

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
BIORREMEIADORES**

PRODUTO III – DOCUMENTO CONTENDO DISCUSSÃO TÉCNICA, COM BASE NAS INFORMAÇÕES ANTERIORMENTE LEVANTADAS, ACERCA DOS BENEFÍCIOS E DOS RISCOS DA INTRODUÇÃO DE MICRORGANISMOS EXÓTICOS NO BRASIL, COM A FINALIDADE DE USO NO CONTROLE BIOLÓGICO DE PRAGAS E DOENÇAS DE PLANTAS CULTIVADAS OU EM BIORREMEDIAÇÃO.

Consultora: Aline Daniela Lopes Júlio

Outubro/2019

ÍNDICE

III.1 Discussão sobre riscos e os benefícios decorrentes da introdução de microrganismos exóticos para atuarem na recuperação de áreas contaminadas ou como agentes de controle biológico.	1
III.1.1 Discussão sobre riscos e os benefícios decorrentes da introdução de microrganismos exóticos para atuarem como agentes de controle biológico.	1
III.1.2 Discussão sobre riscos e os benefícios decorrentes da introdução de microrganismos exóticos para atuarem na recuperação de áreas contaminadas.	9
III.2 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para contenção e liberação controlada no ambiente de microrganismos destinados ao uso como agentes de controle biológico ou ao uso como agentes biorremediadores.	16
III.2.1 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para contenção e liberação controlada no ambiente de microrganismos destinados ao uso como agentes de controle biológico.	17
III.2.2 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para contenção e liberação controlada no ambiente de microrganismos destinados ao uso como biorremediadores.	24
III.3 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, que permitam monitorar diferentes microrganismos no ambiente.	27
III.3.1 Monitoramento de microrganismos no ambiente a partir de técnicas tradicionais.	28
III.3.2 Monitoramento de microrganismos no ambiente a partir de técnicas moleculares.	29
III.4 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para mitigação de impactos decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente.	37
III.4.1 Medidas de mitigação para a redução de riscos decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente.	38
III.4.2 Medidas de mitigação de impactos ocorridos em decorrência da introdução de microrganismos no ambiente.	41
III.4.3 Custos financeiro relacionados às medidas de mitigação.	44
Referências.	46

III.1 Discussão sobre riscos e os benefícios decorrentes da introdução de microrganismos exóticos para atuarem na recuperação de áreas contaminadas ou como agentes de controle biológico.

III.1.1 Discussão sobre riscos e os benefícios decorrentes da introdução de microrganismos exóticos para atuarem como agentes de controle biológico.

O interesse no uso do controle biológico como uma alternativa ao controle químico tem crescido, de forma que essa técnica tem sido aplicada em mais de 30 milhões de hectares ao longo do mundo (Waage, 1996; Gillespie, 2016; Van Lenteren et al., 2018). No que diz respeito, especificamente, aos agentes microbianos de controle biológico, Van Lenteren e colaboradores (2018) descrevem que a América do Norte é o mercado que mais vende esses produtos, mas existe uma crescente demanda de seu uso por parte de países da América latina, seguidos pela Ásia. Esses autores sugerem ainda que devido aos inúmeros casos de sucesso do controle biológico na produção agrícola, quando os agrotóxicos sintéticos falham ou não estão disponíveis, o controle biológico poderá ser aplicado em uma área muito maior da que tem sido utilizada até hoje.

Aplicações bem-sucedidas incluem bactérias e fungos. Por exemplo, *Agrobacterium radiobacter* não patogênico já foi usado contra a doença da galha da coroa; *Fusarium spp.* contra murchas de *Fusarium*; *Pseudomonas fluorescens* contra o tombamento do algodão causado pelo fungo *Pythium*, *Verticillium biguttatum* contra dano à batata induzido por *Rhizoctonia solani*, dentre vários outros casos (Van Veen et al., 1997).

Verifica-se, portanto, um crescente interesse na redução ou substituição de uso dos agrotóxicos sintéticos por métodos mais sustentáveis e menos agressivos ao ambiente no manejo de pragas (Waage, 1996; Tomasetto, 2017) por parte dos consumidores, varejistas e algumas instituições não governamentais, ou seja, pela população em geral. Em resposta a essa demanda já é possível observar em alguns países, incentivo ao uso do controle biológico, como ocorre no governo europeu. Além disso, tem sido muito utilizado a combinação do controle biológico em geral com outras técnicas no manejo integrado de pragas, dentre as quais, a mudança do habitat, alteração das práticas culturais e uso de variedades resistentes. Essas também são algumas das estratégias para minimizar os riscos oferecidos pelas pragas à saúde humana, aos organismos benéficos e ao meio ambiente como um todo (Gravena, 1992).

O controle biológico utilizando tanto microrganismos (incluindo vírus, bactérias e fungos) quanto "macrorganismos" (incluindo predadores e parasitóides de artrópodes e nematóides entomopatogênicos) já é usado desde muitos anos para a supressão de pragas tanto na agricultura quanto horticultura e silvicultura (DeBach, 1964; van Lenteren, 2008; van Lenteren, 2018). São ainda relatados cinco diferentes tipos de controle biológico: o natural, o conservacional, o clássico,

o inundativo e o aumentativo (Johnson, 1994; Cock et al., 2010; Van Lenteren et al., 2018). Porém, apenas o clássico, o inundativo e o aumentativo são aqueles que, geralmente, introduzem organismos no ambiente, sejam inimigos naturais ou patógenos, para combater a praga alvo. O controle biológico clássico se baseia no uso de inimigos naturais conhecidos para o combate de determinadas pragas. Esses agentes de controle biológico são, geralmente, coletados na área de origem da praga e introduzidos no local em que ela está se tornando invasiva. No controle biológico aumentativo, os agentes de controle biológico também podem ser indígenas ou exóticos, estes são liberados em grande quantidade visando à mortalidade da praga alvo. Entretanto, os agentes de controle biológico de um ciclo de cultivo não necessariamente persistirão para o próximo cultivo, o que leva a necessidade de re-inoculação em grande quantidade, o que faz com que ele também seja chamado de controle biológico inoculativo sazonal. Já no controle biológico inundativo, os agentes de controle são também liberados em grande quantidade visando obter um controle imediato de pragas, entretanto ele é utilizado em um único momento, geralmente em determinado período do ano ou nas lavouras com um ciclo de produção curto. Para os agentes microbianos de controle biológico, qualquer uma dessas estratégias pode ser utilizada, porém é mais comum se empregar o controle biológico inundativo (Eilenberg et al., 2001).

Muitas vezes o uso de agentes de controle biológico exóticos, sejam eles microrganismos ou não, é necessário. Principalmente quando o interesse é o de combater uma praga que também é exótica, ou seja, que foi introduzida por diferentes vias, sejam elas intencionais ou não, e se disseminou em um determinado local no qual não se encontra naturalmente um inimigo capaz de combatê-la. Nesse caso realmente se faz necessário o uso de inimigos naturais também exóticos para que a técnica possa ser empregada (Sá et al., 2016).

Independente da origem, os benefícios de uso dos agentes de controle biológico (ACB) em geral são relacionados, principalmente, à redução das perdas das colheitas causadas pelas pragas, o que evita os prejuízos agrícolas e garante os meios de subsistência da população. Outro importante benefício dos ACB é a redução no uso de agrotóxicos, o que por sua vez, beneficia a saúde humana e, conseqüentemente, reduz os gastos do sistema de saúde decorrentes da exposição a essas substâncias (Cock et al., 2010). Além disso, o uso dos ACB em relação aos produtos sintéticos reduz a contaminação de água e solo, diminui o impacto na biodiversidade das culturas e reduz os gastos com mão-de-obra e equipamentos especializados, devido aos métodos de aplicação serem mais facilmente adaptáveis do que os geralmente empregados para suas aplicações (Hoddle, 2004; Cock et al., 2010). Outros benefícios do uso de ACB no controle de pragas compreendem a possibilidade de controlar espécies exóticas invasoras, que geralmente não possuem inimigos naturais, conforme já mencionado, e a redução da expansão das fronteiras agrícolas (Cock et al., 2010). Assim como a possibilidade de que uma dada área retorne com suas condições ecológicas

para uma forma mais semelhante a que possuía antes da chegada da praga invasora (Hoddle, 2004). A possibilidade de utilização de agentes de controle com alvos amplos ou estreitos, dependendo do organismo utilizado, também é vantajoso (Whipps & Lumsden, 2001).

O uso dos ACB também pode ser considerado benéfico pelo fato de não demandarem intervalo de colheita ou período de espera após a liberação desses agentes nas culturas, o que ocorre com os agentes químicos (Van Lenteren et al., 2018). Além de não apresentarem dano fitotóxico às plantas e resistência dos organismos alvo contra seus inimigos naturais após o uso do controle biológico (Van Lenteren et al., 2018). Outra vantagem é que resultam em baixos níveis de resíduos após o seu uso, ficando dentro dos valores exigidos pelos órgãos reguladores (Van Lenteren et al., 2018). No que diz respeito ainda aos benefícios econômicos, para alguns programas de controle biológico, ganhos econômicos são mensurados e esses programas vêm sendo considerados bem sucedidos (Jetter et al., 1997; Nordblom et al., 2001; Paine et al., 2015).

Em relação, especificamente, aos ACB de origem microbiana, dentre suas inúmeras vantagens Alves (1998) e Bueno e colaboradores (2015) destacam: A especificidade e seletividade de alguns patógenos, como é o caso de vírus, alguns fungos e protozoários, de forma que mesmo sendo aplicados em doses maiores, não correm grandes riscos de causar desequilíbrios ao meio e nem afetar insetos benéficos à agricultura; O fato desses agentes possuírem a capacidade de produção em meios artificiais, multiplicação e dispersão no ambiente, podendo permanecer nele por longos períodos, afetando gerações das pragas; Serem agentes que não poluem o ambiente, não são tóxicos ao homem, nem aos animais, desde que se respeite as recomendações e normas de segurança do produto e o fato de que os insetos dificilmente se tornam resistentes aos patógenos. Adicionalmente, apesar do custo de desenvolvimento ser aproximadamente o mesmo que os dos produtos químicos, os gastos de registros microbianos custam cerca de 80 a 90% menos que os produtos químicos. No trabalho de Usta (2013) também são listadas algumas características benéficas de se utilizar microrganismos como ACB, sendo algumas semelhantes às já listadas acima, incluindo a possibilidade de se utilizar estirpes com ação tóxica específica para um único grupo ou espécie de praga e o fato de que alguns ACB microbianos podem se estabelecer a partir da interação com uma dada população de praga e continuar a se multiplicar, garantindo assim o controle dessa praga durante gerações ou estações subsequentes. Adicionalmente, esse autor cita também o fato de que esses microrganismos podem, além de exercer o controle das pragas, desempenhar funções que auxiliam no crescimento de raízes das plantas e a possibilidade de utilizar ainda, e se necessário, os ACB microbianos em conjunto com inseticidas químicos sintéticos, visto que na maioria das vezes, o produto microbiano não será afetado ou danificado por resíduos de inseticidas convencionais.

Segundo O'Callaghan & Brownbridge (2009) testes de laboratório contra espécies benéficas e de monitoramento de impactos pós-aplicação de ACB sustentam a visão de que, embora não estejam totalmente livres de riscos para organismos não alvo, em comparação com outros métodos de controle, esses agentes de controle microbiano são ambientalmente benignos. Medidas rápidas para mitigar ou erradicar a disseminação de pragas, cujo potencial de danos às culturas e/ou impactos nos ecossistemas indígenas é enorme, devem ser tomadas. Em tais situações, os agrotóxicos biológicos podem ser opções de controle atraentes e seu uso provavelmente terá um impacto mínimo nas espécies benéficas e outras não alvo. Tais vantagens foram claramente demonstradas com *Bacillus thuringiensis*, que não ocasionou nenhum distúrbio ecológico importante, mesmo quando usado em programas de erradicação muito intensos e prolongados.

Quanto aos riscos relacionados à introdução de ACB exóticos em geral, segundo Van Lenteren e colaboradores (2006), eles podem ser categorizados, principalmente, como riscos para a saúde humana, riscos para o meio ambiente e riscos econômicos. Os riscos para a saúde humana são menos frequentes e representados, principalmente, pela possibilidade desses organismos desencadearem processos alérgicos em humanos. Os riscos econômicos ocorrem pela possibilidade dos agentes de controle biológico introduzidos poderem atacar outros inimigos de pragas, sejam eles naturais ou até mesmo introduzidos intencionalmente anteriormente, este também é considerado um risco ao ambiente. Por fim, os riscos para o meio ambiente podem ser considerados como os mais relevantes e ocorrem pelo fato das introduções em geral poderem estar relacionadas à possíveis mudanças na distribuição e abundância de organismos nativos. Entretanto, é preciso considerar que esse só poderá ser considerado como um efeito negativo se efetivamente afetar a população nativa a ponto de causar desequilíbrios, pois se esse desequilíbrio ocorrer sobre a população de outros organismos exóticos não alvo não seria considerado como um problema. Os riscos ambientais mais graves incluem a possibilidade de extinção local ou global de uma espécie nativa (alvo ou não), grandes reduções na distribuição ou abundância de organismos nativos, vetorização de patógenos prejudiciais aos organismos nativos, perda de biodiversidade de espécies nativas e, em geral, qualquer grande mudança no equilíbrio de espécies nativas por meio de mecanismos diretos ou indiretos.

Considerando de forma mais específica, os riscos associados à introdução e uso de agentes microbianos no controle biológico, Cook e colaboradores (1996) descrevem quatro categorias de riscos principais. Dentre elas, a possibilidade de competição dos ACB com organismos não alvo e o surgimento de reações alérgicas em humanos e animais pelo contato com os ACB, como mencionado anteriormente, além da toxicidade de antibióticos e outros metabólitos ativos possivelmente produzidos por esses agentes e a sua patogenicidade para organismos não alvo. Esses autores sugerem ainda que o risco dos ACB microbianos está associado à combinação do perigo

inerente ao produto, considerando suas características intrínsecas, e do tempo de exposição. No que diz respeito à competição dos ACB, as interações microrganismo-microrganismo com os microrganismos não alvo podem levar à disputa por espaço ou disponibilidade de nutrientes e resultar no deslocamento dos microrganismos não alvo de suas áreas naturais (Cook et al., 1996). Além disso, a possibilidade de causar reações alérgicas deve ser considerada como um item de segurança durante o desenvolvimento e a aplicação do ACB, embora apenas uma proporção muito pequena de espécies de microrganismos, como alguns fungos, são relatados por causarem alergias em humanos via contato com seus esporos (Latge & Paris, 1991). Já foram registrados, por exemplo, alguns casos de alergias em trabalhadores agrícolas que foram expostos a altas concentrações de esporos dos fungos *Beauveria* e *Metarhizium* spp. (York, 1958).

Sobre os riscos referentes à toxicidade dos ACB em organismos não alvo, os antibióticos produzidos pelos microrganismos introduzidos podem ser tóxicos para organismos não alvo indígenas, dado ao amplo espectro de ação de algumas dessas substâncias (Cook et al., 1996). Outro exemplo referente à toxicidade são injúrias causadas nas sementes contendo o produto de controle biológico, essas injúrias são causadas pelos efeitos tóxicos dos metabólitos produzidos pelo microrganismo durante a germinação da semente e podem comprometer a viabilidade da cultura. Para minimizar essa possibilidade, estudos em laboratório e casa de vegetação tentam estimar a faixa de hospedeiros ecológicos que um dado ACB pode atingir para determinar a sua especificidade com a praga alvo e, conseqüentemente a segurança de seu uso (Cook et al., 1996). Em adição, essa análise de segurança deve ser reforçada quando a introdução de microrganismos com potencial para uso como agentes de controle biológico se tratarem também de patógenos oportunistas dos seres humanos. Esse é o caso, por exemplo, relatado para fungos como o *Aspergillus ochraceus* que produz a Ocratoxina A, uma micotoxina de efeitos nefrotóxicos e hepatotóxicos para seres humanos e animais (Sinski, 1975; Batista et al., 2000).

Winding e colaboradores (2004) também investigaram os riscos da introdução dos ACB, mais especificamente, sobre organismos não alvo. Nesta revisão são descritos ACB bacterianos usados para suprimir fungos patogênicos de raiz de planta. Esses autores concluem que esses ACB bacterianos afetam organismos não alvo pertencentes à cadeia alimentar tanto do solo quanto da rizosfera, sendo que esses efeitos podem ser causados tanto pela produção de compostos antimicrobianos quanto por outros mecanismos desempenhados pelos ACB. Esses autores sugerem, portanto, que a introdução direta de compostos antimicrobianos ao invés da introdução das células microbianas poderia ser uma alternativa para controlar a quantidade inoculada da substância fungicida produzida pelo ACB, o que poderá trazer menor risco aos organismos não alvos. Em outro trabalho, é demonstrado que os extratos celulares de *Pseudomonas fluorescens* DR54 contendo a substância fungicida viscosinamida apresentaram efeito em organismos não alvo,

causando a diminuição da abundância de protozoários cultiváveis no solo (Andersen & Winding, 2004).

Brimnera & Bolandb (2003) também relataram que alguns mecanismos de ação dos agentes fúngicos de controle biológico podem representar riscos para espécies não alvos, como fungos micorrízicos e saprófitas, bactérias do solo, plantas, insetos, animais aquáticos e terrestres e humanos. Tais efeitos incluem o micoparasitismo de micorrizas, a redução na micorrização das plantas, alterações na produção de cogumelos comerciais e na nodulação de *Rhizobium* spp, além de alterações no crescimento das plantas. Para o gênero *Trichoderma* spp, utilizados com ACB, por exemplo, já foram associados esses efeitos.

Outra questão de risco importante dos ACB que são aplicados várias vezes e em altas concentrações nas áreas agrícolas é o risco associado ao potencial de recombinação genética entre os microrganismos, uma vez que estirpes recombinantes geradas a partir das estirpes iniciais utilizadas podem apresentar fatores de virulência e faixa de hospedeiros distintas delas e se tornarem mais perigosas (O'Callaghan & Brownbridge, 2009).

Os principais riscos e benefícios apresentados nesse tópico podem ser visualizados na Tabela 1.

Destaca-se que é possível observar que a maioria dos riscos representados por ACB microbianos não são diferenciados em relação à origem deles, ou seja, se eles são ou não exóticos. ACB microbianos, em geral, sejam exóticos ou não, podem vir a apresentar algum dos riscos discutidos em sua introdução, mas não se encontra na literatura um risco que seja específico e diferenciado para o ACB microbiano exótico, que não seja no máximo uma maior insegurança em relação ao seu uso e a possibilidade de se tornar invasor. Por outro lado, além dos vários benefícios gerais mencionados em comparação com as outras formas de controle de pragas disponíveis atualmente, o uso deles apresenta como o principal benefício adicional o fato de que para pragas exóticas muitas vezes a única maneira de se realizar um controle microbiológico eficiente seria com o uso de um microrganismo também exótico. Assim, é necessária a realização de uma sistemática avaliação de riscos ambientais, já discutida no produto II, antes da introdução e utilização desses ou de qualquer outro ACB no ambiente. Além de monitorar para acessar *in situ* esses possíveis impactos ao longo do tempo.

Tabela 1: Principais riscos e benefícios decorrentes da introdução de microrganismos em geral, incluindo exóticos, para atuarem como agentes de controle biológico.

