



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL GOIANO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
CENTRO DE EXCELÊNCIA EM BIOINSUMOS
COORDENAÇÃO DE CAPACITAÇÃO EM BIOINSUMOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *lato sensu* EM BIOINSUMOS
IF GOIANO CAMPUS URUTAÍ

**Modulação da microbiota do solo por bioestimulante associado à
adubação mineral: uma abordagem por metabarcoding de 16S rRNA e
ITS**

Walter Baida Garcia Coutinho

Eng. Agrônomo

URUTAÍ – GOIÁS

2026

Walter Baida Garcia Coutinho

Modulação da microbiota do solo por bioestimulante associado à adubação mineral: uma abordagem por metabarcoding de 16S rRNA e ITS

Orientador: Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Pós-graduação *Lato Sensu* em Bioinsumos como requisito para obtenção do título de Especialista.

URUTAÍ – GOIÁS

2026

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema Integrado de Bibliotecas do IF Goiano - SIBi**

C871	Baida Garcia Coutinho, Walter Modulação da microbiota do solo por bioestimulante associado à adubação mineral: uma abordagem por metabarcoding de 16S rRNA e ITS / Walter Baida Garcia Coutinho. Urutai 2026. 34f. il. Orientador: Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima. Monografia (Especialista) - Instituto Federal Goiano, curso de 0130426 - Especialização em Bioinsumos - Urutai (Campus Urutai). I. Título.
------	--

ANEXO VI - FICHA DE AVALIAÇÃO FINAL DE TRABALHO DE CURSO

Aluno: Walgter Baida Garcia Coutinho

Título: Impactos do uso bioestimulante na diversidade e composição microbiana do solo.

Membro 1 da Banca Examinadora (Presidente/Orientador): Dr. Milton Luiz da Paz Lima (IFGoiano Campus Urutaí)

Coorientador quando houver: Dra. Melina Korres Raimundi (IFGoiano Campus Urutaí)

Membro 2 da Banca Examinadora: Dra. Melina Korres Raimundi (IFGoiano Campus Urutaí)

Membro 3 da Banca Examinadora: Dr. Helson Mario Martins do Vale (Universidade de Brasília)

Itens avaliados	Membro 1	Membro 2	Membro 3	Nota Final*
Nota	10,0	9,6	9,0	9,5

***NOTA FINAL:** A nota final será obtida a partir da média aritmética simples das notas dos membros da banca [(Nota do Examinador 1 + Nota do Examinador 2 + Nota do Examinador 3)/3].

Observações:

 Documento assinado digitalmente
MILTON LUIZ DA PAZ LIMA
Data: 25/03/2026 15:22:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

 Documento assinado digitalmente
MELINA KORRES RAIMUNDI
Data: 25/03/2026 17:15:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

 Documento assinado digitalmente
MELINA KORRES RAIMUNDI
Data: 25/03/2026 17:13:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Assinado eletronicamente)
Dr. Milton Luiz da Paz Lima
Membro 1 da Banca Examinadora (Orientador)

(Assinado eletronicamente)
Dra. Melina Korres Raimundi
Coorientador

(Assinado eletronicamente)
Dra Melina Korres Raimundi
Membro 2 da Banca Examinadora (Interno)

(Assinado eletronicamente)
Dr. Helson Mario Martins do Vale
Membro 3 da Banca Examinadora (Externo)

Regulamento de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) 3 CEBIO/IF Goiano

ANEXO V - ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CURSO

Aos 20 dias do mês de março de dois mil e vinte e seis, às 16:00 horas, reuniram-se a Banca Examinadora composta por: Prof. Dr. Milton Luiz da Paz Lima (orientador), Prof. Dra. Melina Korres Raimundi (membro interno; IFGoiano campus Urutaí) e Prof. Dr. Helson Mario Martins do Vale (externo; Universidade de Brasília), para examinar o Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "**Impactos do uso bioestimulante na diversidade e composição microbiana do solo**" do Walter Baida Garcia Coutinho, estudante do curso de Especialização Latu Sensu de Bioinsumos do IF Goiano – Campus Urutaí, sob matrícula nº **2024101304260014**. A palavra foi concedida ao estudante para a apresentação oral do TC, em seguida houve arguição do candidato pelos membros da Banca Examinadora. Após tal etapa, a Banca Examinadora decidiu pela APROVAÇÃO do(a) estudante. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata, que, após apresentação da versão corrigida do TC, foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Campus Urutaí, 19 de setembro de 2025.

