu prêmios nacionais e Internacionais importantes, ex: Out of the Bule Box 2018 (Great Barrier Reef Foundation-Austrália); Menção Honrosa no Prêmio Capes de Teses 2006 (Ciências Biológicas III) ; Prêmio Capes de Teses 2013 (Engenharias II), Prêmio Gilberto Velho 2013 (melhor tese da UFRJ); prêmio Oscar Niemeyer 2013 e prêmio Vale-Capes 2013 entre outros. Possui colaborações internacionais e participa como avaliador de projetos dos seguintes países: Canadá, EUA, Inglaterra, Holanda, Alemanha, Polônia, Uruguai, Quênia, Índia, África do Sul, Colômbia, Austrália e Nova Zelândia. Tem experiência na área de Ecologia Microbiana, atuando principalmente nos seguintes temas: Microbiologia de Solos e de ambientes extremos, Microbiomas ambientais, Biotecnologia e biorremediação de petróleo e derivados.

- **Andrew Macrae**

Professor Associado, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) e Coordenador de Relações Internacionais do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

amacrae@micro.ufrj.br

Andrew é graduado em Natural Environmental Science Earth Science pela University of Sheffield (1993) e PhD em Soil Plant Microbe Interactions pela University of Newcastle Upon Tyne (1998). Atualmente Professor Associado, Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (PBV) e Coordenador de Relações Internacionais do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tem experiência na área de Microbiologia Ambiental, com ênfase em interações microbianas em solos, com plantas e na água. Sua linha de pesquisa foca no desenvolvimento sustentável através da expansão do conhecimento em biotecnologia microbiana, bioprospecção, biodiversidade microbiana, bioinformática e biorremediação. Andrew é Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos (CAPES 6) desde 2014 e é Coordenador de Relações Internacionais do CCS/UFRJ desde 2015.

- **Barbara Eckstein**

Pesquisadora em Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

barbara.eckstein@embrapa.com.br

Engenheira Agrônoma formada pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná- UNIOESTE (2006). Possui cursos de Mestrado e Doutorado em Fitopatologia, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz -ESALQ/ USP (2007-2010), na área específica de bacteriologia, pesquisando aspectos relacionados aos fitoplasmas, bactérias não cultiváveis transmitidas por insetos vetores. Os trabalhos envolveram a detecção e identificação de fitoplasmas em plantas

cultivadas e não cultivadas e a elucidação de uma nova doença associada à fitoplasmas na cultura do brócolis, incluindo a caracterização da bactéria na cultura, identificação de hospedeiros alternativos e potenciais insetos vetores e distribuição espacial e temporal da doença. Realizou pós doutorado na Universidade Federal do Paraná, Departamento de Genética (2011-2012), onde participou de um trabalho voltado para a elucidação do papel de efetores bacterianos (T3SS) na interação planta-bactéria nos anos de 2011 e 2012 e posteriormente na Embrapa Florestas (2012-2013), na área de controle biológico de fitopatógenos em sementes florestais através de bactérias e fungos antagonistas. Atualmente é Pesquisadora A da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde desenvolve trabalhos de identificação de bactérias e estudos voltados para o controle biológico de fitopatógenos através de bactérias esporulantes.

- **Wim van der Putten**

Chefe do departamento Multitrophic Interactions, Netherlands Institute of Ecology (NIOO-KNAW)

w.vanderPutten@nioo.knaw.nl

O Dr. van der Putten se formou na Universidade de Wageningen em 1984, com diploma em ecologia e depois se mudou para o Instituto de Pesquisa Ecológica em Oostvoorne na Holanda. Em 1989, ele obteve seu PhD em Wageningen University e atualmente é chefe do Departamento de Ecologia Terrestre do Instituto de Ecologia da Holanda (NIOO) e professor no departamento de Biodiversidade Funcional da Wageningen University. O principal interesse de estudo é em interações multitróficas, relações planta-solo, sucessão, biodiversidade e mudanças induzidas pelas alterações climáticas. Wim foi co-autor de uma visão geral sobre biodiversidade do solo para o DGXI da CE e é co-editor do Atlas Europeu e Global da Biodiversidade do Solo. Ele foi co-fundador do Centro Wageningen de Ecologia do Solo.