	Riscos	Benefícios
Controle biológico	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade dos ACB desencadearem processos alérgicos em humanos e animais pelo contato. • Possibilidade de extinção local ou global de uma espécie nativa (alvo ou não) ou redução da distribuição ou abundância de organismos nativos. • Interferência na eficácia de inimigos naturais de pragas por meio de deslocamentos competitivos. • Toxicidade de antibióticos e outros metabólitos ativos possivelmente produzidos pelos ACB aos organismos não alvo. • Patogenicidade para organismos não alvo. • Disputa por espaço ou disponibilidade de nutrientes com organismos não alvo. • Possibilidade de se tornar patógenos oportunistas dos seres humanos. • Potencial de recombinação genética entre os microrganismos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Redução das perdas agrícolas. • Redução no uso de agrotóxicos químicos, o que diminui os gastos do sistema de saúde decorrentes da exposição. • Redução da contaminação de água e solo, diminuindo o impacto na biodiversidade das culturas quando comparados aos métodos químicos. • Gastos menores com mão de obra devido aos métodos de aplicação serem, geralmente, mais facilmente adaptáveis. • Controle de espécies exóticas invasoras. • Permitir o retorno às condições ecológicas de uma área que sofreu dano de praga invasora. • Alto índice de especificidade e seletividade para o alvo por parte de alguns vírus, fungos e protozoários. • Não é preciso aguardar intervalo de colheita ou período de espera após a liberação dos ACB nas culturas, como ocorre com os agentes químicos. • Não apresentam dano fitotóxico às plantas e resultam em baixos níveis de resíduos após o seu uso, ficando dentro dos valores exigidos pelos órgãos reguladores. • Podem ser produzidos em meios artificiais e em larga escala.

		<ul style="list-style-type: none">• Capacidade de multiplicar e dispersar no ambiente, podendo controlar novas gerações das pragas.• Registros microbianos custam cerca de 80 a 90% menos que os produtos químicos.• Podem desempenhar funções que auxiliam no crescimento das plantas.• Possibilidade de utilizar, se necessário, os ACB microbianos em conjunto com inseticidas químicos sintéticos, visto que na maioria das vezes, o produto microbiano não será afetado ou danificado por resíduos de inseticidas convencionais.
--	--	--

III.1.2 Discussão sobre riscos e os benefícios decorrentes da introdução de microrganismos exóticos para atuarem na recuperação de áreas contaminadas

A introdução de microrganismos não indígenas com capacidade de degradar um determinado contaminante consiste na bioaugmentação ou bioadição (Simarro et al., 2013; Gupta et al., 2016). Essa estratégia é comumente utilizada para acelerar a remoção de contaminantes quando apenas a comunidade indígena nos locais contaminados não é capaz de promover a descontaminação da área (Gupta et al., 2016). Isso ocorre porque além de condições ambientais favoráveis, a eficiência do processo de biorremediação depende, principalmente, da presença de microrganismos com enzimas hábeis em degradar o contaminante e de mecanismos que aumentam sua biodisponibilidade e que proporcionem tolerância desses microrganismos aos mesmos (Singh & Ward, 2004; Jurys et al., 2013; Mahmoudi et al., 2013).

Os microrganismos introduzidos são especializados nos processos de degradação de contaminantes de interesse e geralmente obtidos a partir de locais com a presença desses contaminantes, já que esses locais possuem uma microbiota modificada na qual os microrganismos degradadores podem corresponder a até 100% da microbiota viável (Deziel et al., 1996; Andreoni & Gianfreda, 2007; Cravo-leurau et al., 2011). Isso ocorre porque a exposição frequente da microbiota a contaminantes resulta na seleção de espécies tolerantes aos mesmos e que contém o aparato enzimático e demais adaptações necessárias para seu acesso e utilização como fonte de carbono e energia (Saikia et al., 2012). Como consequência, essas comunidades microbianas têm uma proporção maior de bactérias capazes de responder à presença dos contaminantes (Okerentugba & Ezeronye, 2003). Adicionalmente, quando há a necessidade da bioaugmentação, em geral, ela é realizada por meio da introdução de consórcios microbianos pré-adaptados, compostos por cepas diversas (Mariano et al. 2008; Mukherjee & Chattopadhyay, 2017). Apesar de diferentes cepas poderem desempenhar as mesmas funções ou funções semelhantes é mais provável que contaminantes alvos só possam ser degradados por uma mistura de microrganismos que abriguem vias metabólicas chaves para o processo e cooperem de forma sinérgica (Herrero & Stuckey, 2015).

A biorremediação pode ser extremamente benéfica, sendo que as principais vantagens mais gerais consistem no fato de ser um tratamento que pode apresentar um melhor custo-benefício, simplicidade e baixo impacto ambiental, se comparado às técnicas físico-químicas (Lovley, 2003; Grant et al., 2006; Lors et al., 2012; Kumar et al., 2010). Além de ter uma melhor aceitação pública, poder ser realizado *in situ* e ser associado a outros métodos de tratamento físicos ou químicos (Boopathy, 2000). Diferentes opções de bioaugmentação já foram comprovadamente úteis, seja com o uso de coleções de culturas, microrganismos indígenas ou exógenos ou consórcios sob medida (Herrero & Stuckey, 2015). Vários estudos têm demonstrado, inclusive, o uso bem sucedido de uma variedade de produtos comerciais composto por cepas diversas e comercializados como

preparações secas, congeladas ou líquidas na biorremediação de diferentes contaminantes, tais como hidrocarbonetos do petróleo, em vários países (Seabra et al., 1997; Jyot et al., 2001; Mishra et al., 2000; Herrero & Stuckey, 2015).

Um exemplo de bioaumentação bem-sucedido foi reportado por Ogbulie e colaboradores (2011) que avaliaram o efeito da interação de plantas e bactérias não indígenas na remediação de solo contaminado com óleo bruto e constataram redução do contaminante mediante a adição de bactérias como inoculantes. Contudo, a introdução de microrganismos exógenos em uma determinada área contaminada pode ser vantajosa mesmo nos casos de bioestimulação, quando esse microrganismo possui um metabolismo especializado para uma dada via metabólica que pode auxiliar a comunidade indígena na degradação do poluente, como é o caso, por exemplo, de bactérias redutoras de sulfato (Rocchetti et al., 2011).

Algumas características são esperadas desses microrganismos não indígenas para justificar o seu uso nos programas de biorremediação. São elas: 1. A capacidade de degradar o poluente mais rapidamente que as populações nativas e 2. Apresentarem um espectro mais amplo da degradação de compostos poluentes quando comparados às populações nativas (Van Hamme et al. 2003, Madueño et al. 2011). Entretanto, o sucesso da adição desses microrganismos ainda irá depender de sua adaptação às condições ambientais da área contaminada e eles devem ser compatíveis com as comunidades indígenas presentes (Yu & Mohn, 2002; Díaz-Ramírez et al., 2013).

Apesar de comumente serem reportados muitos casos bem-sucedidos de bioaumentação com microrganismos exógenos não é tão comum que esses microrganismos exógenos sejam também exóticos. Destaca-se que, considerando a definição nacional apresentada no produto II, o microrganismo exótico que está sendo considerado para essa discussão é aquele que foi isolado a partir de substratos que não sejam do território nacional, do mar territorial, da zona econômica exclusiva ou da plataforma continental. A introdução de agentes de biorremediação exóticos também poderia ser uma estratégia benéfica em situações nas quais a comunidade indígena nos locais contaminados não é capaz de promover a descontaminação da área (Gupta et al., 2016). Entretanto, os principais isolados comumente relatados na literatura quanto à capacidade de degradar poluentes diversos e, conseqüentemente, utilizados em processos de bioaumentação, pertencem a gêneros como *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Comamonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus* e *Arthrobacter*. Por serem gêneros ubíquos é comum encontrar microrganismos aptos a degradar contaminantes naturalmente como parte da microbiota nativa de nichos ambientais diversos, principalmente se os mesmos forem contaminados (Kanaly & Harayama, 2000; Lors et al., 2010; Jurys et al., 2013; Azubuike et al., 2016).

Dessa forma, o uso de um microrganismo exótico na biorremediação, diferentemente do controle biológico no qual a necessidade de seu uso é mais evidente, seria melhor justificado em situações nas quais não se identificasse nenhum outro grupo de microrganismo indígena da área contaminada ou exógeno, mas ainda obtido em território nacional, capaz de degradar com eficiência semelhante o contaminante de interesse. Isso porque a maioria dos autores destaca que a maneira mais efetiva de superar quaisquer barreiras ao processo bioaugmentação ainda é tentar localizar e utilizar organismos que estejam naturalmente no mesmo nicho ecológico que o poluente (Fantroussi & Agathos, 2005). Nessa mesma linha de raciocínio, uma situação em que o uso de microrganismos exóticos poderia ser vantajoso é na biorremediação de poluentes recalcitrantes, já que por serem poluentes de difícil degradação é menos comum a obtenção de microrganismos indígenas capazes de degradá-los com eficiência (Mariano et al., 2007).

Apesar de todas os benefícios mencionados e da bioaugmentação ser uma técnica que vem sendo usada a anos para o tratamento de ambientes contaminados ainda é considerado um procedimento com resultados menos controláveis e previsíveis do que outras técnicas de remoção de contaminantes, sendo essa uma das suas principais desvantagens (Boon et al., 2000). Muitas vezes capacidades nutricionais mais amplas permitem que o microrganismo bioaugmentado altere seu metabolismo sob condições reais de operação de forma a utilizar outros substratos orgânicos em vez do poluente alvo, deixando de mostrar em condições ambientais naturais as habilidades demonstradas em laboratório, o que diminui a eficiência do processo. Essas alterações são observadas até mesmo em nível de linhagens, pois muitas vezes após a introdução *in situ* de diferentes linhagens degradativas de uma mesma espécie apenas algumas mantêm essas características. Assim, uma forma de aumentar a chance de uma bioaugmentação ser bem sucedida é a utilização de consórcios de microrganismos degradadores compostos por linhagens diversas ao invés de um único microrganismo (Herrero & Stuckey, 2015). Frequentemente também são relatados diversos problemas relacionados a condições limitantes de crescimento, inclusive a baixa concentração de substrato, presença de substâncias inibidoras, presença de microrganismos com efeitos antagonistas como a produção de antibióticos e bacteriocinas, a presença de bacteriófagos e baixa capacidade de formação de biofilme, os quais resultam na ineficiência do processo (Gentry et al., 2004; Herrero & Stuckey, 2015).

Adicionalmente, a bioaugmentação em geral, pode acarretar alguns riscos que devem ser considerados antes da introdução do microrganismo. Um desses riscos seria o do microrganismo introduzido desencadear processos alérgicos em humanos e animais pelo contato. Além disso, podem se disseminar além da área de interesse e atingir outros ambientes ou colonizar permanentemente o ambiente no qual foi introduzido. Isso pode levar a uma alteração da composição da comunidade microbiana indígena por competição ou inibição por parte do

microrganismo introduzido e causar desequilíbrios no ecossistema, inclusive, nos ciclos biogeoquímicos de nutrientes como o Nitrogênio. (Van Veen et al., 1997; Herrero & Stuckey, 2015).

Entretanto, é preciso destacar que microrganismos exógenos em geral, exóticos ou não, quando introduzidos em outros ambientes nem sempre serão capazes de sobreviver e colonizar esses novos ambientes por um longo período devido a inúmeros fatores físico-químicos, como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, além de competição com a comunidade indígena e predação (Nwankwegu & Onwosi, 2017), os quais podem afetar o sucesso do estabelecimento do microrganismo introduzido na área contaminada, caso não sejam adequados ao seu crescimento. Na verdade, estudos têm demonstrando rápido decréscimo de microrganismos exógenos introduzidos no ambiente devido principalmente à estabilidade apenas temporária das cepas recém-introduzidas, sendo muitas vezes necessário, inclusive, realizar sua introdução periódica, o que é considerado um dos principais desafios à eficiência da bioaugmentação (Wackett & Ellis, 1999; Boon et al., 2000; Gentry et al., 2004). Adicionalmente, o crescimento de populações introduzidas em ambientes microbiologicamente não perturbados é um fenômeno raro (Van Veen et al., 1997).

Além disso, ambientes impactados por contaminantes geralmente já possuem naturalmente uma microbiota alterada e com desequilíbrios. Não se espera que nesses ambientes haja um equilíbrio de funções e dos ciclos biogeoquímicos. Dessa maneira, mesmo que o microrganismo exótico seja capaz de persistir no ambiente e afetar a microbiota indígena o impacto negativo que irá causar será muito menor do que aconteceria caso essa introdução tivesse sido realizada em um ambiente natural equilibrado.

Outro risco a ser considerado é a respeito de introduções de microrganismos que já são relatados como patógenos para o ser humano (Singer et al., 2005). Adicionalmente as condições diferenciadas dos locais contaminados podem selecionar microrganismos com propriedades indesejáveis dentre os introduzidos. Sabe-se, por exemplo, que mecanismos de tolerância ao tolueno apresentados por bactérias do gênero *Pseudomonas*, envolvem bombas de efluxo e que essas mesmas bombas são responsáveis pelo bombeamento de vários antibióticos e biocidas, o que é chamado de resistência cruzada. Isso aumentaria a possibilidade de que a biorremediação *in situ* de ambientes contaminados com tolueno, por exemplo, possa selecionar bactérias resistentes a antibióticos e biocidas (Davison, 2005). Assim, nem todo microrganismo com potencial degradativo pode ser utilizado para a biorremediação, como por exemplo, a espécie *Burkholderia cepacia*, patógeno humano envolvido na fibrose cística e resistente à múltiplos antibióticos, *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno nosocomial, dentre vários outros (Davison, 2005). Assim como microrganismos não patogênicos, mas que possam apresentar mecanismos de resistência cruzada. Esse é um ponto extremamente importante e é preciso estudar minuciosamente as espécies

candidatas à introdução para garantir que não possuam determinantes de virulência e selecioná-las com cautela (Davison, 2005; Herrero & Stuckey, 2015) principalmente se forem espécies exóticas à área na qual se pretende utilizá-la.

No caso das bactérias, mesmo que elas não possuam potencial patogênico, uma vez liberadas no meio ambiente podem ter potencial para se tornarem patógenos oportunistas, devido, por exemplo, à aquisição de genes de virulência e resistência a partir de plasmídeos via transferência horizontal de genes (transformação, transdução e conjugação) em uma variedade de situações ambientais (Singer et al., 2005; Davison, 2005). Entretanto, destaca-se que nem todo elemento genético móvel com o qual um microrganismo possa ter contato necessariamente irá ser incorporado. Dependendo das espécies bacterianas envolvidas e de mecanismos de transferência de genes ativos vários processos limitam a transferência, absorção e estabilização de moléculas de DNA estranhas nas bactérias. Dentre eles destacam-se limitações no desenvolvimento de competências bacterianas e na captação e integração do DNA, pois processos de recombinação homóloga e de reparo, além de enzimas de restrição do DNA, normalmente limitam a recombinação apenas entre bactérias com DNAs semelhantes, fazendo com que a recombinação gênica ocorra em uma frequência baixa naturalmente. Em geral, genes relacionados à maquinaria celular central ou com múltiplas funções tendem a não se espalhar mesmo quando conferem alguma vantagem adicional, como resistência a antibióticos ou outros. Apenas genes relacionados a funções específicas tendem a se espalhar mais rapidamente (Thomas & Nielsen, 2005).

Adicionalmente, uma crítica frequente ao processo de biorremediação quando o mesmo é realizado pela técnica de bioaugmentação e independente da origem do microrganismo é a necessidade por parte dos países que aplicam esses agentes do estabelecimento de Legislações para que esse uso seja o mais seguro possível, desde os métodos para seleção dos microrganismos até o planejamento, execução e monitoramento do processo. Inclusive a aplicação de medidas de contenção de risco para o caso de algo sair do planejado. E na prática, conforme apresentado no Produto I, diferentemente dos ACBs, para os quais se encontram um grande número de Legislações, poucas Legislações são destinadas ao controle e segurança do uso dos agentes de biorremediação.

Os principais riscos e benefícios apresentados nesse tópico podem ser visualizados na Tabela 2.

Novamente, com excessão da possibilidade de se tornarem organismos invasores, não foram encontrados riscos específicos para a utilização de microrganismos exóticos na biorremediação e que sejam diferentes dos riscos gerais relacionados a introdução ambiental de qualquer microrganismo. Entretanto, é preciso também destacar que para a biorremediação, provavelmente, poucos também seriam os benefícios específicos da utilização desses microrganismos exóticos e,

caso ainda fosse necessário o seu uso, análises dos riscos mencionados acima precisariam ser feitas antes dessa liberação.

Tabela 2: Principais riscos e benefícios decorrentes da introdução de microrganismos em geral, incluindo exóticos, para atuarem como agentes de biorremediação.

	Riscos	Benefícios
Biorremediação	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de os microrganismos desencadearem processos alérgicos em humanos e animais pelo contato. • Podem se disseminar além da área de interesse. • Possibilidade de o microrganismo colonizar permanentemente o ambiente no qual foi introduzido. • Possibilidade de o microrganismo alterar a composição da comunidade microbiana indígena e causar desequilíbrios do ecossistema, inclusive, nos ciclos biogeoquímicos. • Possibilidade de seleção de microrganismos com propriedades indesejáveis dentre os introduzidos. • Podem se tornar patógenos oportunistas dos seres humanos. • Potencial de recombinação genética entre os microrganismos. • Carência de legislações direcionadas à segurança no uso desses microrganismos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhor custo-benefício, simplicidade e baixo impacto ambiental, comparado às técnicas físico-químicas. • Melhor aceitação pública e possibilidade de realização <i>in situ</i> • Possibilidade de ser associada a outros métodos de tratamento físico-químicos. • Possibilidade de utilização para degradação de contaminante de interesse para o qual não se identificou nenhum microrganismo nativo capaz de degradá-lo. • Podem ser mais eficazes para eliminação de poluentes recalcitrantes.

III.2 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para contenção e liberação controlada no ambiente de microrganismos destinados ao uso como agentes de controle biológico ou ao uso como agentes biorremediadores.

A introdução de microrganismos específicos em ambientes como solos é realizada há décadas (Van Veen et al., 1997). Entretanto, ainda existe uma controvérsia por parte dos estudiosos da área de biogeografia de microrganismos sobre a existência ou não de limites para sua dispersão e distribuição cosmopolita e os possíveis efeitos ambientais dessas introduções. Sendo assim, além de medidas eficazes de contenção uma das formas de minimizar os possíveis riscos decorrentes do processo seria realizar essa introdução de forma controlada, para que além de eficiente seja também segura. O que é algo mais trivial e, relativamente, fácil de planejar para macrorganismos acaba se mostrando bem mais desafiador quando a necessidade de aplicação é para microrganismos, devido ao tamanho microscópico. Ainda assim é possível encontrar diretrizes gerais relacionadas à contenção e liberação controlada principalmente de Microrganismos Geneticamente Modificados (MGMs), tais como as Resoluções Normativas Nº 7 de 2009, Nº18 de 2018 e Nº 23 de 2019, mas que podem vir a ser aplicadas a qualquer tipo de microrganismo, as quais serão descritas a seguir.

Antes da introdução ambiental em si é de extrema importância a contenção de organismos vivos para fins de pesquisa de forma a limitar o escape ou liberação desses organismos para o ambiente. No processo de importação de microrganismos que serão utilizados no Brasil é importante que eles sejam transportados bem embalados e protegidos, fiscalizados e passem por procedimentos quarentenários após sua chegada, ou seja, sejam recebidos e processados em Laboratórios de Quarentena. Esses microrganismos devem permanecer contidos em quarentena até que tenham sua identificação taxonômica comprovada, estejam livres de parasitas, patógenos ou outros organismos indesejáveis e que tenham sido testados quanto a segurança através de especificidade ao hospedeiro, para só então serem liberados.