(Assinado eletronicamente)
Dr. Milton Luiz da Paz Lima
Membro 1 da Banca Examinadora (Orientador)



Documento assinado digitalmente
MILTON LUIZ DA PAZ LIMA
Data: 25/03/2026 18:00:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Assinado eletronicamente)
Dra. Melina Korres Raimundi
Coorientador



Documento assinado digitalmente
MELINA KORRES RAIMUNDI
Data: 21/03/2026 09:27:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Assinado eletronicamente)
Dra Melina Korres Raimundi
Membro 2 da Banca Examinadora (Interno)



Documento assinado digitalmente
MELINA KORRES RAIMUNDI
Data: 21/03/2026 09:11:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

(Assinado eletronicamente)
Dr. Helson Mario Martins do Vale
Membro 3 da Banca Examinadora (Externo)



Documento assinado digitalmente
HELSON MARIO MARTINS DO VALE
Data: 20/03/2026 17:15:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Observação:

Para o caso de REAPRESENTAÇÃO, tem-se no trecho final da Ata a seguinte redação:

<Após tal etapa, a Banca Examinadora decidiu pela REAPRESENTAÇÃO do TCC. Desta forma, o estudante deve realizar correções e adequações no trabalho e apresentá-lo novamente em até 20 dias, contados a partir de hoje (19/09/2015). Nesta nova oportunidade, após avaliação da banca examinadora, o estudante poderá ser APROVADO ou REPROVADO, não havendo possibilidade de outra reapresentação. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que foi assinada pelos membros da Banca Examinadora e Responsável TCC.= Para o caso de REPROVAÇÃO, tem-se no trecho final da Ata a seguinte redação:

<Após tal etapa, a Banca Examinadora decidiu pela REPROVAÇÃO do(a) estudante. Desta forma, o estudante deverá realizar o desenvolvimento e defesa de novo TCC no próximo semestre. Ao final da sessão pública de defesa foi lavrada a presente ata que foi assinada pelos membros da Banca Examinadora e Responsável de TCC>

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO

PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

Tese (doutorado)

Dissertação (mestrado)

Monografia (especialização)

TCC (graduação)

Artigo científico

Capítulo de livro

Livro

Trabalho apresentado em evento

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Matrícula:

Título do trabalho:

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: / /

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

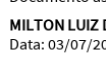
Documento assinado digitalmente
 **WALTER BAIDA GARCIA COUTINHO**
Data: 29/05/2026 17:38:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Local / /
Data

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)

Documento assinado digitalmente
 **MILTON LUIZ DA PAZ LIMA**
Data: 03/07/2026 13:00:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, força e sabedoria para buscar meus objetivos. À minha família, por toda a ajuda, compreensão e incentivo durante toda minha vida.

Ao meu orientador Milton Luiz da Paz Lima que me orientou sempre presente e dispostos a passar suas experiências e conhecimentos, me auxiliando durante a graduação e o mestrado se tornando imprescindível na minha formação acadêmica.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Bioinsumos que se mostraram prestativos e dispostos a transmitir seus conhecimentos colaborando na formação de muitos profissionais.

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí instituição está que fez parte de todo meu processo de formação, onde fiz muitos amigos e conheci pessoas que com toda certeza me ensinaram muito e levarei para sempre seus ensinamentos. E ao CEBIO, pelo suporte técnico e acadêmico ao longo do curso.