- **David Pimentel**

Professor emérito no departamento Entomology, Systematics and Ecology Cornell University

dp18@cornell.edu

Dr. David Pimentel é MS pela University of Massachusetts e PhD pela Cornell University. Membro dos departamentos/programas de Ecologia, Biologia Evolucionária e Entomologia tem experiência na área de ecologia básica da população, genética, aspectos ecológicos e econômicos do controle de pragas, controle biológico, uso e conservação de energia, engenharia genética, agricultura sustentável, conservação do solo e da água, gerenciamento de recursos naturais e política ambiental.

- **Joop C. van Lenteren**

Professor emérito de entomologia da Universidade de Wageningen (Holanda)

koop.vanLenteren@wur.nl

Possui graduação em Biologia pela Universidade de Leiden (1967), Mestrado em Entomologia pela Universidade de Leiden (1970) e Doutorado em Ecologia pela Universidade de Leiden (1976), Holanda. Joop C. van Lenteren trabalha desde 1970 em ecologia comportamental e dinâmica populacional de parasitóides, aspectos teóricos e práticos de controle biológico, MIP e produção sustentável de culturas, além de anatomia e fisiologia sensorial de ovipositores parasitóides. Ele é professor emérito de entomologia da Universidade de Wageningen, na Holanda. Ele atua em várias funções na Organização Internacional para Controle Biológico desde 1974. Atualmente é secretário geral da IOBC Global, vice-presidente do "Plant Health Panel of Experts" da " European Food Safety Authority.

- **Fernanda Dall Ara Azevedo**

Professora da Universidade de Guarulhos (UNG)

fdallara.azevedo@gmail.com

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (UEM-2005), mestrado (2009) e doutorado (2013) em Ecologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Atuou como docente e vice-coordenadora no programa de mestrado em Análise Geoambiental na Universidade UNG (2014 a 2016). Atualmente é professora na mesma instituição lecionando as disciplinas de Ecologia, Bioestatística, Genética quantitativa e Evolução, Sustentabilidade e Bioquímica. Possui área de interesse em Ecologia e os fatores geradores de biodiversidade, ecologia aquática, qualidade de água, limnologia, bioindicadores e meio ambiente.

Referências

Abatenh E, Gizaw B, Tsegaye Z, Wassie, M. Application of microorganisms in bioremediation-review. *Journal of Environmental Microbiology*. 1, n.1, p.02-09, 2017.

Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v. 59, p. 143-169, 1995.

Andersen, M. C., Adams, H. , Hope, B. and Powell, M. Risk Assessment for Invasive Species. *Risk Analysis*, 24: 787-793, 2004.

Arahal, D. R. (2014). Whole-genome analyses: average nucleotide identity. In *Methods in microbiology* (Vol. 41, pp. 103-122). Academic Press.

Azevedo FD, Farjalla VF. Biogeografia de microrganismos: padrões, dificuldades e perspectivas. *Oecologia Australis*.;14(4):839-52.

Baas Becking, L.G.M. (1934) *Geobiologie of inleiding tot demilieukunde*.The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stoc-kum & Zoon (in Dutch).

Bakour, S., Sankar, S. A., Rathored, J., Biagini, P., Raoult, D., & Fournier, P. E. (2016). Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics. *Future microbiology*, 11(3), 455-466.

Blackburn TM, Pysěk P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarosšík V, Wilson JR, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends Ecol Evol* 26(7):333–339.

Branco AM, Ribeiro H. Descentralização da gestão e manejo da fauna silvestre: o caso da divisão técnica de medicina veterinária e manejo da fauna silvestre do município de São Paulo. *InterfacEHS*. 2011 Apr 1;6(1).

Brasier, C. M. Rapid Evolution of Introduced Plant Pathogens via Interspecific Hybridization: Hybridization is leading to rapid evolution of Dutch elm disease and other fungal plant pathogens. *BioScience*, 51, n. 2, p. 123-133, 2001.