O nível de biossegurança aplicado às pesquisas e atividades de contenção de microrganismos vai depender da avaliação de risco. Microrganismos que oferecem baixo risco à saúde humana e animal e ao meio ambiente podem ser manipulados em laboratórios que possuem nível 1 de biossegurança (NB-1). Para microrganismos que oferecem risco à saúde e ao meio ambiente os níveis de biossegurança aplicados podem variar de 2 a 4 (NB-2, NB-3, NB-4).

Para a contenção de microrganismos são essenciais medidas que controlem a entrada e saída de ar do ambiente em que esse microrganismo é cultivado ou manipulado por meio de filtro HEPA; a descontaminação ou desinfecção de bancadas, materiais e equipamentos que tiveram contato com esses microrganismos e também de resíduos sólidos ou líquidos de forma a impedir a replicação desse microrganismo fora da área de contenção. Além disso, todo o líquido efluente das instalações das áreas de manipulação do microrganismo deve ser descontaminado antes de ser liberado no

esgoto sanitário, por meio do tratamento em caixas de contenção. É importante também proteger ralos ou outros dispositivos similares, quando presentes, para bloquear a entrada ou saída de material contaminado.

Considerando a introdução intencional de microrganismos no ambiente, dentre as análises que devem ser feitas para que o processo ocorra de forma controlada é necessário fazer o levantamento de informações referentes às “medidas de biossegurança, práticas agronômicas, coleta de dados, descarte, armazenamento, origem do material desde a quarentena, se for o caso, transferência desse material até o local de aplicação e eventual destinação do microrganismo. É importante considerar também o período de monitoramento em campo.

A autorização para uma liberação planejada de microrganismos no ambiente deve requerer informações a respeito do microrganismo a ser liberado, do objetivo da pesquisa, desenho experimental e avaliações que serão realizadas. É importante fornecer uma descrição sobre a forma pela qual será feito o monitoramento da presença deste organismo no ambiente além de informar datas de início e fim da liberação planejada, o período de monitoramento, incluindo um período após o término da liberação planejada e medidas de biossegurança. O monitoramento após o término da liberação planejada é importante para verificar a permanência dos microrganismos no ambiente após o período de teste experimental e também de possíveis efeitos inesperados que possam ter ocorrido. A liberação planejada também depende de uma avaliação de risco prévia que deve identificar potenciais efeitos adversos da liberação de microrganismos no ambiente.

É essencial a identificação completa da área na qual o microrganismo será introduzido, incluindo mapas, orientação pela rosa dos ventos e coordenadas geográficas. A área em que ocorrerá a liberação planejada deve ser descrita considerando a presença de áreas de preservação permanente e reserva legal, unidades de conservação num raio de 5 km, presença de terras indígenas, rede hidrográfica, presença de lençóis freáticos, indicando sua profundidade mínima e máxima. Além disso, deve haver uma descrição de áreas circunvizinhas, bem como as vias que dão acesso à área, dados climatológicos e pedológicos e descrição do bioma e tipo de vegetação de acordo com o IBGE. A seguir serão levantadas, com base em artigos científicos, procedimentos e metodologias referenciados e que possam ser aplicados mais especificamente à introdução controlada de microrganismos destinados ao uso como agentes de controle biológico (ACB) ou biorremediadores.

III.2.1 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para contenção e liberação controlada no ambiente de microrganismos destinados ao uso como agentes de controle biológico

Quando se pretende fazer uma introdução de ACB são inúmeros os fatores que precisam ser considerados para que esse processo ocorra de forma controlada. Após a obtenção e seleção do produto que será usado no biocontrole da praga e a certificação da sua segurança e eficácia, será necessário a adoção de boas práticas para o seu lançamento no ambiente, como a verificação de que a inoculação está ocorrendo no local apropriado, a adequação da quantidade e do número de vezes que o agente de biocontrole será aplicado e a melhor época do ano ou hora do dia para a aplicação. Em seguida, deve ser feito o monitoramento pós-lançamento para avaliar se houve o estabelecimento do agente de biocontrole e qual a intensidade do controle exercido na planta alvo em níveis de indivíduo e população, além do efeito na flora e fauna não alvo e outras interações entre o agente de biocontrole e o ambiente (U. S. Fish and Wildlife Service, 2019).

Kenis e colaboradores (2019) apresentam um guia descrevendo as diferentes etapas de um controle biológico clássico de pragas de insetos em florestas plantadas e naturais, este abrange ACBs microbianos e artrópodes. Aqui, iremos abordar as questões deste guia referentes aos agentes microbianos e as proposições direcionadas a ACBs em geral, mas interessantes de serem consideradas para os ACB microbianos. Segundo esses autores, quando se pretende desenvolver programas de controle biológico para determinadas pragas é necessário a pesquisa dos inimigos naturais da praga em questão no seu habitat natural buscando observar quais organismos são e quais impactos são capazes de causar à praga que se pretende controlar, bem como observar a biologia e ecologia tanto da praga quanto de seus patógenos para que a introdução na área de interesse possa ocorrer de forma mais assertiva e com menor impacto ao ambiente. Nesse contexto, alguns procedimentos precisam ser seguidos, como coleta em campo de amostras que representem todas as fases de vida da praga e posterior cultivo em laboratório dos patógenos que ocorrem naturalmente a partir das amostras de pragas doentes ou mortas. Contudo, nem todos os patógenos irão causar a morte da praga, alguns podem reduzir a longevidade e fecundidade o que também pode ser de interesse para o controle da população. Além disso, no caso de controle de ervas daninhas, por exemplo, um agente de sucesso geralmente não promove a erradicação dada a sua dependência da praga, mas a reduz a níveis aceitáveis (CABI, 2019).

A investigação das diferentes fases de vida da praga contribuirá para determinar os estágios específicos em que o patógeno ataca ou mata o hospedeiro, além de permitir identificar possível resistência das pragas ao agente de controle natural. Essa investigação no campo ainda permitirá a definição dos requisitos climáticos para o cultivo do patógeno em condições controladas e também para a sua introdução no ambiente. Além disso, será possível reunir informações importantes da área nativa para a estruturação dos estudos de dinâmica populacional que visam definir o potencial de um patógeno controlar a praga mediante testes de densidades pela variação das densidades de hospedeiro e patógeno, por exemplo (Kenis et al., 2019).

Após a verificação do potencial de controle da praga pelo patógeno candidato ao programa de controle biológico, uma das análises importantes que devem ser feitas para garantir o menor risco às espécies não alvo é os testes de especificidade de hospedeiro. Para realizá-los, devem-se consultar taxonomistas ou especialistas no grupo taxonômico da espécie alvo para detecção de espécies não alvo em potencial como espécies filogeneticamente ou taxonomicamente relacionadas ou espécies ecologicamente semelhantes, como espécies que ocupam um nicho semelhante às espécies alvo ou tem hábitos/características similares (Kenis et al., 2019). Por exemplo, no desenvolvimento do programa de controle biológico do ácaro verde da mandioca, *Mononychellus tanajoa*, na África, utilizando um isolado de fungo brasileiro (*Neozygites floridana*) foram selecionados como organismos não alvo cinco espécies de insetos e dois ácaros, estes foram expostos aos esporos infecciosos (capiliconídios) de *N. floridana*. Após a exposição, os indivíduos foram transferidos para unidades de criação e foram feitas observações diárias até 10 dias para verificar se houve germinação dos esporos, desenvolvimento de hifas e sinais de infecção pelo fungo (Hountondji et al., 2002). No caso das introduções controladas de agentes virais para o controle biológico, deve-se investigar também a possibilidade de ocorrer resistência ao agente de controle exercida pelo hospedeiro. Os trabalhos relatam que esta resistência pode ocorrer ao longo do tempo de exposição, dessa forma o monitoramento pós introdução dos agentes virais precisa ser mais frequente, visando a detecção da presença das partículas virais no hospedeiro e também nos possíveis organismos não alvo. Esse caso de resistência ao ACB já foi relatado para os vírus MYXV e RHDV utilizados como agentes de controle biológico contra o coelho europeu na Austrália (Di Giallonardo & Holmes, 2015). Neste caso tem sido proposta a liberação futura de cepas progressivamente mais virulentas do vírus (McColl et al., 2016). Contudo, neste caso também será importante aumentar a frequência de monitoramento pós introdução dos agentes virais tanto no hospedeiro quanto nos possíveis organismos não alvo como medida para se ter uma introdução de risco controlado.

Outro ponto importante que deve ser analisado é a escolha do local ideal para a introdução do ACB de modo a garantir que o controle biológico seja eficiente, mas também seguro para o ambiente. De acordo com Kenis et al., 2019 deve-se considerar o habitat preferido do ACB e a densidade da praga alvo. Na área não pode ter sido realizada outras atividades de controle de pragas recente e também não pode ter sido feitas aplicações anteriores de inseticidas químicos ou outros produtos químicos tóxicos que possam inibir o desenvolvimento do ACB. Para aumentar a segurança da introdução desses agentes é interessante que os microrganismos sejam aplicados longe de corpos hídricos, aquíferos ou demais águas subterrâneas, pois são ambientes capazes de promover a mobilização e dispersão desses organismos (OECD, 2014). Além disso, deve-se demarcar os pontos de liberação do ACB para que as análises dos experimentos de validação do uso

dos ACB e estudos de impacto sejam precisas. Dentre essas análises deve-se avaliar o potencial do ACB de causar dano à praga em condições de campo, os efeitos climáticos durante e após a liberação, o estabelecimento e disseminação dos ACB no ambiente e a recuperação das plantas atingidas pela praga, além da observação dos efeitos nos organismos não alvo.

Em seguida, os diferentes métodos para liberação dos ACB devem ser avaliados tendo em vista a segurança ambiental. De modo geral, os ACB microbianos são aplicados utilizando as estratégias inoculativas, aumentativas ou inundativas do controle biológico. A aplicação do ACB na planta pode ser realizada utilizando estacas de madeira contendo o ACB que serão usadas para perfurar a área próxima ao sistema radicular, ou ainda mediante o revestimento de sementes ou raízes de mudas antes do transplante, via insetos que auxiliarão na dispersão do ACB, pulverizando ou submergindo as plantas com o produto (Bonaterra et al., 2012). O método mais indicado dependerá de vários fatores como o tipo de ACB, seu ciclo de vida, e o mecanismo de dispersão que o ACB possui. Para realizar a liberação de agentes de biocontrole, é comum sua aplicação e liberação a partir de líquidos, matéria orgânica, sementes, vermiculita, argila, dentre outros materiais (Fravel et al., 1985) que vão garantir a sobrevivência do ACB inoculado, o que é interessante para que não seja necessário novas introduções. Outros sistemas de entrega incluem vários sprays e algumas preparações a base de esporos e biomassa fúngica também já foram formuladas em formas de pastilhas, comprimidos, grânulos, pomadas, géis ou pastas e de bactérias na forma de pós úmidos ou secos (Lewis, 1991). Essa liberação controlada é vantajosa, pois além de garantir a sobrevivência do ACB também facilita o seu transporte, armazenamento e controle local para que não ocorra sua dispersão desenfreada (Fravel et al., 1985; Van Veen et al., 1997). Para os fungos entomopatogênicos, os métodos de liberação mais usados envolvem a pulverização ou espalhamento de suspensão de esporos em água em várias plantas hospedeiras ou a adição de vasos contendo plantas hospedeiras pré pulverizadas no local da liberação (Kenis et al., 2019).

Os trabalhos indicam, inclusive, que o material e o método de aplicação mais vantajoso podem variar de acordo com o microrganismo. Segundo Parikh & Adesemoye (2018) duas das áreas que ainda exigem atenção imediata na pesquisa para melhorar a eficácia dos produtos biológicos são o desenvolvimento de um programa de triagem confiável e a padronização do sistema de aplicação, sendo que o método de aplicação é um dos principais fatores que afetam o sucesso do controle biológico como um todo. Ainda de acordo com Lee e colaboradores (2017) para superar os problemas atuais relacionados ao uso de agentes de biocontrole, novos sistemas de distribuição desses agentes devem ser desenvolvidos. A introdução deve ser fácil, eficaz, oportuna, no local de ação apropriado e compatível com o equipamento agrícola disponível e pode ser realizada diretamente no ambiente, a partir de sementes ou por aplicação aérea (Lewis, 1991).

Uma outra forma de se preservar e controlar a introdução de células microbianas em geral, seja para uso no controle biológico ou biorremediação, é através da microencapsulação, que se caracteriza pela imobilização de uma substância ativa em uma matriz sólida de polímero formando uma microesfera (Chávarri et al., 2012). A imobilização é um termo geral utilizado para descrever diferentes formas de fixação de células ou moléculas em suportes poliméricos. As técnicas clássicas de imobilização podem ser classificadas em naturais ou artificiais. A imobilização natural ocorre espontaneamente por meio de interações eletrostáticas. Já no caso da imobilização artificial, as células são ligadas às matrizes por ligações covalentes, utilizando-se agentes ligantes (Martins et al., 2013).

As formas de imobilização incluem floculação, adsorção a superfícies, ligação covalente a carreadores, ligação cruzada entre células, encapsulamento e aprisionamento em matrizes. Dentre todos esses métodos, o encapsulamento é considerado o método que garante maior proteção às variações ambientais e maior viabilidade dos agentes microbianos (Woodward, 1988; Cassidy, 1996; Martins et al., 2013). O processo consiste na mistura de células microbianas com um composto polimérico que apresenta cargas negativas. A mistura é gotejada em uma solução com íons Ca^{2+} que promove a formação de ligações iônicas, o que resulta na formação de uma matriz polimérica, a qual possui poros de tamanho suficiente para permitir a difusão de substratos em direção às células, assim como dos produtos gerados pelo metabolismo celular para fora da matriz (Jianlong & Yi, 1999).

Diversos materiais podem ser utilizados na imobilização ou microencapsulação de microrganismos, tais como goma arábica, agarose, copolímero de acrilato, alginato, maltodextrina, derivados de celulose, gelatina ou goma de gelana, poliuretano, carragenina e álcool polivinílico, dentre outros, e várias técnicas têm sido empregadas com o propósito de prover formas convenientes e viáveis desses inoculantes microencapsulados para introdução na água ou solo (Tyagi et al., 2011; Krasaekoopt et al., 2004). Dentre esses materiais, o alginato, que é um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ (Lu et al., 2006), é um dos mais utilizados nas técnicas de biorremediação. Encontram-se também trabalhos que demonstram maior eficiência do uso desse polímero em comparação com outros na imobilização de ACB (Fravel et al., 1985).

A imobilização permite que os microrganismos sejam contidos em uma matriz relativamente não tóxica através da qual gases e líquidos podem difundir (Gentry et al., 2004). O uso de células imobilizadas tem muitas vantagens em relação às formulações feitas com células livres, incluindo a proteção contra fatores de estresse biótico, como a predação por protozoários e bacteriófagos e contra os microrganismos indígenas, e de estresse abiótico, facilitando a sobrevivência do produto

microbiano por um tempo maior (Tyagi et al., 2011). Esse fato auxilia na mitigação dos danos à membrana celular (McLoughlin, 1994). Reporta-se também que a imobilização diminui a competição entre as culturas introduzidas e as populações autóctones (Lin & Wang, 1991), assim como a perda de biomassa microbiana (Wang, 2000). Além disso, substratos ou compostos podem ser adicionados à cápsula para conferir uma vantagem ao inoculante incorporado (Gentry et al., 2004).

No processo de encapsulamento de ACB um dos fatores importantes é o tamanho das cápsulas, porque esse tamanho influencia na liberação dos agentes, sendo mais apropriado o uso de cápsulas de grande escala. Uma característica adicional interessante de um material carreador que será utilizado em campo é ser ativamente controlado para induzir a liberação do produto no local desejado, ou seja, que permita que essa liberação seja direcionada (Lee et al., 2017).

Mais recentemente, em 2017, Lee e colaboradores propuseram o uso de cápsulas de alginato biocompatíveis e incorporadas também com nanopartículas de óxido de ferro para a encapsulação de ACB, sendo uma forma diferenciada de introdução ambiental, controlada por forças magnéticas. As cápsulas foram feitas por reticulação iônica de alginato e várias concentrações de nanopartículas de óxido de ferro foram inseridas nas cápsulas para testar seu efeito. Por fim, a reatividade das nanopartículas de óxido de ferro aos campos magnéticos foi analisada para verificar o controle espacial das cápsulas. Mais estudos ainda são necessários, mas além dos tamanhos das cápsulas terem sido controlados com sensibilidade, alterando as concentrações de alginato e íons, as cápsulas em grande escala foram ativamente movidas pelos campos magnéticos, indicando que pode vir a se tratar de uma plataforma potencial de fornecimento de agentes biológicos para aplicações agrícolas. No entanto, os nanomateriais manipulados também podem se tornar contaminantes gerando preocupações sobre a possibilidade de sua persistência, ingestão e acumulação, sendo necessário estabelecer critérios adequados para avaliação de riscos do uso desses materiais (Brar et al., 2010).

Após a implementação do programa de controle biológico, é importante implementar um sistema de monitoramento pós-lançamento que avaliará a capacidade de estabelecimento do ACB no ambiente e os níveis de controle sobre a praga alvo. Com esses dados será possível verificar se a população do ACB está em níveis aceitáveis no qual há um controle da praga, mas sem o risco de ocorrer sua dispersão descontrolada no ambiente. Para tanto, deve-se realizar amostragem do ACB e da praga alvo visando a observação e registro periódico das populações do ACB, populações de pragas, níveis de infestação e possíveis competidores ou inimigos naturais do ACB, sintomas de danos causados pela praga, além dos registros das condições climáticas que poderão ser correlacionadas a esses resultados e a avaliação das espécies não alvo. Para os métodos de amostragem populacional do ACB e da praga alvo pode-se considerar os cálculos da densidade populacional, população relativa e índices populacionais. O cálculo de densidade populacional

avalia o número de indivíduos por recurso alimentar disponível; já o cálculo da população relativa avalia o número de indivíduos por pontos de amostragem e os índices populacionais são medidas indiretas da densidade do ACB, como gravidade dos danos e percentual de desfolhamento que pode ser feito quando é difícil aplicar outros métodos de amostragem (Kenis et al., 2019).

Ainda segundo esses autores (Kenis et al., 2019), após a coleta de dados durante o monitoramento pós liberação do ACB deve-se realizar a avaliação do programa de controle biológico considerando-se os parâmetros: 1. Estabelecimento do ACB; 2. crescimento populacional do ACB e 3. dispersão do ACB. Espera-se que, de modo geral, um programa de controle biológico leve entre cinco a 10 anos a partir da primeira liberação para obter um controle bem-sucedido (CABI, 2019). No que diz a respeito à capacidade de dispersão, essa pode ser uma característica vantajosa para a eficiência dado que o controle pode ser mais rápido e há a redução do número de pontos de liberação necessários (Kenis et al., 2019). Entretanto, como apontado acima, os dados de monitoramento devem ser avaliados para que esta dispersão não se torne descontrolada.

Também pode-se fazer uso de ferramentas de engenharia genética para controlar a sobrevivência, disseminação e a transferência de genes de microrganismos introduzidos no ambiente para os microrganismos nativos. Esses mecanismos envolvem tanto a excisão de DNA desnecessário, principalmente de genes relacionados à mecanismos de resistência, de modo que apenas os transgenes de interesse permaneçam ou a introdução em seu próprio DNA de genes que limitem o seu espaço e tempo de vida, como os genes de suicídio condicional que podem ser ativados sob certas condições (Gaylarde, et al., 2005; Davison, 2005). Essa também seria uma forma de realizar uma introdução mais controlada e, conseqüentemente, minimizar os riscos envolvidos na introdução ambiental desses microrganismos. Existem casos práticos do uso desses microrganismos. Um exemplo bem sucedido foi no controle da doença da galha-da-coroa, causada pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, com o uso de uma espécie não patogênica de *Agrobacterium radiobacter*. *A. radiobacter* produz uma toxina à qual *A. tumefaciens* é suscetível e os genes de resistência a essa toxina são encontrados no plasmídeo de *A. radiobacter* e poderiam ser transferidos para *A. tumefaciens* ao longo do controle biológico, aumentando as chances de uma população do patógeno alvo emergir com resistência. Para diminuir a chance desse processo acontecer, os genes de resistência de *A. radiobacter* foram retirados antes da introdução, tornando-a o primeiro agente de biocontrole geneticamente modificado usado comercialmente (Amarger, 2002). Entretanto, o uso de MGMs levanta uma série de outras questões relacionadas à incerteza desse processo e do impacto que esses microrganismos podem ter no ambiente, além da necessidade de liberações, licenças, controles e monitoramentos específicos. Isso faz com que o uso dessas estratégias precise ser minuciosamente avaliado antes do uso desses microrganismos ser considerado.