E a todos aqueles que de forma direta e indireta colaboraram na minha formação, o meu muito obrigado e que Deus abençoe imensamente cada um de vocês.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
Montagem Experimental e tratamentos avaliados.....	10
Análise molecular por metabarcoding.....	11
Metodologia estatística.....	12
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	13
CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição dos tratamentos aplicados.	11
Tabela 2. Índices de diversidade (Shannon e Simpson) das comunidades fúngicas e bacterianas em diferentes tratamentos de adubação e aplicação de bioinsumo (Vitacomplex®).....	24
Tabela 3. Valores de rarefação alfa das comunidades fúngicas e bacterianas, ajustados ao número de sequências por amostra, em diferentes tratamentos de adubação e aplicação de bioinsumo (Vitacomplex®).	25

Lista de Figuras

Figura 1. Dendrograma hierárquico do metabarcoding fúngico.	15
Figura 2. Gêneros fúngicos mais abundantes em cada tratamento experimental.....	16
Figura 3. Heatmap dos gêneros fúngicos mais abundantes em função dos tratamentos.....	18
Figura 4. Dendrograma hierárquico da metabarcoding bacteriana.	20
Figura 5. Gêneros bacterianos mais abundantes em cada tratamento experimental.	22
Figura 6. Heatmap dos gêneros bacterianos mais abundantes em função dos tratamentos.	23

Modulação da microbiota do solo por bioestimulante associado à adubação mineral:
uma abordagem por metabarcoding de 16S rRNA e ITS

Resumo

A aplicação de bioestimulantes tem sido apontada como estratégia promissora para modular a microbiota do solo e aumentar a resiliência de sistemas agrícolas. Este estudo avaliou o efeito da adubação mineral (0, 50 % e 100 % da recomendação) e do bioestimulante Vitacomplex[®] sobre a estrutura e diversidade de comunidades fúngicas e bacterianas do solo em experimento conduzido em casa de vegetação. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições (40 unidades experimentais), combinando níveis de adubação mineral com a presença/ausência de Vitacomplex[®]. A amostragem do solo foi realizada aos 90 dias após a semeadura (DAS) para caracterização molecular das comunidades microbianas por sequenciamento, seguida de análises de abundância relativa, agrupamento hierárquico/heatmaps e métricas de diversidade alfa (riqueza, Shannon e Simpson). Os resultados indicaram predominância da comunidade fúngica pertencente às divisões Ascomycota e Basidiomycota e aumento de táxons com potencial benéfico nos tratamentos com Vitacomplex[®] (ex.: *Trichoderma* sp., *Chaetomium* sp. e *Clonostachys* sp.), enquanto a testemunha apresentou maior proporção de gêneros associados a serem agentes causais de doenças (ex.: *Fusarium* sp. e *Alternaria* sp.). Para bactérias, observou-se as divisões predominantes como Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, com enriquecimento de gêneros funcionais nos tratamentos com Vitacomplex[®] (ex.: *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp. e *Rhizobium* sp.). A maior riqueza microbiana (fungos e bactérias) foi observada no tratamento 50 % de adubação + Vitacomplex[®], sugerindo que a redução parcial de fertilizante mineral, quando associada ao bioestimulante, pode favorecer a diversidade taxonômica da microbiota do solo, com maior presença relativa de táxons associados, na literatura, a funções ecológicas relevantes.

Palavras-chaves: microbiota do solo; adubação mineral; diversidade alfa; ITS; 16S rDNA; Vitacomplex[®].

Modulation of soil microbiota by a biostimulant associated with mineral fertilization: a 16S rRNA and ITS metabarcoding approach