Bueno, I.; Williams-Nguyen, J.; Hwang, H.; Sargeant, J. M.*et al.* Systematic Review: Impact of point sources on antibiotic-resistant bacteria in the natural environment. *Zoonoses and Public Health*, 65, n. 1, p. e162-e184, 2018/02/01 2018.

Callaway, 2008, Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89,1043-1055.

CEPA- The Canadian Environmental Protection Act (1999). Disponível em <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/chemical-substances/canada-approach-chemicals/canadian-environmental-protection-act-1999.html>

Cohan, F. M. (2002). What are bacterial species?.*Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 457-487.

Cowan, D.; Hughes, K.; Pointing, S.; Malatoni, G. et al. Non-native microbial introductions: what risk to Antarctic ecosystems? . Antarctic Environments Portal 2018.

Cravo-Laureau, C., Hernandez-Raquet, G., Vitte, I., Jézéquel, R., Bellet, V., Godon, J. J., & Duran, R. Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. *Research in microbiology*, 162(9), 888-895, 2011.

De Silva SS. Exotic aquatic organisms in Asia: proceedings of a workshop on introduction of exotic aquatic organisms in Asia. Asian Fisheries Society, Manila, PH; 1989.

Dingle, T.C., & Butler-Wu, S.M. (2013) *Clin. Lab. Med.* 33,589–609. doi:10.1016/j.cll.2013.03.001

Domingo, E., Holland, J.J., Biebricher, C., Eigen, M., 1995. Quasispecies: the concept and the word. In: Gibbs, A.J., Calisher, C.H., Garcia-Arenal, F. (Eds.), *Molecular Basis of Virus Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, p. 171.

FAO (1995) Code of conduct for the import and release of exotic biological control agents, Rome, 1995. Disponível em <http://www.fao.org/3/x5585E/x5585e0i.htm#code%20of%20conduct%20for%20the%20import%20and%20release%20of%20exotic%20biological%20control%20agents>

FAO. (2006). *The State of World Fisheries and Aquaculture. Part 1: World Review of Fisheries and Aquaculture*. Rome: FAO.

Fierer, N.; Jackson, J. A.; Vilgalys, R.; Jackson, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and environmental microbiology*, v. 71(7), p. 4117-4120, 2005.

Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.

Gevers, D., Dawyindt, P., Vandamme, P., Willems, A., Vancanneyt, M., Swings, J., De Vos, P. (2006) Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos. Trans. R. Soc. B* 361, 1911–1916.

Gibas, C., Fe, C., Sigler, L. and Currah, R. S., Mating patterns and ITS sequences distinguish the sclerotial species *Arachnomyces glareosus* sp. nov. and *Onychocola sclerotica*. *Stud. Mycol.*, 2004, 50, 525–531.

Goodwin, S., Mcpherson, J. D., & McCombie, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333, 2016.

Green, J., & Bohannan, B. J. (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in ecology & evolution*, 21(9), 501-507.

Greene, E.A. & Voordouw, G. Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *Journal of Microbiological Methods* 53: 211– 219, 2003.

Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G. (2005). Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.*, 3, 6.

Hanage, W.P., Fraser, C. & Spratt, B.G. (2005). Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.*, 3, 6.

- Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, p. 669–685, 2004.
- Hettinger, N. (2012) Conceptualizing and Evaluating Non-Native Species. *Nature Education Knowledge*3(10):7.
- Heyrman, J., Mergaert, J., Denys, R., & Swings, J. (1999). The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 181(1), 55-62.
- Howarth, F. G. Environmental Impacts of Classical Biologic Control. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 485-509 p. 1991.
- Hufbauer, R. A. Evidence for Non-adaptative evolution and parasitoid virulence following a biological control introductions. *Ecological Applications*, 12, n. 1, p. 66-78, 2002/02/01 2002.
- Hughes, K. A.; Cowan, D. A.; Wilmotte, A. Protection of Antarctic microbial communities - 'out of sight, out of mind'. *Front Microbiol*, 6, p. 151, 2015.
- Inderjit, 2010, Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 25, 512-519.
- Jules, E. S., Kauffman, M. J., Ritts, W. D., & Carroll, A. L. (2002). Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a nonnative root rot on Port Orford cedar. *Ecology*, 83(11), 3167-3181.
- Konstantinidis, K. T., & Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(7), 2567-2572.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J., Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'-end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, 35, 1216–1223.
- Litchman, E. (2010). Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 13(12), 1560-1572.
- Lu, T., Yao, B., & Zhang, C. (2012). DFVF: database of fungal virulence factors. *Database*, 2012.
- Ludwig, W. & Schleifer, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 155–173 (1994).
- Lymbery, A. J.; Morine, M.; Kanani, H. G.; Beatty S. J. *et al.* Co-invaders: The effects of alien parasites on native hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3, n. 2, p. 171-177, 2014/08/01/ 2014.
- Maiden, M. C. J. et al., (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3140–3145.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa Conjunta Nº 3, de 10 de março de 2006. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/inc-03-2006-biologicos>

Mayr, E. (1970) *Populations, Species, and Evolution*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.

Mende, D. R., Sunagawa, S., Zeller, G. and Bork, P. (2013) Accurate and universal delineation of prokaryotic species. *Nat. Meth.* 10, 881–884.

Mifra - Microbial Identification Framework for Risk Assessment. Disponível em <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/managing-pollution/evaluating-new-substances/biotechnology-living-organisms/microbial-identification-framework-risk-assessment.html#toc4>. Acesso em 18 de setembro de 2019.

Messing, R. H.; Wright, M. G. Biological control of invasive species: solution or pollution? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4, n. 3, p. 132-140, 2006/04/01 2006.

Mocali, S., & Benedetti, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161(6), 497-505, 2010.

Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol.* 2012 Feb; 2(1):63-77.

Montgomery, M. (2011) Understanding federal regulations as guidelines for classical biological control programs. In *Implementation and Status of Biological Control of the Hemlock Woolly Adelgid*; Onken, B., Reardon, R., Eds.; FHTET-2011-04; United States Department of Agriculture, Forest Service: Morgantown, WV, USA, 25–40.

Nacke, H.; Wil, C.; Herzog, S.; Nowka, B.; Engelhaupt, M.; Daniel, R. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 78, p. 188-201, 2011.

Niwa, S., Iwano, H., Asada, S. I., Matsumura, M., & Goka, K. (2004). A microsporidian pathogen isolated from a colony of the European bumblebee, *Bombus terrestris*, and infectivity on Japanese bumblebee. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology (Japan)*.

Ogunseitan, O., 2005. *Microbial Diversity*. Blackwell Science Ltd., Oxford, UK, 292pp

Papke, R. T., Ramsing, N. B., Bateson, M. M., & Ward, D. M. (2003). Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 5(8), 650-659.

Pimentel, D.; Lach, L.; Zuniga, R.; Morrison, D. Environmental and Economic Costs of Nonindigenous Species in the United States. *BioScience*. 1: 53-65 p. 2000.

Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), 879-886.

Ramsdale, M., Genomic conflict in fungal mycelia: a subcellular population biology. In *Structure and Dynamics of Fungal Populations* (ed. Worrall, J. J.), Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 1999, pp. 139–174.

Rivett, D. W.; Jones, M. L.; Ramoneda, J.; Mombrikotb, S. B. *et al.* Elevated success of multispecies bacterial invasions impacts community composition during ecological succession. *Ecol Lett*, 21, n. 4, p. 516-524, 04 2018.

Rodriguez-Echeverria, S. (2010). Rhizobial hitchhikers from Down Under: invasional meltdown in a plant-bacteria mutualism? *J. Biogeogr.*, 37, 1611– 1622.

Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.

Rosselló-Móra, R., & Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38(4), 209-216.

Sagoff M. Invasive species denialism: a reply to Ricciardi and Ryan. *Biological invasions*. 2018 Oct 1;20(10):2723-9.

Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *science*. 2000 Mar 10;287(5459):1770-4.