III.2.2 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para contenção e liberação controlada no ambiente de microrganismos destinados ao uso como biorremediadores

Em relação aos agentes biorremediadores, apesar de sua introdução ser relativamente mais independente em relação a tempo e espaço em comparação com os ACBs (Van Veen et al., 1997), a realização de um processo controlado também é interessante para que eles só ocupem e se desloquem por uma determinada área de interesse e não afetem negativamente o ambiente no qual foram introduzidos e outras espécies não alvo e ainda, possam ser removidos com maior facilidade após o efeito desejado ser obtido. Não foi encontrado um guia descrevendo medidas a serem aplicadas em todas as diferentes etapas do processo de biorremediação, mas diretrizes dos principais fatores a serem considerados e procedimentos para sua realização foram levantados e discutidos a seguir.

Antes da introdução ambiental dos agentes de biorremediação é preciso formular de forma clara quais seriam os objetivos preliminares da técnica, se visa a reduzir apenas um determinado contaminante ou remover o carbono orgânico total (COT) do ambiente contaminado (Herrero & Stuckey, 2015). É preciso mapear os indicadores do processo de remediação natural para definir se há realmente ou não a necessidade de intervenção técnica, considerar os riscos e custo-benefício para determinar a viabilidade ou não da aplicação da biorremediação e, caso ela seja considerada viável, definir a melhor estratégia (Chandran et al., 2011; NRC - Eua, 1993) e as zonas de interesse para realização do processo.

Pelo fato da biorremediação ser um processo complexo, precisa ser minuciosamente planejado, principalmente quando for realizada a bioaugmentação, e considerável experiência e conhecimento podem ser necessários para projetar e implementar um programa de biorremediação bem-sucedido (Kumar et al., 2010). Vários fatores devem ser considerados e avaliados criticamente para cada caso. Um dos passos principais é realizar uma caracterização detalhada da área, conhecer suas condições hidrogeológicas e geotécnicas, proximidade humana, a disponibilidade de substratos por meio de análises químicas, assim como demais fatores abióticos (NRC - Eua, 1993; Semprini et al., 1995; Azubuike et al., 2016). No solo esses principais fatores são textura, pH, temperatura, teor de umidade e tensão de oxigênio e em ambientes aquáticos, adicionalmente, a profundidade, direção, velocidade e fluxo da água (Flathman et al., 1993; Semprini et al., 1995).

É preciso mensurar as concentrações, profundidade, disponibilidade, biodegradabilidade e características físico-químicas do contaminante, além de avaliar também a extensão e localização da contaminação (Flathman et al., 1993; Azubuike et al., 2016). Também é importante realizar uma modelagem matemática do processo como um todo, seguido da estimativa sobre o tempo total de remediação, assim como uma análise de todos os possíveis riscos para o período de remediação

estimado, já discutidos anteriormente (NRC - Eua, 1993; Semprini et al., 1995). O conhecimento profundo e abrangente da diversidade da microbiota nativa da área também é fundamental (Semprini et al., 1995; Yang et al., 2016), assim como dos animais e vegetais ali presentes, os quais também devem ser monitorados ao longo do tempo.

Após a criteriosa seleção das linhagens que serão introduzidas considerando a gama de riscos já mencionados e, se possível em nível celular, é interessante aclimatá-las às condições abióticas e na presença do contaminante antes da introdução (Herrero & Stuckey, 2015). Alguns autores destacam que para aumentar a segurança do processo é interessante que os microrganismos também sejam selecionados com cuidado, para sobreviver apenas dentro de uma gama limitada de contaminantes químicos (Kumar et al., 2010).

Outra questão crucial para a bioaugmentação é o armazenamento e preservação das culturas sob as melhores condições para alcançar maior sobrevivência/atividade na inoculação. Como condições climáticas ambientais e microrganismos introduzidos são variáveis não há uma regra geral da concentração da biomassa introduzida e de como essa introdução deve ser realizada (Van Veen et al., 1997). Entretanto, inoculantes microbianos para a biorremediação também têm sido aplicados através de materiais de transporte, tais como biossólidos, carvão, argila, esterco, dentre outros. O uso desses materiais além de formar um nicho protetor fornece também um mecanismo de nutrição temporária para o microrganismo introduzido, o que é vantajoso em ambientes hostis (Gentry et al., 2004). Quanto à forma de introdução vários trabalhos também relatam preferência pela utilização de culturas secas em Spray Drying (Silva et al., 2002; Silva et al., 2003; Mujumdar, 2014). Estudos prévios já demonstraram também que a pré-incubação do inoculante em um transportador estéril pode melhorar sua sobrevivência final no ambiente (Van Veen et al., 1997; Van Dyke et al., 2000; Temprano et al., 2002).

Conforme já mencionado no tópico anterior é interessante que os microrganismos sejam aplicados longe de corpos hídricos, aquíferos ou demais águas subterrâneas, que possam promover a sua mobilização e dispersão. Outra possibilidade é a não aplicação das células microbianas na sua forma livre, mas sim imobilizadas em agentes encapsulantes como o alginato, descritos no tópico anterior, pois isso minimiza a chance de dispersão para além da área de interesse. Para os agentes biorremediadores, pelo fato do potencial degradativo das populações introduzidas no ambiente natural poder ser limitado pelas condições físico-químicas do ambiente, a adição das células imobilizadas ainda apresenta vantagem adicional. Isso permite que esses e demais fatores bióticos, como a predação, sejam melhor controlados e não afetem negativamente o crescimento e atividade dos microrganismos adicionados. (Alexander, 1999; Backman et al., 2004; Herrero & Stuckey, 2015). O sistema de imobilização celular representa a capacidade de criar uma única comunidade, com alta densidade de organismos especializados e que trabalham interativamente para decompor

um componente fornecido ou adicionado (Gentry et al., 2004). Além disso, as células encapsuladas têm apresentado um período de fase *lag* mais curto em relação às células livres, o que pode melhorar o seu desempenho na taxa de degradação do contaminante (Moslemy et al., 2002). As desvantagens são os custos com a imobilização ou as limitações de transferência de massa criadas pelo suporte ou pela alta densidade celular (Gentry et al., 2004).

Uma metodologia de introdução ambiental controlada e baseada em processos de imobilização microbiana é a biorremediação de águas subterrâneas por meio das bio-barreiras reativas permeáveis, nas quais os microrganismos degradadores do poluente são adicionados às barreiras ao invés de se adicionar na forma livre e em toda a área contaminada. Os microrganismos nessas bio-barreiras são aderidos a um suporte poroso através do qual passa o fluxo dos contaminantes junto com a água. Nessa barreira tem-se um composto reativo (carvão ativado, apatitas, Ferro zero-valente (ZVI) que retém os contaminantes permitindo assim o seu maior contato com os microrganismos inoculados. É importante salientar que, além do potencial de degradar o poluente, os microrganismos ou consórcio inoculados devem ser capazes também de formar biofilme (Tiehm et al., 2008; Upadhyay & Sinha, 2018).

Outro exemplo do uso de células imobilizadas, porém associadas com nanopartículas, na biorremediação é a imobilização de células microbianas que podem degradar ou biorrecuperar produtos químicos específicos, como o caso do revestimento da superfície de *Pseudomonas delafieldii* com nanopartículas magnéticas de Ferro. Essa interação permitiu a manipulação espacial dessa bactéria para a parede do reator utilizando um campo magnético externo, o que auxiliou na ação de dessulfurar o enxofre orgânico do combustível fóssil pela bactéria (Shan et al., 2005).

É interessante se estabelecer uma zona de amortecimento, também chamada de zona tampão, adjacente à zona onde os microrganismos foram introduzidos, a qual deve rodeá-la. É necessário que a zona tampão tenha extensão adequada para evitar que o microrganismo se propague para fora da zona de introdução, ao mesmo tempo que possa filtrar impactos negativos das atividades que ocorrem fora dela, como ruídos e poluição, e que poderiam interferir no processo (Venosa, 1998).

Para os agentes de biorremediação também pode-se fazer uso de ferramentas de engenharia genética para controlar sua sobrevivência, disseminação e a transferência de genes. No seu caso mais simples, eles podem ser construídos para sobreviverem somente em condições de poluição ou, ainda, até que um evento específico, geneticamente projetado, ocorra na fisiologia do microrganismo ou no ambiente (Gaylarde et al., 2005). O suicídio pode ser reprimido por um sinal ambiental (por exemplo, o poluente a ser degradado), permitindo a sobrevivência celular e a falta desse sinal, por outro lado, resulta na expressão do gene suicida e desencadearia a morte celular (Davison, 2005). Vários genes suicidas diferentes foram estudados, incluindo aqueles codificando

DNases e RNases, genes de lise de bacteriófagos, agentes que bloqueiam enzimas metabólicas essenciais e genes desestabilizadores da membrana celular (Gentry et al., 2004).

Esse tipo de sistema suicida já se mostrou efetivo em trabalhos de campo ao ar livre envolvendo solos dentro e fora da região da rizosfera, não sendo observada nenhuma evidência de propagação das bactérias recombinantes fora das parcelas experimentais (Torres et al., 2003). Para evitar que ocorra a perda da função letal devido às mutações, é mais interessante o uso de vários sistemas de extermínio, cálculos mostram que um nível de controle da disseminação dos microrganismos só é atingido quando os organismos modificados carregam 8 mecanismos suicidas separados, cada qual com um tipo de controle diferente (Gaylarde, et al., 2005). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, é sempre necessário considerar os riscos adicionais da liberação ambiental de MGMs.

É preciso destacar também a importância da realização de monitoramentos frequentes após a introdução, para entender como os microrganismos introduzidos evoluem na comunidade microbiana onde foram introduzidos e respondem às mudanças no ambiente, o que é importante tanto para a eficiência quanto segurança do processo (Herrero & Stuckey, 2015). Estratégias eficazes de bioaugmentação devem alcançar uma rápida diminuição da toxicidade para a comunidade microbiana presente (Herrero & Stuckey, 2015). É preciso acompanhar tanto a microbiota nativa, avaliando sua composição e indicadores de sua atividade, quanto os parâmetros físico-químicos do ambiente onde o microrganismo foi introduzido e a concentração dos contaminantes. Isso é fundamental para verificar se houve ou está ocorrendo algum desequilíbrio que esteja afetando a funcionalidade dessa microbiota e o ecossistema como um todo, monitorar possíveis hospedeiros e espécies não alvo que possam estar direta ou indiretamente sendo afetados e verificar se o processo está sendo eficiente. Pode-se considerar, inclusive, recalibrar o modelo utilizado, em função dos resultados obtidos (NRC - Eua, 1993; Cookson, 1995).

III.3 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, que permitam monitorar diferentes microrganismos no ambiente.

Existem algumas ferramentas e metodologias referenciadas que permitem monitorar a sobrevivência, crescimento, colonização, deslocamento e, em alguns casos, a atividade de microrganismos introduzidos em ambientes para diferentes fins, sejam como agentes de controle biológico, biorremediadores ou outros. Algumas delas têm sido desenvolvidas para detectar até um pequeno número de microrganismos no ambiente (Errampali et al., 1999). Esse monitoramento é importante para prever o comportamento de espécies, como e onde eles podem se estabelecer e espalhar e que impactos podem ter (Meyerson & Reaser, 2003). No caso da biorremediação

entender o deslocamento de microrganismos adicionados em matrizes ambientais contaminadas é, ainda, um fator crítico para o sucesso de projetos de biorremediação (Errampali et al., 1999).

III.3.1 Monitoramento de microrganismos no ambiente a partir de técnicas tradicionais.

Para o estudo e monitoramento de microrganismos em amostras ambientais é possível utilizar apenas métodos mais tradicionais, baseados na coleta de amostras, sua diluição seriada e plaqueamento para cultivo em meios ricos ou seletivos, quantificação e isolamento dos microrganismos, seguido da realização de triagens diversas voltadas para sua identificação taxonômica ou compreensão da sua funcionalidade. A quantificação de células viáveis e metabolicamente ativas também pode ser medida pela transformação de sais de tetrazólio em produtos insolúveis e coloridos ou fluorescentes, detectados por microscopia, espectrometria ou fluorescência (Van Veen et al., 1997). Encontra-se disponível, inclusive, kits comerciais que permitem mensurar *in situ* de forma simples e rápida a densidade de bactérias de um determinado ambiente, tais como o Petri-film, Hach Peel Plate ® HPC test method e Aquacult, dentre outros. Outra maneira de se avaliar, indiretamente, a estrutura funcional e genética de comunidades bacterianas é com o uso de sistemas comerciais como o Biolog-Ecoplate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA). Esse sistema mede a intensidade de utilização de 31 diferentes fontes de carbono pela comunidade microbiana de amostras ambientais, fornecendo um perfil metabólico comparativo dessas comunidades (Garland & Mills, 1991).

O maior problema da utilização desses métodos é a impossibilidade de se obter uma informação completa de todos os microrganismos presentes em uma amostra ambiental devido à impossibilidade de crescimento de alguns deles a partir das técnicas de recuperação, isolamento e cultivo utilizadas (Amann et al., 1995; Sierra-García et al., 2014), além de serem métodos trabalhosos e demorados. Assim, de modo geral, são métodos muito limitados, mas que podem ser interessantes e usados se o objetivo for apenas o de monitorar ou quantificar grupos de microrganismos cultiváveis introduzidos ambientalmente, principalmente por demandam poucos materiais e equipamentos, além de serem baratos.

Além disso, com o uso dessas técnicas, não se mensura especificamente os microrganismos introduzidos no ambiente, mas sim as bactérias totais da amostra. Entretanto, realizando-se os controles apropriados antes e após a introdução (ao longo do tempo) é possível estimar se o inóculo introduzido foi capaz de se estabelecer e se manter na área por um determinado período de tempo, caso seja possível constatar o aumento do número de células desse táxon após essa introdução.

Outro parâmetro que pode ser mensurado, seja como forma direta ou indireta de se avaliar a composição e funcionalidade de um ambiente no qual um microrganismo foi introduzido, é a qualidade do ambiente onde foi realizada essa introdução. A qualidade do solo é a capacidade do

mesmo funcionar dentro dos limites de um ecossistema natural ou manejado de forma a sustentar a produtividade biológica, manter ou aumentar a qualidade ambiental e promover a saúde das plantas, animais e dos homens (Doran & Parkin, 1994). A qualidade do solo é mensurada através do uso de indicadores, que são atributos que medem ou refletem o status ambiental ou a condição de sustentabilidade do ecossistema (Araújo & Monteiro, 2007). Além da biomassa microbiana há diversos outros indicadores de qualidade do solo utilizados para avaliar se as funções do solo estão sendo bem desempenhadas. Esses indicadores podem ser classificados como físicos, químicos ou biológicos (Gomes & Filizola, 2006).

Segundo Doran & Parkin (1994), alguns dos principais indicadores químicos são: A presença de toxinas no solo; A quantidade de matéria orgânica que representa a razão entre nitrogênio e carbono no solo, a decomposição da biomassa, entre outros; A Fertilidade do solo, que é a quantidade de nitrogênio, nitratos, potássio, cálcio, boro, magnésio, zinco e outros componentes e substâncias no solo; Os indicadores de pH e de condutividade elétrica. Dentre os indicadores físicos se encontram: A capacidade de retenção de umidade, que representa a quantidade de água que ele é capaz de armazenar e fornecer para as plantações; A taxa de infiltração, que é a velocidade com que a água entra no solo; A estrutura do solo, incluindo sua densidade, que é calculada pela razão entre peso seco e o volume do solo. Por fim, além da biomassa microbiana propriamente dita outros indicadores biológicos que medem indiretamente essa atividade são: A fixação biológica de nitrogênio; A respiração do solo, que pode ser determinada pela produção de CO₂ ou o consumo de O₂; A quantidade e atividade enzimática do solo. Além da quantidade de minhocas no solo.

III.3.2 Monitoramento de microrganismos no ambiente a partir de técnicas moleculares

Nos estudos mais atuais de microrganismos ambientais, os métodos tradicionais têm sido complementados ou até mesmo substituídos por técnicas moleculares, tais como sondas de hibridização, Reações de Polimerase em Cadeia (PCR) com primers específicos, genes repórteres e as análises metagenômicas (Taylor et al., 2004; Andreoni & Gianfreda, 2007; Pysek & Richardson, 2010). Muitas delas não dependem do prévio cultivo dos microrganismos e são baseadas apenas no estudo do DNA extraído diretamente das amostras ambientais, o qual é utilizado para realizar a análise da diversidade e função dos microrganismos no ambiente (Amann et. al., 1995; Torsvik et. al., 1998). O uso desses e outros métodos moleculares baseados em microscopia e citometria de fluxo vêm fornecendo uma enorme fonte de informação para o monitoramento, detecção, quantificação e caracterização de microrganismos em amostras ambientais e pode reduzir dramaticamente o tempo de detecção e aumentar a sensibilidade do processo (Greer et al., 1993; Van Veen et al., 1997). Devido aos seus rápidos avanços elas têm se tornado ferramentas para a

compreensão da distribuição, dinâmica de comunidades microbiana ambientais, além de sua abundância relativa (Torsvik et al., 2002).

Dentre as técnicas moleculares, existem aquelas que não são tão específicas, permitindo confirmar apenas a presença ou aumento de grupos de microrganismos de interesse em um determinado ambiente em condições específicas ou após sua introdução. Em contrapartida, outras demandam a alteração genética dos microrganismos introduzidos, gerando os MGMs, o que permite que eles sejam marcados e, posteriormente, detectados e monitorados de forma específica no ambiente.

Uma das técnicas moleculares mais gerais é o uso de sondas de hibridização de genes de interesse, sendo a abordagem mais comum a que utiliza sondas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Essa técnica permite detectar a presença e quantificação de microrganismos que possuam genes de funções de interesse, sejam elas relacionadas à degradação de um contaminante ou com mecanismos de controle de pragas, por hibridização. Esse tipo de abordagem pode ser utilizada para detectar a presença de genótipos específicos na comunidade indígena, mas também para confirmar o aumento de grupos de microrganismos de interesse em um determinado ambiente após sua introdução intencional.

As sondas são preparadas por meio de reações de PCR usando primers com pelo menos 30 nucleotídeos desenhados a partir de sequências conhecidas do gene do RNA ribossomal (rRNA) dos microrganismos de interesse ou seus genes catabólicos (Greer et al., 1993). Após a amplificação a sonda é marcada com uma molécula fluorescente, o que permite sua visualização microscópica, e purificada (Greer et al., 1993; Taylor et al., 2004). Para utilização da sonda pode-se primeiro cultivar os microrganismos da amostra, lisar as colônias e fixar o DNA desnaturado em membranas de nylon para promover a posterior hibridização. (Greer et al., 1993). Entretanto, não é a abordagem mais comum, pois é mais prático avaliar sua hibridização diretamente a partir do DNA extraído das amostras, o que permite detectar também os microrganismos não cultiváveis (Gentry et al., 2004).

Outra possibilidade de técnica baseada na hibridização de DNA é a de microarranjo. Ela se diferencia por utilizar sondas marcadas com diferentes fluoróforos, possibilitando a avaliação simultânea de vários genes diferentes (Taylor et al., 2004). Esses ensaios podem ser úteis para determinar a quantificação e funcionalidade de microrganismos indígenas de amostras ambientais, mas também já foram usados para monitorar a sobrevivência e atividade de inoculantes introduzidos (Dennis et al., 2003). Apesar da vantagem potencial da análise de múltiplos genes, os microarranjos podem ser difíceis de usar em amostras ambientais devido à baixa sensibilidade de detecção da técnica, já que apenas o DNA de microrganismos dominantes consegue ser detectado (Cho & Tiedje, 2002).

Existem diversas sondas construídas a partir de genes chaves das vias de degradação de contaminantes diversos e utilizadas para monitorar microrganismos em projetos de biorremediação, por exemplo, mas essa é uma técnica relativamente trabalhosa e um pouco defasada. Outras técnicas moleculares mais gerais para detecção, quantificação e monitoramento de microrganismos em amostras ambientais têm sido mais utilizadas nos últimos anos.

Os métodos baseados em PCR ainda estão entre as mais importantes ferramentas para investigações direcionadas a microrganismos ambientais, devido à sua especificidade e sensibilidade, e diversas técnicas podem ser aplicadas, tais como PCR-TRFLP, PCR multiplex, PCR-DGGE, RT-PCR e qPCR (Aoi et al., 2006; Logares et al., 2014). Dentre os métodos de PCR mais simples estão os que envolvem a amplificação dos genes do rRNA de bactérias e fungos de interesse que são visualizados, posteriormente, em eletroforese em gel de agarose. No entanto, se microrganismos similares ao inoculante estiverem naturalmente presentes no ambiente é necessário analisar o produto da PCR por técnicas adicionais, seja por sequenciamento ou por análise de polimorfismos de fragmentos terminais (T-RFLP), para aumentar a especificidade da detecção (Taylor et al., 2004). Pode-se buscar também a detecção ou quantificação apenas de genes de interesse presentes nos microrganismos introduzidos, buscando-se confirmar indiretamente a presença deles pelo enriquecimento dessas funções. Ensaio de PCR-TRFLP já foram utilizados para detectar a presença e disseminação de um inoculante microbiano adicionado para biorremediação de aquífero após 5 semanas da introdução e, ainda, diferenciá-lo dos microrganismos nativos (Lendvay et al., 2003).

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE) é um técnica de *fingerpint* que pode ser usada para monitorar a comunidade microbiana de amostras ambientais (Wakase et al., 2007). A PCR-DGGE possibilita a avaliação do perfil eletroforético de comunidades microbianas por meio da amplificação de regiões do gene de 16S rRNA a partir do DNA extraído diretamente de amostras ambientais com o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais adicionados de grampo G-C (Nocker et al., 2007). Os produtos gerados pela técnica de PCR possuem o mesmo tamanho, porém sequências de bases nucleotídicas diferentes, que permitem sua separação em bandas durante eletroforese em um gel de poliacrilamida com um gradiente linearmente crescente de agentes desnaturantes (Muyzer, 1999). Essa separação é baseada na diminuição da mobilidade eletroforética da molécula de DNA parcialmente desnaturada devido a presença do grampo GC, o que faz com que a migração do amplicom seja interrompida em uma posição única, determinada também por sua sequência nucleotídica, formando bandas no gel (Muyzer & Smalla, 1998). Cada uma dessas bandas formadas no gel representa, em teoria, uma espécie ou um grupo de espécies de bactérias (Muyzer & Smalla, 1998) e, conseqüentemente, o perfil da comunidade bacteriana pode ser visualizado em função do seu padrão de bandas no DGGE (Iwamoto & Nasú, 2001). Entretanto, a técnica

apresenta algumas limitações, tais como tendência em apresentar somente bandas correspondentes aos amplicons provenientes de espécies predominantes na comunidade microbiana amostrada e a possibilidade de co-migração de fragmentos de DNA com seqüências diferentes, criando bandas em posições idênticas no gel, mas que não são derivadas necessariamente das mesmas espécies (Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer et al., 1993; Muyzer, 1999). Outra importante limitação é o fato de o padrão da comunidade microbiana gerado não poder ser diretamente traduzido em informações taxonômicas, o que só pode ser obtido a partir da excisão de bandas de interesse do gel, re-amplificação e seqüenciamento (Giraffa & Neviani, 2001). Assim, os perfis eletroforéticos representativos da estrutura genética da comunidade microbiana são utilizados principalmente quando o objetivo é a comparação entre diferentes comunidades amostradas e a abundância de indivíduos nas populações dessas comunidades (Kent & Triplet, 2002; Ranjard et al., 2000).

Além da PCR-DGGE há algumas outras técnicas de *fingerprint* baseadas em PCR que também permitem monitorar e comparar o perfil da comunidade microbiana de amostras ambientais sob diferentes condições, dentre elas o polimorfismo de conformação de filamento único ou polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) e o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (TRFLP), mencionado anteriormente (Marzorati et al., 2008). O processo de SSCP envolve a amplificação por PCR do fragmento de interesse, a desnaturação do produto da PCR, que possui fita dupla, utilizando calor e o agente desnaturante formamida, seguido da sua eletroforese em um gel de poliacrilamida não desnaturante. Durante a eletroforese, os fragmentos de DNA de fita simples se dobram em três dimensões, de acordo com sua seqüência primária. A mobilidade eletroforética da separação passa a ser uma função da forma das moléculas dobradas. Pequenas divergências nas seqüências dos fragmentos de interesse fazem com que pelo menos uma das cadeias adote diferentes conformações tridimensionais e exibam mobilidade eletroforética única (Nataraj et al., 1999). A TRFLP também envolve a amplificação de fragmentos de interesse por PCR, mas os primers utilizados são marcados com fluoróforos. A digestão subsequente com o uso de endonucleases produz fragmentos terminais (que contêm o primer marcado) de diferentes tamanhos, já que variações nas seqüências dos amplicons, e conseqüentemente, nos locais de corte das enzimas, resultam nesses fragmentos terminais de diferentes comprimentos. Esses produtos são seqüenciados e os diferentes perfis obtidos comparados com bancos de dados (Dickie & FitzJohn, 2007).

Dentre as demais técnicas de PCR, a A PCR de transcrição reversa (RT-PCR) pode ser usada para monitorar a expressão de um gene microbiano de interesse em amostras ambientais, convertendo primeiro o mRNA em cDNA para a posterior amplificação da PCR. Embora estudos demonstrem que a RT-PCR de genes microbianos em amostras ambientais é possível, ainda pode ser um desafio significativo extrair e purificar o mRNA intacto de amostras complexas. A

sensibilidade da técnica também pode ser um problema devido à natureza lábil do mRNA (Gentry et al., 2004).

A PCR quantitativa, particularmente a PCR em tempo real (qPCR), é altamente eficaz para monitorar quantitativamente bactérias em diferentes ambientes (Aoi et al., 2006). A técnica permite a quantificação do número de cópias de determinados genes de interesse por meio do monitoramento dos amplicons gerados em cada ciclo do PCR (Higuchi et al., 1992; Urich et al., 2008), fornecendo informações da concentração inicial do DNA alvo (Zhang & Fang, 2006). Comparada com as técnicas de hibridação e PCR convencional, a qPCR não apenas possui melhor sensibilidade e reprodutibilidade, como também é mais rápida de executar e tem um risco mínimo de contaminação (Zhang & Fang, 2006). O uso da qPCR já foi reportado em vários trabalhos para quantificar de forma rápida e sensível microrganismos após sua introdução ambiental (Rodrigues et al., 2002; Wang et al., 2004).

No trabalho de Aoi e colaboradores (2006), destaca-se a possibilidade de uso de uma outra abordagem diferente e ainda mais simples da técnica de PCR em tempo real para monitorar bactérias no meio ambiente, a amplificação isotérmica de DNA mediada por alça (LAMP) que foi desenvolvido por Notomi e colaboradores em 2000. Nessa técnica, a reação de amplificação é realizada com alta sensibilidade e especificidade em condições isotérmicas (60°C- 65°C por 1 a 2 horas), o que possibilita que seja realizada em banho maria apenas. O aumento da concentração do DNA amplificado é medido pelo aumento da turbidez em função da formação de pirofosfato de magnésio, que é um bioproduto da reação. Assim é um método que combina a PCR e turbidimetria, proporcionando mensurar a “turbidimetria em tempo real”, tornando-a mais simples e prática já que pode ser realizada com o uso de um turbidímetro. Nesse estudo, os autores utilizaram essa técnica para monitorar de forma quantitativa bactérias oxidantes de amônia, monitorando especificamente o gene *amoA*, que codifica a enzima amônia monooxigenase, uma enzima chave desse processo. Foi demonstrado o potencial da LAMP para detectar e monitorar vários tipos de microrganismos ambientais devido à sua simplicidade e relação custo-benefício. As maiores desvantagens observadas foram a baixa sensibilidade, com resultados anômalos na quantificação de grupos de bactérias com baixas densidades e a complexidade no design de primers porque a técnica requer mais de um par de primers para amplificar sítios distintos do DNA.

Os ensaios de amplificação, em geral, apresentam diversas vantagens por serem ensaios simples e que podem ser utilizados sem a necessidade de cultivo dos microrganismos, diretamente a partir do DNA extraído das amostras. Por outro lado, apresentam como principais desvantagens alguns vieses introduzidos durante a PCR (Logares et al., 2014). Nos últimos anos, outras abordagens mais robustas para análise e monitoramento de comunidades microbianas de amostras ambientais a partir do DNA ambiental têm sido desenvolvidas. As principais são as abordagens

meta-ômicas, sejam elas metagenômicas (a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente, independente do seu isolamento e cultivo) (Nacke et al., 2011; Simon & Daniel, 2011), metamobilômicas (metagenoma especificamente de elementos genéticos móveis presentes nos microrganismos de uma determinada comunidade) (Li et al., 2012) e metatranscriptômicas (o conjunto de mRNAs de uma comunidade microbiana). Dentre elas, a metagenômica e a metatranscriptômica são as que mais vêm sendo efetivamente utilizada para o monitoramento de amostras ambientais.

O termo metagenômica é derivado do conceito estatístico de meta-análise (processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (análise ampla do material genético de um organismo) (Schloss & Handelsman, 2003). Esses métodos baseiam-se na extração direta de DNA a partir de amostras ambientais, seguido 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 da comunidade microbiana de sistemas complexos (Amann et al., 1995; Greene & Voordouw, 2003; Goodwin et al., 2016). Isso permite que a metagenômica seja uma ferramenta molecular que ultrapassa as limitações impostas por abordagens clássicas, possibilitando uma perspectiva mais ampla da variedade taxonômica, ecológica e funcional de microrganismos no ambiente (Sierra-García et al., 2014). Os recentes avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA de nova geração, como as plataformas íon torrent e illumina, têm criado oportunidades de sequenciamento em uma profundidade sem precedentes e estudos com o uso dessa técnica têm sido realizados em solos, oceanos, águas subterrâneas, assim com vários outros ambientes (Berry, et al., 2011; Whiteley et al., 2012). O DNA metagenômico pode ser submetido ao sequenciamento de alto rendimento “shotgun” e a anotação automática dos dados sequenciados (Venter et al., 2004). Isso tem tornado possível a obtenção de conjuntos de dados proporcionais à complexidade dessas comunidades microbianas, resultado em novas aplicações como análises comparativas do perfil metagenômico de comunidades microbianas de diferentes ambientes ou sob diferentes condições (Simon & Daniel, 2011, Carvalhais et al., 2012).

Uma variação da abordagem metagenômica é a triagem baseada em sequências, também chamada de metataxonômica (Marchesi & Ravel, 2015). Essa abordagem também envolve a extração do DNA diretamente da amostra, mas é seguida da amplificação de regiões específicas desse DNA, geralmente o RNA ribossomal, por PCR. Ela permite o estudo e identificação de microrganismos ali presentes, a determinação da abundância de cada táxon e, dessa maneira, uma estimativa da diversidade taxonômica da amostra (Handelsman, 2004). Os novos estudos que vêm sendo desenvolvidos e o enorme volume de dados resultantes, que são analisados por meio de análises de bioinformática, têm revolucionado o entendimento acerca de muitos genes, regiões

genômicas e vias bioquímicas de microrganismos, com consequente compreensão da diversidade e função microbiana ambiental (Zhang et al., 2011b; Whiteley et al., 2012).

Vários estudos têm demonstrado que a funcionalidade de uma mesma comunidade microbiana quando se avalia o DNA é diferente da obtida com a utilização de RNA (Myrold et al., 2013). Recentemente, o sequenciamento e caracterização dos metatranscriptomas, tem sido empregado para identificar assinaturas biológicas expressas em ecossistemas complexos (Simom & Daniel, 2011). Essa abordagem facilita a visão da expressão potencial de genes no momento da amostragem e reflete melhor respostas fisiológicas em decorrência de alterações ambientais (Moran, 2010; Carvalhais et al., 2012). A metatranscriptômica vem se destacando principalmente em estudos de amostras ambientais com grande variação genética entre as linhagens e impactadas por compostos xenobiótico, nas quais se avalia o efeito desses contaminantes na composição funcional da comunidade, assim como as respostas fisiológicas relacionadas à esse estímulo (Myrold et al., 2013; Jurelevicius et al., 2013). Assim, promete substituir a maioria, senão todos os estudos de expressão gênica, refinando nossa compreensão da regulação dos genes bacterianos e auxiliando na gestão e monitoramento de estratégias eficazes para o processo de biorremediação (Croucher & Thomson, 2010; Desai et al., 2010; Carvalhais et al., 2012). Entretanto, esses estudos ainda são mais raros devido principalmente à dificuldade de recuperar um mRNA de qualidade a partir de amostras ambientais, pois são moléculas cuja meia vida dura um intervalo de segundos a minutos (Simom & Daniel, 2011). Há também algumas dificuldades técnicas que precisam ser otimizadas como a natureza altamente variável da cobertura de genes e operons e necessidade de uma etapa de amplificação para construção das bibliotecas de sequenciamentos que resulta em alto número de reads redundantes (Croucher & Thomson, 2010).

As análises meta-ômicas associadas ao sequenciamento de alto desempenho estão causando uma revolução e abrindo novos caminhos de pesquisa na área da microbiologia ambiental, fornecendo uma nova compreensão dos processos ecológicos e microbiológicos e funcionamento da comunidade (Logares et al., 2012). Aplicações do sequenciamento de célula única em combinação com as análises metagenômicas também já se mostraram uma poderosa estratégia para analisar comunidades bacterianas. Até alguns anos atrás o sequenciamento de DNA de uma única célula não era viável devido a dificuldade de isolar células únicas e pelas bactérias conterem apenas alguns fentogramas de DNA, o que era insuficiente para o sequenciamento. No entanto esses obstáculos vêm sendo superados com a evolução de tecnologias para isolar células únicas, como citometria de fluxo e micromanipulação e o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitam a amplificação de genomas completos. O uso dessas técnicas associado ao desenvolvimento de novas e poderosas ferramentas de bioinformática, que tem possibilitado melhorar a montagem e a predição de genes nos

genomas de procariotos, vem permitindo a superação de gargalos até então existentes na análise dos dados desses organismos (Lasken, 2012).

Adicionalmente, metodologias para monitoramento de microrganismos no ambiente baseadas em nanopartículas tem sido uma alternativa tanto para os métodos de cultivo quanto moleculares, uma vez que são métodos menos laboriosos, demandam menos tempo e podem apresentar melhor custo benefício (Li et al., 2017; He et al., 2007). Outras vantagens da nanotecnologia envolvem a capacidade de detectar microrganismos no ambiente, incluindo diferentes alvos, de forma simultânea, mesmo que em baixas concentrações e a portabilidade da tecnologia para o local de interesse. (Koedrith et al., 2015). A identificação do alvo depende das propriedades dos materiais usados para a produção da nanopartícula, que pode ser personalizada conforme o tipo de microrganismo que se deseja detectar ou monitorar (Suppi et al., 2015). A criação de nanopartículas como biosensores envolve o planejamento de um bioreceptor e um transdutor. O bioreceptor é a biomolécula responsável por detectar o microrganismo alvo e o transdutor é responsável por converter o reconhecimento entre o bioreceptor e o alvo em um sinal mensurável. Técnicas comuns usadas para transdução de sinais incluem as ópticas, como luminescência e colorimetria, as eletroquímicas, como medida da corrente elétrica e voltagem, e as mecânicas, como por exemplo, a ressonância magnética (Suppi et al., 2015). Já os bioreceptores podem ser moléculas como anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos, moléculas sintéticas e até mesmo sistemas biológicos vivos como células e tecidos. Assim, a ligação entre a nanopartícula e o alvo altera suas propriedades físico químicas que serão detectadas pelos transdutores. A magnitude do sinal identificado é proporcional a concentração de microrganismos encontrados (Suppi et al., 2015). Embora a nanotecnologia possa ser útil para a detecção e monitoramento de microrganismos no ambiente, ainda pouco se sabe sobre a toxicidade das nanopartículas sobre organismos em ambientes naturais. Por isso, tem-se buscado também o desenvolvimento dessa tecnologia numa perspectiva sustentável, que minimize potenciais riscos tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente (Suppi et al., 2015).

Dentre os métodos de monitoramento que envolvem engenharia genética destaca-se os genes marcadores moleculares ou genes repórteres, que conferem fenótipos específicos ao microrganismo e são usados para facilitar sua detecção e enumeração após a introdução ambiental em relação à microbiota indígena (Errampali et al., 1999). Experimentos mais antigos de marcação utilizavam principalmente genes como *lacZ*, *xylE* e *gusA*, mas nas últimas décadas eles foram substituídos pelos genes *gfp* da proteína verde fluorescente e genes *lux* da bioluminescência (Davison, 2005). Dentre as opções, genes *gfp* introduzidos permanentemente no DNA cromossômico são mais estáveis do que genes plasmidiais e minimizam a possibilidade de transferência potencial do DNA marcado para a microbiota indígena. O gene *gfp* é responsável por sintetizar a proteína verde fluorescente GFP, que converte a quimioluminescência azul da fotoproteína aequorina, que é

sensível ao Ca, em luz verde. Bactérias marcadas com GFP podem ser detectadas por vários métodos: microscopia, exposição de colônias cultivadas em meio sólido após exposição à luz UV, fluorometria e citometria de fluxo. Em alguns trabalhos a detecção de células marcadas com GFP e introduzidas em amostras de solo mesmo após mais de um ano da introdução demonstram que esse sistema pode ser útil para monitoramento a longo prazo. As vantagens da técnica consistem em permitir monitorar de forma inequívoca, rápida e sensível células bacterianas introduzidas no ambiente, fornecendo informações sobre sua contagem, localização espacial e sobrevivência. Dentre as desvantagens do uso da técnica inclui-se a variabilidade da expressão de GFP em diferentes espécies, a influência das condições ambientais na expressão da GFP ser desconhecida, o fato do processo não poder funcionar em condições anaeróbias e a manutenção da fluorescência mesmo após a morte ou lise da célula (Errampali et al., 1999; March et al., 2003). Outra opção de gene repórter é o sistema luciferase (lux) nos quais genes cassetes predominantes incluem os genes *luxAB* ou *luxCDABE* derivados de *Vibrio fischeri*. Quando incorporado aos microorganismos biorepórteres a bioluminescência é detectável por sensores de medição de luz, como fotomultiplicadores (PMTs), fotodiodos e dispositivos acoplados a carga. Devido à simplicidade e sensibilidade das medições luminescentes, bactérias biorepórteres bioluminescentes se tornaram importantes ferramentas de pesquisas (Sayler & Ripp, 2000).