Sandle T. *Microbial identification*. Editor(s): Tim Sandle. *Pharmaceutical Microbiology*. Woodhead Publishing, 2016, Pages 103-113. ISBN 9780081000229.

Schloss, P.D.; Handelsman, J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*, v. 14(3), p. 303-310, 2003.

Sharma, R., Kulkarni, G. and Shouche, Y. S., *Corynascus verrucosus*, second record for science and new for India. *Nova Hedwigia*, 2013, 97(3–4), 485–494.

Sharma, R., Polkade, A. V., & Shouche, Y. S. (2015). 'Species concept' in microbial taxonomy and systematics. *Current Science*, 1804-1814.

Shin, J.-H. et al., Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2003, 48(6), 857–865.

Sierra-García, I.N.; Alvarez, J.C.; de Vasconcellos, S.P.; de Souza, A.P.; dos Santos Neto, E.V.; de Oliveira, V.M. New Hydrocarbon Degradation Pathways in the Microbial Metagenome from Brazilian Petroleum Reservoirs. *PloS one*, v. 9(2), e90087, 2014.

Simmonds P (2015) Methods for virus classification and the challenge of incorporating metagenomic sequence data. *J Gen Virol* 96:1193–1206.

Simmonds P, et al. (2017) Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat Rev Microbiol* 15:161–168.

Simmonds, P., & Aiewsakun, P. (2018). Virus classification—where do you draw the line?. *Archives of virology*, 163(8), 2037-2046.

- Simon, C.; Daniel, R. Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and environmental microbiology*, v. 77(4), p. 1153-1161, 2011.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, 6, 791.
- Soria-Carrasco, V., Valens-Vadell, M., Peña, A., Antón, P., Amann, R., Castresana, J., Rosselló-Mora, R. (2007) Phylogenetic position of *Salinibacter ruber* based on concatenated protein alignments. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 171–179.
- Spratt, B. G., Multi locus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999, 2, 312–316.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kämpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rosselló-Móra, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A., Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043–1047.
- Stackebrandt, E., Ebers, J. (2006) Taxonomic parameter revisited: tarnished goldstandards. *Microbiol. Today* 33, 152–155.
- Stohlgren, T. J. and Schnase, J. L. Risk Analysis for Biological Hazards: What We Need to Know about Invasive Species. *Risk Analysis*, 26: 163-173, 2006.
- Thakur, M. P.; Van Der Putten, W. H.; Cobben, M. M. P.; Van Kleunen, M. *et al.* Microbial invasions in terrestrial ecosystems. *Nat Rev Microbiol*, Jul 2019.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., & Øverås, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of biotechnology*, 64(1), 53-62, 1998.
- Van der Putten, W. H., Klironomos, J. N., & Wardle, D. A. (2007). Microbial ecology of biological invasions. *The ISME Journal*, 1(1), 28.
- Van Lenteren, J.; Babendreier, D.; Bigler, F.; Burgio, G. *et al.* Environmental risk assessment of exotic natural enemies used in inundative biological control. *BioControl*. 48: 3-38 p. 2003.
- Van Regenmortel, M.H.V. *Biodivers Conserv* (1992) 1: 263. <https://doi.org/10.1007/BF00693764>
- Van Regenmortel, M. H. (2011). Virus species. In *Genetics and Evolution of Infectious Disease* (pp. 3-19). Elsevier.
- Van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 233-239.
- Vitule JR, Prodocimo V. Introdução de espécies não nativas e invasões biológicas. *Estudos de Biologia*. 2012 Nov 27;34(83).
- Whitaker, R. J., Grogan, D. W., & Taylor, J. W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, 301(5635), 976-978.

Wiedner, C., Rucker, J., Brüggemann, R. & Nixdorf, B. (2007). Climate change affects timing and size of populations of invasive cyanobacterium in temperate regions. *Oecologia*, 152, 473–484.

Williamson M. (1996). *Biological Invasions*. Chapman and Hall: London.

Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.

Yarza, P., Yilmaz, P., Prüße, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K-H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R., Rosselló-Móra, R. (2014) Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea by means of 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev.* 12, 635–645.