Para se obter informações robustas sobre o destino de inoculantes introduzidos no ambiente para diferentes fins, como a degradação de poluentes, nos trabalhos mais recentes ferramentas moleculares multifásicas, com o uso combinado de diferentes técnicas, vêm sendo cada vez mais introduzidas na biotecnologia ambiental (Cycón et al., 2017).

Dueholm e colaboradores (2014), por exemplo, estudaram a sobrevivência e atividade de *Pseudomonas monteilli* SB3078 introduzida em amostras de lodo ativado contaminado. Para tal utilizaram quatro ferramentas moleculares diferentes. A PCR quantitativa (qPCR) e a marcação aprimorada de GFP permitiram que os números de células fossem monitorados e visualizados diretamente na amostra. Já a RT-qPCR e a pesquisa isotópica estável (SIP), foram usadas para estimar a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação e crescimento dos inoculantes nos compostos alvo.

III.4 Identificação e discussão de procedimentos e metodologias, referenciados em publicações científicas, para mitigação de impactos decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente.

Conforme discutido anteriormente, existem alguns possíveis impactos decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente. Dentre os principais, pode-se citar a possibilidade de causarem desequilíbrios ecológicos se eles afetarem negativamente e, principalmente, causarem a

morte de espécies não alvo. Caso as espécies afetadas sejam outros microrganismos nativos isso pode acarretar uma alteração da microbiota local e conseqüentemente do ciclo biogeoquímico de nutrientes como nitrogênio, fósforo ou outros. O microrganismo introduzido pode também aumentar ou diminuir com o tempo sua virulência em relação ao hospedeiro, ou ainda, ampliar o espectro de possíveis hospedeiros devido a mecanismos de transferência horizontal de genes. Por fim, os microrganismos podem se disseminar para além da área de interesse de sua aplicação e crescimento e afetar outras áreas.

Dessa maneira, um dos passos importantes no processo prévio de avaliação dos riscos dessa introdução é a discussão do gerenciamento de riscos, que inclui procedimentos para a mitigação ou redução de riscos, que tem como objetivo diminuir o impacto ambiental ou econômico e a probabilidade de ameaça que possa vir a ser representada por essa introdução. Ou ainda medidas para mitigar de efeitos indesejados pós introdução, caso eles venham a ocorrer.

III.4.1 Medidas de mitigação para a redução de riscos decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente.

A mitigação é uma questão que deve ser abordada juntamente com a análise de risco da introdução dos microrganismos para prever os possíveis danos da sua exposição à saúde humana e ao ambiente. Segundo Capalbo e Naldo (2000), se após a avaliação do risco for concluído que existe risco inaceitável, os órgãos de controle devem aplicar medidas mitigadoras que podem ser a restrição do uso do produto ou a adoção de medidas técnicas. As medidas técnicas podem ser a alteração da forma como é feita a aplicação ou a formulação do produto, alterar a época de aplicação ou a implementação do uso de equipamentos de proteção individual que ainda não tenham sido usados. Pode-se ainda designar apenas áreas específicas, em que devido a particularidades ambientais e/ou climáticas, essas restrições de uso ou utilização em condições específicas precise ser realizada. No caso de microrganismos introduzidos como ACBs pode-se restringir, ainda, culturas autorizadas e impedir a aplicação na época de floração.

É importante ressaltar também que o uso de metodologias para a introdução e aplicação controlada dos microrganismos no ambiente, as quais foram discutida no tópico II, e o uso de medidas de monitoramento pós uso, discutidas no tópico III, também são formas de se mitigar vários possíveis riscos desse processo. Sejam eles relacionados aos impactos nos organismos não alvo, ao equilíbrio ecológico das comunidades microbianas da área e ao potencial patogênico para humanos e plantas de alguns microrganismos.

Para evitar o risco de que microrganismos introduzidos no ambiente se tornem espécies invasoras, ou seja, com dispersão descontrolada e impacto negativo nos ecossistemas locais, é muito importante a determinação prévia das características que afetem seu potencial invasor, tais como

relatado por Litchman et al (2010), as quais são: a presença de alta taxa de transferência gênica, alta diversidade genética, apresentarem genomas grandes, além de diferentes modos de nutrição ou vias metabólicas específicas. Esses autores também apontam algumas características mais gerais de invasividade de macrorganismos, as quais também podem ser investigadas para auxiliar na avaliação de microrganismos com potencial de se tornarem invasivos. Dentre elas, pode-se destacar a alta taxa de crescimento, se eles apresentam vias de dispersão auxiliada por vetores, se possuem estágios inativos, como esporos, se apresentam estratégias de interação ecológicas mais generalistas ou baixa especificidade de hospedeiro e se possuem elevado potencial para toxicidade. Dessa forma, no caso dos ACB é fortemente recomendado que os organismos selecionados para atuarem no controle biológico das pragas apresentem altos níveis de fidelidade ao hospedeiro e ao habitat no qual será inserido (Hoddle, 2004).

Outra análise muito importante que deve ser feita para evitar a introdução no ambiente de microrganismos patogênicos aos humanos ou plantas é a investigação de características gênicas de patogenicidade que já são conhecidas, visto que mesmo estirpes que apresentam características benéficas para determinados processos no ambiente podem também conter genes de patogenicidade, virulência ou resistência. Por exemplo, a bactéria *Burkholderia cepacia* apresenta capacidade de biorremediação, promoção do crescimento de plantas e de controle biológico de fitopatógenos (LiPuma et al., 1999; Zhao et al., 2014; Jung et al., 2018), mas é considerada um patógeno humano oportunista que pode causar fibrose cística em indivíduos imunossuprimidos, além de ser resistente à inúmeros agentes antimicrobianos (Holmes et al., 1998). Dessa forma, o sequenciamento do genoma pode auxiliar na detecção do potencial patogênico dos microrganismos antes de serem liberados no ambiente. Dentre as características relacionadas a esse potencial pode-se citar a presença do sistema de secreção de proteínas do tipo III, que é responsável pela injeção de proteínas bacterianas específicas nas células eucarióticas e a presença de bombas de efluxo que são capazes de bombear para fora das células vários tipos de antibióticos (Fernandes et al., 2003; Davison, 2005). Além da presença de genes relacionados à expressão de toxinas, exotoxinas ou endotoxinas, adesinas, receptores para interações com células de mamíferos, hemaglutininas, fímbrias, pilus tipo I e tipo IV, proteínas relacionadas à invasão da célula hospedeira (invasivinas) e ilhas de patogenicidade, dentre outros (OECD, 2016). Para acessar as características genéticas de patogenicidade de fungos, pode ser realizada a busca de genes relacionados com inúmeras doenças fúngicas pelo banco de dados DFVF (database of fungal virulence factors), como por exemplo, para alergias, infecções cutâneas, criptococoses, além de manchas de folha, antracnose, dermatofitoses, dentre outras (Lu et al, 2012). Para os vírus, características genéticas relacionadas ao seu potencial de modificar as defesas do hospedeiro, elevada capacidade de multiplicação dentro do hospedeiro e toxicidade ao hospedeiro devem ser avaliadas (Flint et al., 2009).

Adicionalmente, Gentry e colaboradores (2004) citam a possibilidade de se utilizar a bioaugmentação de genes no ambiente ao invés de introduzir o microrganismo em si. Esse método pode ser relevante quando se tem microrganismo com alto potencial de degradação de poluentes, por exemplo, mas de gêneros relatados como patógenos oportunistas. Assim, para evitar a possibilidade desse microrganismo causar doença ao ser humano, pode-se utilizar apenas o seu potencial genético de biorremediação. Nessa técnica, o microrganismo introduzido carregando genes relacionados às vias de biorremediação irá transferir esses genes para os microrganismos indígenas da área via processos de transferência horizontal. Pode-se explorar, por exemplo, o processo de conjugação para a transferência de plasmídeos contendo esses genes de interesse na área a partir de células doadoras, visando a aumentar a disseminação de genes de degradação entre as bactérias indígenas do solo (Garbisu et al., 2017). As células doadoras podem ser de microrganismos indígenas isolados da área ou de microrganismos exógenos que servirão apenas como vetores do plasmídeo no ambiente. A vantagem de se utilizar microrganismos indígenas é o fato deles serem adaptados para sobreviver e proliferar naquele ambiente. Entretanto, mesmo que se utilize outros vetores a técnica pode ser vantajosa, pois não é necessário à sobrevivência desses vetores a longo prazo, já que o objetivo é apenas a transferência do plasmídeo para as estirpes indígenas da área (Newby et al., 2000). Com essa abordagem pode ser possível melhorar a atividade da população indígena estabelecida, que pode mostrar melhores habilidades em tolerar as condições prevalentes no sítio contaminado e degradar o contaminante, podendo também ter aplicações para uso em locais contaminados por metais (Top et al., 2002; Herrero & Stuckey, 2015).

Outra estratégia que pode ser utilizada para evitar o uso de microrganismos com potencial de se tornarem patogênicos é a fitoaugmentação de genes de interesse, na qual esses genes são inseridos no genoma de uma planta e sem a necessidade, portanto, da adição do microrganismo. Por exemplo, plantas de arroz contendo o gene da clorocatecol dioxigenase (*cbnA*) da bactéria *Ralstonia eutropha* NH9 foram introduzidas para a degradação de poluentes orgânicos (Shimizu et al., 2002). *Arabidopsis thaliana* também foi introduzida com os genes bacterianos da arsenato redutase (*arsC*) e da γ -glutamilcisteína sintetase (γ -ECS), visando à remediação de áreas contaminadas com arsênio (Dhankher et al., 2002; Sarwar et al., 2017).

Outro exemplo clássico de introdução de genes microbianos em plantas é a introdução dos genes da bactéria *Bacillus thuringiensis*, por exemplo, no milho. Esses genes são responsáveis pela produção de proteínas larvicidas Cry no genoma da planta, o que confere resistência à praga (Fließbach et al., 2011). Contudo a introdução de organismos geneticamente modificados no ambiente, seja microrganismos ou plantas, ainda é uma estratégia difícil de ser liberada pelos órgãos reguladores dada a dificuldade de fazer previsão dos impactos que serão gerados a curto e longo prazo, conforme já discutido anteriormente.

Pode-se observar que muitas das medidas de mitigação discutidas, sejam elas contra possíveis impactos ambientais ou econômicos, decorrentes da introdução de microrganismos no ambiente já são propostas e utilizadas há alguns anos. As estratégias mais interessantes de serem consideradas e aplicadas no processo de liberação da introdução dos microrganismos no ambiente devem ser avaliadas minuciosamente e caso a caso, tendo em vista as especificidades relacionadas ao tipo de microrganismo que se pretende introduzir, quais processos que eles irão desempenhar, seja para biorremediação ou controle biológico, o tipo de ambiente e principalmente, quais os principais potenciais riscos relacionados a esse processo.

III.4.2 Medidas de mitigação de impactos ocorridos em decorrência da introdução de microrganismos no ambiente.

Mesmo que todo o processo de utilização de microrganismos, seja como ACB ou biorremediadores, tenha sido minuciosamente avaliado e a introdução ambiental desses microrganismos realizada de forma controlada e com monitoramento frequente, ainda assim alguns dos impactos negativos já mencionados podem vir a ocorrer como consequência desse processo. É importante considerar essa possibilidade antes da realização da introdução do microrganismo em si e estabelecer possíveis planos de mitigação de impactos para que os mesmos, se não forem totalmente eliminados, sejam ao menos controlados. Medidas de mitigação pós introdução eficazes também devem ser elaboradas caso a caso, considerando as características e o dano que está sendo causado pelo microrganismo introduzido. Apesar de não ser possível estabelecer planos universais de mitigação de impactos que possam ser aplicados em qualquer situação há algumas premissas e princípios gerais que precisam ser seguidos para qualquer organismo, principalmente se ele for exótico.

O Guia interino de princípios para prevenção, introdução e mitigação de impactos de espécies exóticas, desenvolvido pela Convenção sobre Diversidade Biológica (CBD, 2000), estabelece princípios que devem ser seguidos para o manejo de impactos da introdução desses organismos, nos quais se incluem os microrganismos. A mitigação de impactos deve prever medidas de contenção e controle, erradicação e mitigação dos efeitos adversos da espécie introduzida. A erradicação deve ser prioridade sobre as demais medidas considerando que é mais fácil erradicar espécies exóticas e invasoras no início do estágio de invasão, quando a sua população é menor e está menos dispersa pelo ambiente. A maioria das tentativas de erradicação de espécies introduzidas que já estão bem estabelecidas no ambiente não alcançam sucesso (Pimentel, et.al., 2001).

Caso não seja possível erradicar a espécie exótica, deve-se tentar utilizar medidas de contenção que minimizem a sua dispersão ou seus efeitos danosos, como a escavação e incineração

de plantas não alvo que estejam sendo afetadas pela espécie invasora ou alteração de alguma propriedade física ou nutricional do ambiente que cause prejuízo à sobrevivência da espécie exótica. Para isso é necessário determinar e conhecer a área de ocupação da espécie de interesse. O monitoramento constante em volta dessa área é essencial para verificar a eficiência da medida de contenção e para agir de forma rápida com o intuito de erradicar espécies que possam ter ultrapassado os limites da área de contenção. Já as medidas de controle devem focar tanto na diminuição da população da espécie introduzida quanto na redução do impacto dos efeitos adversos causados pela introdução. As medidas de controle, geralmente envolvem uma combinação de várias técnicas e devem ser regularmente aplicadas mesmo a longo prazo. Dessa forma, há maior garantia de alcançar e manter os resultados relacionados ao controle da espécie. As técnicas de mitigação devem ainda ter um bom custo benefício e não devem causar riscos ao meio ambiente, à saúde humana e agricultura. Além disso, devem ser social, cultural e eticamente aceitas (CBD, 2000).

Quando se constata algum dano ambiental causado especificamente por um microrganismo que se tornou invasor, independente da sua origem e se foi introduzido intencionalmente ou não, essas premissas gerais de mitigação desses danos também são importantes e devem ser consideradas. Entretanto, aplicá-las efetivamente para os microrganismos definitivamente é um processo mais complexo, pois após a constatação da ocorrência dos impactos indesejáveis, para mitigar os danos é preciso encontrar formas de eliminar ou ao menos conter esses microrganismos, o que é um processo difícil de ser realizado de forma eficiente e, principalmente, sem afetar outros membros não alvo da comunidade indígena da área. Segundo Pickett e colaboradores (2018), na verdade, a estratégia que contempla maior sucesso de combate microrganismos invasores ainda é, em primeiro lugar, o impedimento de que eles sejam introduzidos, seja intencionalmente ou não.

Poucos trabalhos ajudam com recomendações de estratégias que possam ser usadas para a restauração ambiental ou mitigação dos efeitos de patógenos invasivos depois que são introduzidos no ambiente (Dickie et al., 2016) e a maioria deles são geralmente relacionados à agricultura ou silvicultura (Pickett et al., 2018). Ainda assim, a seguir serão abordadas algumas medidas e procedimentos mais gerais que podem ou já foram utilizados em ocasiões nas quais impactos ambientais negativos causados por microrganismos foram constatados e que podem ser extrapoladas para novas situações nas quais esses impactos venham a ocorrer ou servir como base para a elaboração de planejamentos mais específicos.

Na tentativa de minimizar o impacto causado pelo fungo fitopatógeno *Phytophthora ramorum* que se dispersou mediante a distribuição de plantas de viveiros infectadas causando morte de carvalhos e infecção de mais de 70 espécies de plantas em florestas naturais na Califórnia (EUA), o trabalho de Venette & Cohen (2006) buscou mapear regiões geográficas do país que fossem mais e menos propensas ao estabelecimento desse fungo comparando parâmetros climáticos

usando o software CLIMEX (Sutherst & Maywald, 1985). De acordo com os autores, esses resultados poderiam ajudar na mitigação do impacto causado pelo fungo de duas formas, a primeira pela detecção de períodos momentâneos de clima que não favorecem o crescimento do fungo em um local onde já ocorreu o seu estabelecimento, os quais poderiam ser usados como momentos cruciais para introduzir métodos de controle visando aumentar o potencial de interromper a progressão da doença. A segunda forma é que a modelagem pode ajudar a encontrar as áreas para a pesquisa das plantas infectadas nas quais deve ser feita a alocação de recursos financeiros para a amostragem. Esse processo ajuda a aumentar a viabilidade econômica do controle da doença, pois possibilita que o investimento seja feito em locais prioritários.

Esses procedimentos de rastreamento e modelagem com o uso de drones, imagens de satélite e usando softwares diversos são de extrema importância para o controle de microrganismos invasores, pois ajudam a direcionar qualquer estratégia no planejamento para controlá-los. Entretanto, apresentam a limitação de só poderem ser úteis em situações nas quais os microrganismos estão causando efeitos indesejáveis visíveis e mais facilmente detectáveis, como infecções em plantas não alvo.

Em outro caso, para a restauração das florestas de castanheira na América do norte que praticamente desapareceram após a introdução do fungo (*Cryphonectria parasitica*) causador da ferrugem nesta planta foram propostas algumas medidas que envolveram o plantio de árvores mais resistentes à ferrugem e o desenvolvimento de populações de fungo menos virulentas devido à infecção causada por vírus da família Hypoviridae. A hipovirulência está associada à propagação desse vírus na população dos fungos, sendo que o vírus inibe a reprodução fúngica e interfere nos mecanismos da doença contribuindo para a redução do dano às árvores (Milgroom & Cortesi, 2004; Jacobs, 2007).

Abordagens com o uso de vírus para controlar distúrbios ambientais causados por bactérias também têm sido relatadas. O uso de bacteriófagos é uma importante estratégia porque a maioria desses vírus apresenta uma gama de hospedeiros restrita a uma ou poucas espécies bacterianas relacionadas. Portanto, não apresentam risco ambiental para a cultura ou para a microbiota ao redor da área afetada pelas bactérias de interesse (Jones et al., 2007). Por exemplo, o uso de bacteriófagos contra os patógenos da murcha causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* e *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*, que afetam tanto culturas como plantas ornamentais, tem sido avaliado como método de controle (Álvarez & Biosca, 2017). Neste trabalho, os bacteriófagos foram capazes de controlar as estirpes *R. pseudosolanacearum* e/ou *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*. No trabalho de Jones e colaboradores (2012), foi discutido o uso de bacteriófagos para o controle de doenças de plantas na filósfera, mas a necessidade do contato com o patógeno aliado à baixa persistência do vírus na folha são fatores que afetam a eficácia do

controle. A incapacidade dos bacteriófagos de persistir nas superfícies das plantas ao longo do tempo ocorre devido a fatores ambientais como a inativação pela luz ultravioleta. Assim, é uma técnica que apresenta grande potencial e pode ser utilizada como estratégia de mitigação de bactérias introduzidas ambientalmente e que estejam causando danos, mas ainda precisa ser aperfeiçoada.

No caso do controle da invasão de fungos ectomicorrízicos já foi sugerida a construção de valas ou aberturas no solo em locais nos quais a invasão ainda está em pequena escala, para romper as conexões das hifas com o hospedeiro e inserir uma barreira para impedir o crescimento dessas hifas. Essa escavação foi proposta como um mecanismo para retardar a co-invasão de fungos e pinheiros (Thiet & Boerner 2007). Esse método visa cortar o suprimento de carbono do fungo, o que resultará na sua morte, sendo necessária a remoção manual de esporocarpos no primeiro ano, para impedir a dispersão. Essa estratégia é recomendada para contenção de fungos micorrízicos à beira das áreas onde foi detectada a invasão ou para proteger plantações (Dickie et al., 2016).

Ainda é possível considerar o uso de agrotóxicos como uma estratégia a se pensar quando se trata de medidas de mitigação para o controle de pragas. Porém, embora essa seja uma medida de custo relativamente baixo, como já apresentado e discutido anteriormente, são várias as desvantagens do seu uso, a garantia de que o controle será efetivo pode variar muito e ainda deve-se considerar os efeitos negativos em todos os organismos não alvo. (Dickie et al., 2016). Dessa maneira, seria uma medida interessante apenas em caráter mais emergencial, para tentar conter a dispersão de um microrganismo de interesse que está se tornando invasor, e se ganhar tempo, por exemplo, até que medidas mais direcionadas possam ser planejadas e colocadas em prática.

III.4.3 Custos financeiro relacionados às medidas de mitigação

Os maiores impactos econômicos relacionados à introdução de espécies exóticas que se tornam invasoras estão associados à agricultura e silvicultura (Pimentel et al., 2001). Calcula-se que as perdas econômicas relacionadas à essas invasões possam somar nos seis países (Estados Unidos da América, Reino Unido, Austrália, África do Sul, Índia e Brasil) mais de 336 bilhões de dólares por ano. Os custos para controlar esses impactos também são altos, podendo chegar a 30 bilhões de dólares por ano. Porém, se os custos relacionados à perda de serviços ecológicos causados pela invasão de espécies à biodiversidade nativa pudessem ser estimados, esse valor ultrapassaria os 336 bilhões de dólares anuais.

Na Austrália, por exemplo, 15,2% das perdas de culturas são atribuídas aos microrganismos que se tornaram patógenos vegetais, o que equivale a um total de US \$ 3,3 bilhões por ano. Outro exemplo são as perdas relacionadas à produção de ruminantes na Nova Zelândia que podem chegar à US\$ 156 milhões por ano devido à destruição das pastagens por ervas daninhas invasoras

(Bourdôt & Saville, 2010). Esses altos custos estão associados à dificuldade, nesses casos, de conter a dispersão e reduzir a população do organismo invasor (Gren, 2008). Na Nova Zelândia, por exemplo, o custo da adição de uréia para substituir o nitrogênio na agricultura que foi perdido devido a doenças causadas às plantas leguminosas de trevo pode chegar à US \$148.74/ha por ano (White & Gerard, 2006).

Marbuah (2014) discute que os custos associados ao controle ou mitigação de impactos decorrentes da introdução de espécies exóticas e invasoras no ambiente são altos devido à dificuldade em agir de forma rápida para impedir o aumento da população do organismo e conter sua dispersão. Isso pode ser ainda mais acentuado para os microrganismos devido à sua alta taxa de crescimento. Além disso, os custos para erradicação de uma espécie são maiores do que os custos de contenção e manutenção da população de espécies invasoras em níveis aceitáveis (Born, 2005).

Outro ponto a ser considerado é que devido às perdas econômicas que esses danos apresentam, como discutido anteriormente, pode-se perceber que os custos para não tomar as medidas de mitigação também são altos, pois a depender da situação podem causar sérios danos ambientais e, conseqüentemente, financeiros. Dessa forma, pode-se inferir que do ponto de vista econômico e ambiental é mais eficiente investir em estratégias de prevenção de impactos causados pela introdução de microrganismos do que em estratégias de mitigação, principalmente para organismos que possam ter potencial de se disseminar, inclusive, para além da fronteira nacional.

Referências

- Alves, S.B. Controle microbiano de insetos. 2ª ed. São Paulo: Editora Fealq, 1998.
- Amann, R. I., Ludwig, W. Schleifer, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169, 1995.
- Álvarez, B., Biosca, E. G. Bacteriophage-based bacterial wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 8, 1218, 2017.
- Amarger, N. Genetically modified bacteria in agriculture. *Biochimie*, v. 84, n. 11, p. 1061-1072, 2002/11/01/ 2002. ISSN 0300-9084.
- Andersen, K. S., Winding, A. Non-target effects of bacterial biological control agents on soil Protozoa. *Biology and fertility of soils*, 40(4), 230-236, 2004.
- Andrade, G. M. D., Sartoretto, L. M.; Brasileiro, A. C. M. Biologia molecular do processo de infecção por *Agrobacterium* spp. *Fitopatologia Brasileira*, v. 28, p. 465-476, 2003.
- Andreoni, V., Gianfreda, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 287-308, 2007.
- Aoi Y, Hosogai M, Tsuneda S. Real-time quantitative LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method for monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of biotechnology*. 4:484-91, 2006.
- Araújo, A. S. F., Monteiro, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Bioscience Journal*, 23(3), 2007.
- Armstrong KF, Ball SL. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 15:3-23, 2005.
- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., Okpokwasili, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180, 2016.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Prado, G. Isolados de fungos ocratoxigênicos da secção Circundati (Grupo *Aspergillus ochraceus*) associados a grãos de café verdes, 2000.
- Berry, D., Mahfoudh, K.B.; Wagner, M.; Loy, A. Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and environmental microbiology*, v. 77(21), p. 7846-7849, 2011.
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., Sharma, K. D. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 7-21, 2015.
- Bonaterrea, A., Badosa, E., Cabrefiga, J., Francés, J., Montesinos, E. Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pome fruit tree diseases. *Trees*, 26(1), 215-226, 2012.
- Brimner, T. A., Boland, G. J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, ecosystems & environment*, 100(1), 3-16, 2003.

- Boon, N., Goris, J., De Vos, P., Verstraete, W., Top, E.M. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2 gfp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2906–2913, 2000.
- Boopathy, R. Fatores que limitam as tecnologias de biorremediação. *Biorresource technology*, 74 (1), 63-67, 2000.
- Born, W., Rauschumayer, F., Brauer, I. Economic evaluation of biological invasions - a survey. *Ecological Economics*, 55, 321-336, 2005.
- Bourdôt G. W., Saville, D. J. Giant buttercup -a threat to sustainable dairy farming in New Zealand. *Proceedings of the 4th Australasian Dairy Science Symposium: 355-359.* 507, 2010.
- Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste management*, 30(3), 504-520, 2010.
- CABI (2019). Acesso em 23 de Outubro de 2019. Disponível em <https://www.cabi.org/what-we-do/invasive-species/biocontrol/>
- Cameotra, S. S., Makkar, R. S. Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 97-116, 2010.
- Capalbo, D. M., De Nardo, E. A. Análise de risco e impacto ambiental do uso de agentes de controle biológico. *Controle biológico. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente*, 351-385, 2000.
- Carvalhais, L. C., Dennis, P. G., Tyson, G. W., Schenk, P.M. Application of metatranscriptomics to soil environments. *Journal of Microbiology Methods*, v. 91, p.246–251, 2012.
- Chávarri, M., Marañón, I., Villarán, M. C. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. In *Probiotics*. IntechOpen, 2012.
- Cho, J.-C., Tiedje, J.M. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1425, 2002.
- Cook, R. Assuring the safe use of microbial biocontrol agents: a need for policy based on real rather than perceived risks. *Canadian journal of plant pathology.* 18(4):439-45, 1996.
- Cock, M. J., van Lenteren, J. C., Brodeur, J., Barratt, B. I., Bigler, F., Bolckmans, K., ... & Parra, J. R. P. Do new access and benefit sharing procedures under the convention on biological diversity threaten the future of biological control?. *BioControl*, 55(2), 199-218, 2010.
- Convenção sobre Diversidade Biológica. COP 5 DECISION V/8: Interim guiding principles for the prevention, introduction and mitigation of impacts of alien species. 2000. Disponível em: <<https://www.cbd.int/decision/cop/default.shtml?id=7150>>. Acesso em 24 de outubro de 2019.
- Cook, R. J., Bruckart, W. L., Coulson, J. R., Goettel, M. S., Humber, R. A., Lumsden, R. D., ... & Quimby Jr, P. C. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation, 1996.
- Cookson Jr JT. *Bioremediation engineering: Design and application*. McGraw-Hill, Inc.; 1995.

- Cravo-Laureau, C., Hernandez-Raquet, G., Vitte, I., Jézéquel, R., Beletet, 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.
- Cycón, M., Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: a review. *Chemosphere*, 172:52–71, 2017.
- Das, N., Chandran, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Davison, J. Risk mitigation of genetically modified bacteria and plants designed for bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32(11-12): 639-50, 2005.
- DeBach, P. Biological control of insect pests and weeds, Paul DeBach, ed., 1964.
- Dennis, P., Edwards, E.A., Liss, S.N., and Fulthorpe, R. Monitoring gene expression in mixed microbial communities by using DNA microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 769, 2003.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisailon, J. Biosurfactant production by a soil *pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, p. 1908-1912, 1996.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., Meagher, R.B. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and γ -glutamylcysteine synthetase expression, *Nat. Biotechnol.* 20, 1140, 2002.
- Di Giallonardo, F., Holmes, E. C. Viral biocontrol: grand experiments in disease emergence and evolution. *Trends in microbiology*, 23(2), 83-90, 2015.
- Díaz-Ramírez, I., Escalante-Espinosa, E., Schroeder, R. A., Fócil-Monterrubio, R., & Ramírez-Saad, H. Hydrocarbon biodegradation potential of native and exogenous microbial inocula in Mexican tropical soils. In *Biodegradation of hazardous and special products*. IntechOpen, 2013.
- Dickie, I. A., FitzJohn, R. G. Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) to identify mycorrhizal fungi: a methods review. *Mycorrhiza*, 17(4), 259-270, 2007.
- Dickie, I. A., Nunez, M. A., Pringle A, Lebel T, Tourtellot SG, Johnston PR. Towards management of invasive ectomycorrhizal fungi. *Biological Invasions*, 3383-3395, 2016.
- Doran, J. W., Parkin, T. B. Defining and assessing soil quality. In: Doran, J. W. et al. *Defining soil quality for sustainable environment*. Madison: Soil Science Society of America Proceedings, p. 03-21, 1994.
- Dueholm, M. S., Albertsen, M., D'Imperio, S., Tale, V. P., Lewis, D., Nielsen, P. H., & Nielsen, J. L. Complete genome sequences of *Pseudomonas monteilii* SB3078 and SB3101, two benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacteria used for bioaugmentation. *Genome Announc*, 2(3), e00524-14, 2014.
- Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46(4):387-400, 2001.
- Embrapa Acesso em 23 de Outubro de 2019. Disponível em <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/45574867/biological-control-in-brazil-has-potential-to-grow-20-a-year?link=agencia>

- Errampalli, D., Leung, K., Cassidy, M. B., Kostrzynska, M., Blears, M., Lee, H., Trevors, J. T. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 35(3):187-99, 1999.
- Fantroussi, S., Agathos, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 268–275, 2005.
- Fernandes, P., Ferreira, B. S., Cabral, J. M. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 22:211–216, 2003.
- Fließbach, A., Messmer, M., Nietlispach, B., Infante, V., & Mäder, P. Effects of conventionally bred and *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize varieties on soil microbial biomass and activity. *Biology and Fertility of Soils*, 48(3), 315–324, 2011.
- Flathman, P. E., Jerger, D. E., Exner, J. H. *Bioremediation field experience*. CRC Press; Dec 21, 1993.
- Flint, S. Jane; Enquist, Lynn W.; Racaniello, Vincent R.; Skalka, Anna Marie. *Principles of Virology*. Vol. II Pathogenesis and Control (3rd ed.). Washington, D.C.: ASM. pp.42–47, 2009.
- Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D., Connick Jr, W. J. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*. 75(7):774-7, 1985.
- Garbisu, C., Garaiurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., Alkorta, I. Plasmid-mediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Frontiers in microbiology*, 8, 1966, 2017.
- Garland, J. L., Mills, A. L. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *American Society for Microbiology*, v. 57, p. 2351-2359, 1991.
- Gaylarde, C.C., Bellinaso, M. D. L., Manfio, G.P. Biorremediação. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 34 , 36-43, 2005.
- Gentry, T., Rensing, C., Pepper, I. A. N. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical reviews in environmental science and technology*, 34(5), 447-494, 2004.
- Ghazali, F.M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., Basri, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium *Int Biodeterior Biodegrad*, 54 pp. 61-67, 2004.
- Gillespie, M. A., Gurr, G. M., Wratten, S. D. Beyond néctar provision: the other resourcer equirements of parasitoid biological control agents. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 159(2), 207-221, 2016.
- Giraffa, G., Neviani, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food. Microbiol*, 67: 19-34, 2001
- Gkorezis, P., Daghigho, M., Franzetti, A., Van Hamme, J. D., Sillen, W., Vangronsveld, J. The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Frontiers in microbiology*, 7, 1836, 2016.
- Gomes, M. A. F., Filizola, H. F. Indicadores físicos e químicos de qualidade de solo de interesse agrícola. *Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente*, 6, 2006.

- Grant, R. J., Muckian, L. M., Clipson, N. J. W., Doyle, E. M. Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 293-300, 2006.
- Gravena, S. Controle Biológico no Manejo Integrado de Pragas. Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE), 1992.
- Gren, M. Economics of alien invasive species management - choices of targets and policies. *Boreal Environment research*. 13: 17-32, 2008.
- Greene, E. A., Voordouw, G. Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *Journal of Microbiological Methods* 53: 211– 219, 2003.
- Greer C, Masson L, Comeau Y, Brousseau R, Samson R. Application of molecular biology techniques for isolating and monitoring pollutant-degrading bacteria. *Water Quality Research Journal*, 28(2):275-88, 1993.
- Gupta, A., Joia, J., Sood, A., Sood, R., Sidhu, C., Kaur, G. Microbes as potential tool for remediation of heavy metals: a review. *J Microb Biochem Technol*, 8(4), 364-72, 2016.
- Gutierrez, M. G., Mestre, S. S., Singh, S. B., Taylor, G. A., Colombo, M. I., Deretic, V. A autofagia é um mecanismo de defesa que inibe a sobrevivência de BCG e *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos infectados. *Cell*, 119 (6), 753-766, 2004.
- Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, p. 669–685, 2004.
- Havel J., Reineke W. Degradation of Aroclor and survival of strains in soil microcosms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 38, pp. 129-134, 1999.
- He, S., Guo, Z., Zhang, Y., Zhang, S., Wang, J., Gu, N. Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulata*. *Materials Letters*, 61(18), 3984-3987, 2007.
- Heinaru, E., Merimaa, M., Viggor, S., Lehist, M., Leito, I., Truu J. Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted área. *FEMS Microbiol Ecol*, 51, pp. 363-373, 2005.
- Herrero, M., Stuckey, D. C. Bioaugmentation and its application in wastewater treatment: a review. *Chemosphere*, 140, 119-128, 2015.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, v. 10, p. 413-417, 1992.
- Hoddle, M. S. Restoring balance: using exotic species to control invasive exotic species. *Conservation Biology*, 18(1), 38-49, 2004.
- Holmes, A., Govan, J., Goldstein, R. Agricultural use of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*: a threat to human health? *Emerg Infect Dis* 4:221–227, 1998.
- Hountondji, F. C. C., Yaninek, J. S., De Moraes, G. J., Oduor, G. I. Host specificity of the cassava green mite pathogen *Neozygites floridana*. *BioControl*, 47(1), 61-66, 2002.
- Iwamoto, T., Nasu, M. Current Bioremediation Practice and Perspective. *J. Biosci. Bioeng*, 92: 1-8, 2001.

- Jacobs, D. F. Toward development of silvical strategies for forest restoration of American chestnut (*Castanea dentata*) using blight-resistant hybrids. *Biological Conservation*, 137(4), 497-506, 2007.
- Jetter, K., Klonsky, K., Pickett, C. H. A cost/benefit analysis of the ash whitefly biological control program in California. *Journal of Arboriculture*, 23, 65-72, 1997.
- Jianlong, W., Yi, Q. Degradação microbiana de 4-clorofenol por microrganismos aprisionados em géis de carragenina-quitosana. *Chemosphere*, 38 (13), 3109-3117, 1999.
- Johnson, K. B. Dose-response relationships and inundative biological control. *Phytopathology*, 84(8), 780-784, 1994.
- Jones, J. B., Jackson, L. E., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F. B., Momol, M. T. Bacteriophages for plant disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 245-262, 2007.
- Jones, J. B., Vallad, G. E., Iriarte, F. B., Obradović, A., Wernsing, M. H., Jackson, L. E., Momol, M. T. Considerations for using bacteriophages for plant disease control. *Bacteriophage*, 2(4), e23857, 2012.
- Jyot, J., Mishra, S., Kuhad, R. C., Lal, B. In situ bioremediation potential of an oily sudge-degrading bacterial consortium. *Current Microbiology*, 43, 328–335, 2001.
- Jung, B. K., Hong, S. J., Park, G. S., Kim, M. C., Shin, J. H. Isolation of *Burkholderia cepacia* JBK9 with plant growth-promoting activity while producing pyrrolnitrin antagonistic to plant fungal diseases. *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 173-180, 2018.
- Jurys, A. et al. Review of Creosote Pollution Toxicity and Possibilities of Bioremediation. *Vide Tehnoloģija. Resursi (Latvia)*, 2013.
- Kanally, R. A., Harayama, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182, 2059-2067, 2000.
- Kenis, M., Hurley, B. P., Colombari, F., Lawson, S., Sun, J., Wilcken, C., Weeks, R. and Sathyapala, S. Guide to the classical biological control of insect pests in planted and natural forests, *FAO Forestry Paper No. 182*. Rome, FAO, 2019.
- Kent, A. D., Triplett, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review in Microbiology* 56, 211–236, 2002.
- Koedrith, P., Thasiphu, T., Weon, J. I., Boonprasert, R., Tuitemwong, K., Tuitemwong, P. (2015). Recent trends in rapid environmental monitoring of pathogens and toxicants: potential of nanoparticle-based biosensor and applications. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Krasaekoopt, W., Bhesh, Bhandari, & Deeth, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14(8), 737–743, 2004.
- Kumar, A., Bisht, B. S., Joshi, V. D., Dhewa, T. Review on bioremediation of polluted environment: A management tool. *International journal of environmental sciences*, 1(6), 1079, 2011.
- Lasken, R.S. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 631–640, 2012.

- Latge, J. P., Paris, S. The fungal spore reservoir of allergens. In "The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals" (G. T. Cole and H. C. Hoch, Eds.), pp. 379–401. Plenum Press, New York, 1991.
- Lee, D., Choi, K. S., Kim, D., Park, S., Kim, W., Jang, K. J., Lim, K. T., Chung, J. H., Seonwoo, H., Kim, J. Iron Oxide Nanoparticle-incorporated Alginate Capsules as Magnetic Field-assisted Potential Delivery Platforms for Agriculture Pesticides and Biocontrol Agents. *Journal of Biosystems Engineering*. 2(4): 323-9, 2017.
- Lendvay, J. M., Loffler, F. E., Dollhopf, M., Aiello, M. R., Daniels, G., Fathepure, B. Z., Gebhard, M., Heine, R., Helton, R., Shi, J., Krajmalnik-Brown, R., Major, C. L., Jr., Barcelona, M. J., Petrovskis, E., Hickey, R., Tiedje, J. M., Adriaens, P. Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation, *Environ. Sci. Technol.* 37, 1422, 2003.
- Lewis, J. A. Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In *The rhizosphere and plant growth* (pp. 279-287). Springer, Dordrecht, 1991.
- Li, Q., Logan, B. E. Enhancing bacterial transport for bioaugmentation of aquifers using low ionic strength solutions and surfactants, *Water Res.* 33, 1090, 1999.
- Li, B., Li, X., Dong, Y., Wang, B., Li, D., Shi, Y., Wu, Y. Colorimetric sensor array based on gold nanoparticles with diverse surface charges for microorganisms identification. *Analytical chemistry*, 89(20), 10639-10643, 2017.
- Li, L., Goel, R. Biodegradation of naphthalene, benzene, toluene, ethyl benzene, and xylene in batch and membrane bioreactors. *Environmental Engineering Science*, v. 29, n. 1, p. 42-51, 2012.
- Lin, J. E., Wang, H. Y. Degradation of pentachlorophenol by non-immobilized, immobilized and co-immobilized *Arthrobacter* cells. *Journal of fermentation and bioengineering*, 72(4), 311-314, 1991.
- LiPuma, J. J., Mahenthiralingam, E. Commercial use of *Burkholderia cepacia*. *Emerging infectious diseases*, 5(2), 305, 1999.
- Litchman, E. Invisible invaders: non- pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 13(12), 1560-1572, 2010.
- Liu, W. T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. *Journal of bioscience and bioengineering*, 102(1), 1-7, 2006.
- Logares, R., Haverkamp, T. H., Kumar, S., Lanzén, A., Nederbragt, A.J., Quince, C., Kausrud, H., Environmental microbiology through the lens of high throughput DNA sequencing: synopsis of current platforms and bioinformatics approaches. *J. Microbiol. Methods* 91, 106–113, 2012.
- Lorch, H. J., Benckieser, G., Ottow, J. C. G. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: Alef K, Nannipieri P (Eds). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, pp. 146-161, Academic Press, Great Britain, 1995.
- Lors, C., Ryngaert, A., Périé, F., Diels, L., Damidot, D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, 81(10), 1263-1271, 2010.

- Lors, C., Damidot, D., Ponge, J-F.; Périé, F. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution*, v. 165, p. 11-17, 2012.
- Lovley, D. L. Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Publishing Group*, v. 1, 2003.
- Lu, J. W., Zhu, Y. L., Guo, Z. X., Hu, P., Yu, J. Electrospinning of sodium alginate with poly (ethylene oxide). *Polymer*, 47(23), 8026-8031, 2006.
- Marbuah, G., Gren, I. M., McKie, B. Economics of harmful invasive species: a review. *Diversity*, 6(3), 500-523, 2014.
- Madueño, L., Coppotelli, B. M, Alvarez, H. M; Morelli, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias indígenas do solo para bioaugmentação de solos contaminados com HAP da Patagônia semiárida, Argentina. *International biodeterioration & biodegradation*, 65 (2), 345-351, 2011.
- Mahmoudi, N., Slater, G. F., Juhsz, A. L. Assessing Limitations for PAH Biodegradation in Long-Term Contaminated Soils Using Bioaccessibility Assays. *Water air and soil pollution*, v. 224. p. 1411, 2013.
- March, J. C., Rao, G., Bentley, W. E. Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Applied microbiology and biotechnology*. 62(4):303-15, 2003.
- Marchesi, J. R., Ravel, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.
- Mariano, A. P., Kataoka, A. P. D. A. G., Angelis, D. D. F. D., Bonotto, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 346-353, 2007.
- Mariano, A. P., Bonotto, D. M., Angelis, D. D. F. D., Piróllo, M. P. S., Contreiro, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 133-142, 2008.
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fiúza, L. M. C. G., Santaella, S. T. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African journal of biotechnology*, 12(28), 2013.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental microbiology*, 10(6), 1571-1581, 2008.
- McColl, K. A., Sunarto, A., Holmes, E. C. Cyprinid herpesvirus 3 and its evolutionary future as a biological control agent for carp in Australia. *Virology journal*, 13(1), 2016.
- McLoughlin, A. J. Controlled release of immobilized cells as a strategy to regulate ecological competence of inocula. In: Scheper T (ed) *Biotechnics/wastewater*. Springer, Berlin, pp 1–45, 1994.
- Meyerson, L. A., Reaser, J. K. Bioinvasions, bioterrorism, and biosecurity. *Frontiers in Ecology and the Environment*. 1(6):307-14, 2003.

- Milgroom, M. G., Cortesi, P. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu. Rev. Phytopathol*, 42, 311-338, 2004.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. C., Lal, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1675–1681, 2000.
- Moran, M. A. Metatranscriptomics: eavesdropping on complex microbial communities. *Issues*, 2010.
- Moslemy, P., Neufeld, R. J., Guiot, S. R Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. *Biotechnol Bioeng* 80:175–184, 2002.
- Mukherjee, A., Chattopadhyay, D. Exploring environmental systems and processes through next-generation *sequencing technologies: insights into microbial response to petroleum contamination in key environments*. *The Nucleus*, 60(2), 175-186, 2017.
- Mulligan, C. N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198, 2005.
- Muyzer, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol*, 2: 317–322, 1999.
- Muyzer, G., Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127–141, 1998.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Ulterlinden, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16s rRNA. *Appl. Environ. Microbiol*, 59: 695-700, 1993.
- Myrold, D. D., Zeglin, L. H., Jansson, J. K. The potential of metagenomic approaches for understanding soil microbial processes. *Soil Science Society of America Journal*, v. 78(1), p. 3-10, 2013.
- 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.
- Natara, J., Arun, J., et al. Single- strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel- based mutation detection. *Electrophoresis: An International Journal*, 20.6: 1177-1185, 1999.
- NRC - National Research Council. *In situ bioremediation: When does it work?* National Academies Press; 1993.
- Newby, D.T., Gentry, T.J., Pepper, I.L. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3399, 2000.
- Nocker, A., Burr, M., Camper, A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol*, 54: 276-289, 2007.

- Nordblom, T. L., Smyth, M. J., Swirepik, A., Sheppard, A. W., Briese, D. T. Benefit-cost analysis for biological control of *Echium* weed species (Paterson's curse/Salvation Jane) (No. 412-2016-25884), 2001.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., Hase, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids. Res.* 28, E63, 2000.
- Nwankwegu, A. S., Onwosi, C. O. Microbial cell immobilization: a renaissance to bioaugmentation inadequacies. A review. *Environmental Technology Reviews*, 6(1), 186-198, 2017.
- O'Callaghan, M., Brownbridge, M. Environmental impacts of microbial control agents used for control of invasive pests. In *Use of Microbes for Control and Eradication of Invasive Arthropods* (pp. 305-327). Springer, Dordrecht, 2009.
- OECD. (2014). Report of the oecd/kemi/eu workshop on microbial pesticides: assessment and management of risks. Disponível em [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)2&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)2&doclanguage=en) Acesso em 03 de Novembro de 2019.
- OECD (2016). Bacteria: Pathogenicity factors in Safety assessment of transgenic organisms: oecd consensus documents, volume 5 <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264253018-4-en.pdf?expires=1570890668&id=id&acname=guest&checksum=CF3A345AC25516FF094E418E81DAD168> Acesso em 01 de Novembro de 2019.
- Ogbulie, T. E., Nwigwe, H. C., Okpokwasili, G. C., Iwuala, M. O. E. Comparative study on the effect of symbiotic interaction between plants and non-indigenous isolates on crude oil remediation. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, 18(1), 2011.
- Okerentugba, P. O.; Ezeronye, O. U. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 288-292, 2003.
- Paine, T. D., Millar, J. G., Hanks, L. M., Gould, J., Wang, Q., Daane, K., ... & McPherson, E. G. Cost-benefit analysis for biological control programs that targeted insect pests of eucalypts in urban landscapes of California. *Journal of economic entomology*, 108(6), 2497-2504, 2015.
- Pannu, J. K., Singh, A., Ward, O. P. Vegetable oil as a contaminated soil remediation amendment: application of peanut oil for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Process Biochemistry*, v.39, p. 1211-1216, 2004.
- Parikh, L., Adesemoye, A. O. Impact of delivery method on the efficacy of biological control agents and the virulence of *Fusarium* root rot pathogens in the greenhouse. *Biocontrol science and technology*. 28(12):1191-202, 2018.
- Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, Simmonds, C., O'Connell, C., Wong, E., Russel, L., Zern, J., Aquino, T., Tsomondo, T. Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 84, n. 1, p. 1-20, 2001/03/01/2001.
- Pickett, B., Maltz, M., Aronson, E. Impacts of Invasive Plants on Soil Fungi and Implications for Restoration. In *Invasive Species*. IntechOpen, 2018.
- Pyšek, P., Richardson, D. M. Espécies invasoras, mudanças e manejo ambiental e saúde. *Revisão anual de meio ambiente e recursos*, 35, 25-55, 2010.

- Ranjar, L., Nazaret, S., Gourbiere, F., Thioulouse, J., Linet, P., Richaume, A. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *Microbiol. Ecol*, 31: 107–115, 2000.
- Rocchetti, L., Beolchini, F., Ciani, M., Dell'Anno, A. Improvement of bioremediation performance for the degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sediments. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011.
- Rodrigues, J. L. M., Aiello, M. R., Urbance, J. W., Tsoi, T. V., Tiedje, J. M. Use of both 16S rRNA and engineered functional genes with real-time PCR to quantify an engineered, PCB-degrading *Rhodococcus* in soil, *J. Microbiol. Methods* 51, 181, 2002.
- Sá, L. A. N. D., Pessoa, M. C. P. Y., Moraes, G. J. D., Marinho-Prado, J. S., Prado, S. D. S., Vasconcelos, R. M. D. Quarantine facilities and legal issues of the use of biocontrol agents in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51(5), 502-509, 2016.
- Saikia, R. R., Deka, S., Deka, M., Banat, I. M. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals of Microbiology*, v. 62, p. 753–763, 2012.
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M. R., Ishaque, W., Kamran, M. A., Matloob, A., ... & Hussain, S. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710-721, 2017.
- Satyanarayana, T., Raghukumar, C., Shivaji, S. Micróbios extremofílicos: diversidade e perspectivas. *Ciência atual*, 78-90, 2005.
- Sayler, G. S., Ripp, S. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current opinion in biotechnology*. 11(3):286-9, 2000.
- Schoss, P. D., Handelsman, J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*, v. 14(3), p. 303-310, 2003.
- Seabra, P. N., Linhares, M. M., Santa Anna, L. M. Laboratory study of crude oil remediation by bioaugmentation. Paper presented at the Fifth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, San Diego, California, 1997.
- Semprini, L. In situ bioremediation of chlorinated solvents. *Environmental Health Perspectives*. 103(suppl 5):101-5, 1995.
- Shan, G., Xing, J., Zhang, H., Liu, H. Biodesulfurization of dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(8), 4497-4502, 2005.
- Shimizu, M., Kimura, T., Koyama, T., Suzuki, K., Ogawa, N., Miyashita, K., Sakka, K., Ohmiya, K. Molecular breeding of transgenic rice plants expressing a bacterial chlorocatechol dioxygenase gene, *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4061, 2002.
- Sierra-Garcia, I. N., Alvarez, J. C., DE Vasconcelos, 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.
- Silva, J., Carvalho, A. S., Teixeira, P., & Gibbs, P. A. Bacteriocin production by spray- dried lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), 77-81, 2002.

- Silva Lannes, S. C., Medeiros, M. L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39(1), 115-123, 2003.
- Simarro, R., González, N., Bautista, L. F., Molina, M. C. Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil: Change in bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, v. 262, p. 158-167, 2013.
- Simon, C., Daniel, R. Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and environmental microbiology*, v. 77(4), p. 1153-1161, 2011.
- Singh, A. K., Senapati, D., Wang, S., Griffin, J., Neely, A., Candice, P., Naylor, K. M., Varisli, B., Kalluri, J. R., Ray, P. C. Gold nanorod based selective identification of *Escherichia coli* bacteria using two-photon Rayleigh scattering spectroscopy. *ACS nano*. 3(7):1906-12, 2009.
- Sinski, J. T. In "The Epidemiology of Human Mycotic Diseases" (Yosef Al-Doory, Ed.), pp. 210–226. Charles C. Thomas Publisher, 1975.
- Soman, C., LI, D., Wander, M. M., Kent, A. D. Long-term fertilizer and crop-rotation treatments differentially affect soil bacterial community structure. *Plant and soil*, 413(1-2), 145-159, 2017.
- Streger, S. H., Vainberg, S., Dong, H., Hatzinger, P. B. Enhancing transport of *Hydrogenophaga flava* ENV735 for bioaugmentation of aquifers contaminated with methyl tert-butyl ether. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(11), 5571-5579, 2002.
- Suppi, S., Kasemets, K., Ivask, A., Kuennis-Beres, K., Sihtmae, M., Kurvet, I., Aruoja, V., Kahru, A., A novel method for comparison of biocidal properties of nanomaterials to bacteria, yeasts and algae. *J. Hazard. Mater.* 286, 75e84, 2015.
- Sutherst, R.W., Maywald, G.F. A computerised system for matching climates in ecology. *Agric. Ecosyst. Environ.* 13, 281–299, 1985.
- Tankéré, S. P. C., Bourne, D. G., Muller, F. L. L., Torsvik, V. Microenvironments and microbial community structure in sediments. *Environmental Microbiology*, 4(2), 97-105, 2002.
- Temprano, F. J., Albareda, M., Camacho, M., Daza, A., Santamaria, C., Rodriguez-Navarro, D. N. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds, *Int. Microbiol.* 5, 81, 2002.
- Thiet, R. K., Boerner, R. E. J. Spatial patterns of ectomycorrhizal fungal inoculum in arbuscular mycorrhizal barrens communities: implications for controlling invasion by *Pinus virginiana*. *Mycorrhiza*, 17:507–517, 2007.
- Thomas, C. M., Nielsen, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711, 2005.
- Tiehm A., Müller A., Alt S., Jacob H., Schad H. Weingran C. Development of a groundwater biobarrier for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons, BTEX, and heterocyclic hydrocarbons, *Water Science and Technology*, 58,1349–1355, 2008.
- Tomasetto, F., Tylianakis, J. M., Reale, M., Wratten, S., Goldson, S. L. Intensified agriculture favors evolved resistance to biological control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(15), 3885-3890, 2017.

- Tomley, A. J., Evans, H. C. Establishment of, and preliminary impact studies on, the rust, *Maravalia cryptostegiae*, of the invasive alien weed, *Cryptostegia grandiflora* in Queensland, Australia. *Plant Pathology*, 53(4), 475-484, 2004.
- Torres, B., Garcia, J., Diaz, E. Plasmids as tools for containment. In: Funnell B, Phillips G (eds) *Plasmid biology* ASM, Washington, pp 589–601, 2003.
- Torsvik, V., Daae, F. L., Sandaa, R. A., ØVREÅS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of biotechnology*, 64(1), 53-62, 1998.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., de Carvalho, C. C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241, 2011.
- Upadhyay, S., Sinha, A. Role of microorganisms in Permeable Reactive Bio-Barriers (PRBBs) for environmental clean-up: A review. *Global nest journal*, 20(2), 269-280, 2018.
- U. S. Fish and Wildlife Service. Diapónível em <https://www.fws.gov/>. Acesso em 20/10/2019.
- Usta, C. Microorganisms in biological pest control—a review (bacterial toxin application and effect of environmental factors). *Current progress in biological research*, 287-317, 2013.
- Van der Gast, C. J., Whiteley, A. S., Starkey, M., Knowles, C. J., Thompson, I. P. Bioaugmentation strategies for remediating mixed chemical effluents, *Biotechnol. Prog.* 19, 1156, 2003.
- Van Dyke, M. I., Prosser, J. I. Enhanced survival of *Pseudomonas fluorescens* in soil following establishment of inoculum in a sterile soil carrier, *Soil Biol. Biochem.* 32, 1377, 2000.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 503-549, 2003.
- Van Lenteren, J. C., Bale, J., Bigler, F., Hokkanen, H. M., Loomans, A. J. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Annu. Rev. Entomol.* 51:609-34, 2006.
- Van Lenteren, J. C., Loomans, A. J. M., Babendreier, D., Bigler, F. *Harmonia axyridis*: an environmental risk assessment for Northwest Europe. *BioControl* 53:37–54, 2008.
- Van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., Urbaneja, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63(1), 39-59, 2018.
- Van Veen, J. A., van Overbeek, L.S., van Elsas, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 121, 1997.
- Venette, R. C., Cohen, S. D. Potential climatic suitability for establishment of *Phytophthora ramorum* within the contiguous United States. *Forest Ecology and Management*, 231(1-3), 18-26, 2006.
- Venosa, A. D. Oil spill bioremediation on coastal shorelines: a critique. *Bioremediation: principles and practice*, 3, 259-301, 1998.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Smith, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, v. 304(5667), p. 66-74, 2004.

- Waage, J. K. Yes, but does it work in the field? The challenge of technology transfer in biological control. *Entomophaga*, v.41, p.315-332, 1996. DOI: 10.1007/BF02765787.
- Wackett, L. P., Ellis, L. B. Predicting biodegradation. *Environmental Microbiology*, 1(2), 119-124, 1999.
- Wang, C. C., Lee, M. L., Kuan, C. H. Removal of 2,4-dichlorophenol by suspended and immobilized *Bacillus insolitus*. *Chemosphere*. v.41, p.447-452. 2000.
- Wang, G., Gentry, T.J., Grass, G., Josephson, K., Rensing, C., Pepper, I.L. Real-time PCR quantification of a GFP-labeled, genetically engineered *Pseudomonas putida* strain during 2-chlorobenzoate degradation in soil, *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 307, 2004.
- Wang, L., Zhao, W., O'Donoghue, M. B., Tan, W. Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring. *Bioconjugate chemistry*. 18(2):297-301, 2007.
- Wakase, S., Sasaki, H., Itoh, K., Otawa, K., Kitazume, O., Nonaka, J., Satoh, M., Sasaki, T., Nakai, Y. Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process. *Biores. Technol*, 99: 2687–2693, 2007.
- Whipps, J. M., Lumsden, R. D. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: status and prospects. *Fungal biocontrol agents: progress, problems and potential*, 9-22, 2001.
- White, T. A., Gerard, P. J. Modelling the farm scale impacts of clover root weevil herbivory. *New Zealand Plant Protection* 59:312-316, 2006.
- Whiteley, A. S., Jenkins, S., Waite, I., Kresoje, N., Payne, H., Mullan, B., O'donnelli, A. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal of microbiological methods*, v. 91(1), p. 80-88, 2012.
- Winding, A., Binnerup, S. J., Pritchard, H. Non-target effects of bacterial biological control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(2), 129-141, 2004.
- Windt, W., Aelterman, P., Verstraete, W. “Bioreductive deposition of palladium (0) nanoparticles on *Shewanella oneidensis* with catalytic activity towards reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls,” *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 3, pp. 314–325, 2005.
- Witt, M. E., Dybas, M. J., Worden, R. M., Criddle, C. S. Motility-enhanced bioremediation of carbon tetrachloride-contaminated aquifer sediments, *Environ. Sci. Technol.* 33, 2958, 1999.
- Wkhan, A. A., Wang, R. F., Cao, W. W., Doerge, D. R., Wennerstrom, D., Cerniglia, C. E/. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes 184 encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium sp.* strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3577-3585, 2001.
- Yang, S., Wen, X., Shi, Y.; Liebner, S., J. I. N, H., Perfumo, A. Hydrocarbon degraders establish at the costs of microbial richness, abundance and keystone taxa after crude oil contamination in permafrost environments. *Scientific Reports*, 6, 2016.
- York, G. W. Field tests with the fungus *Beauveria sp.* for the control of the European corn borer. *Iowa State College J. Sci.* 33, 123–129, 1958.

Yu, Z., Mohn, W. W. Bioaugmentação com a bactéria *Zoogloea resiniphila* DhA-35, degradadora de ácidos da resina, para combater o estresse de pH em uma lagoa aerada que trata efluentes de celulose e fábricas de papel. *Water research*, 36 (11), 2793-2801, 2002.

Zhang, T., Fang, H. H. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 281-289, 2006.

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., Chen, Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiological research*, 169(1), 76-82, 2014.