Abstract

The application of biostimulants has been highlighted as a promising strategy to modulate soil microbiota and increase the resilience of agricultural systems. This study evaluated the effects of mineral fertilization (0, 50 %, and 100 % of the recommended rate) and the biostimulant Vitacomplex® on the structure and diversity of soil fungal and bacterial communities in a greenhouse experiment. A completely randomized design was used, with five treatments and eight replicates (40 experimental units), combining mineral fertilization levels with the presence/absence of Vitacomplex®. Soil sampling was performed at 90 days after sowing (DAS) for molecular characterization of microbial communities by DNA sequencing targeting the bacterial 16S rDNA and fungal ITS regions, followed by relative abundance analyses, hierarchical clustering/heatmaps, and alfa-diversity metrics (richness, Shannon, and Simpson). The results indicated dominance of Ascomycota and Basidiomycota in the fungal community and an increase in potentially beneficial taxa in the Vitacomplex® treatments (e.g., *Trichoderma* sp., *Chaetomium* sp., and *Clonostachys* sp.), whereas the control showed a higher proportion of genera associated with potential phytopathogenicity (e.g., *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp.). For bacteria, predominant division included Proteobacteria, Actinobacteria, and Firmicutes, with enrichment of functional genera in the Vitacomplex® treatments (e.g., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp., and *Rhizobium* sp.). The highest microbial richness (fungi and bacteria) was observed in the 50 % fertilization + Vitacomplex® treatment, suggesting that partial reduction of mineral fertilizer, when associated with the biostimulant, may favor the taxonomic diversity of the soil microbiota, with greater relative abundance of taxa associated with relevant ecological functions.

Keywords: soil microbiome; mineral fertilization; alfa diversity; ITS; 16S rDNA; Vitacomplex®.

INTRODUÇÃO

A intensificação dos sistemas agrícolas nas últimas décadas, embora tenha promovido avanços significativos na produção de alimentos, tem sido acompanhada por impactos ambientais severos, como a degradação da estrutura e da biodiversidade do solo, redução da fertilidade natural e crescente dependência de insumos químicos sintéticos (Wadduwage et al., 2023).

Nesse contexto, os insumos biológicos, especialmente os bioestimulantes, emergem como alternativas promissoras para a transição rumo a sistemas produtivos mais resilientes e ambientalmente sustentáveis (Yakhin et al., 2017; Abbott et al., 2018).

Os bioestimulantes vegetais podem ser compreendidos como substâncias, microrganismos ou misturas aplicadas às plantas, sementes ou ao solo com a finalidade de estimular processos naturais relacionados à eficiência no uso de nutrientes, tolerância a estresses abióticos, desenvolvimento vegetal e qualidade da produção, independentemente de seu conteúdo nutricional direto (du Jardin, 2015; Yakhin et al., 2017).

Nesse sentido, o efeito bioestimulante não depende necessariamente da presença de microrganismos vivos no produto, mas da capacidade de seus componentes estimularem respostas fisiológicas, bioquímicas ou ecológicas no sistema planta-solo (Visioli et al., 2018).

Apesar do amplo potencial agronômico, a eficácia dos bioestimulantes pode variar substancialmente em função da formulação, das condições ambientais e das propriedades físico-químicas do solo, o que dificulta a extrapolação de seus efeitos (Mickan et al., 2021). Enquanto diversos estudos relatam benefícios consistentes sobre o crescimento vegetal, estrutura da microbiota e qualidade do solo (Hellequin et al., 2018; Macías-Benítez et al., 2020), outros não observam alterações significativas, evidenciando a complexidade das interações entre compostos bioativos e a comunidade microbiana.

Para elucidar essa complexidade, metodologias de alta resolução, como o sequenciamento metagenômico, têm sido empregadas com o objetivo de caracterizar as

respostas taxonômicas e funcionais da microbiota do solo após a aplicação de bioestimulantes (Maffia et al., 2024; Imam et al., 2021). Tais abordagens vêm revelando mudanças expressivas na abundância e diversidade de grupos microbianos funcionais, como *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, associados à decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e promoção do crescimento vegetal.

Bioestimulantes à base de extratos de algas, ácidos orgânicos ou consórcios microbianos têm demonstrado a capacidade de modificar rapidamente a estrutura da comunidade microbiana do solo, promovendo o recrutamento seletivo de decompositores e microrganismos benéficos às plantas (Hellequin et al., 2020; Berihu et al., 2023). Esses efeitos podem ocorrer mesmo em curto prazo, como observado por Hellequin et al. (2018), que relataram aumento na atividade microbiana e mineralização do carbono em solos tratados com resíduos culturais, sem mudanças significativas na biomassa total.

A resposta aos bioestimulantes também está condicionada a fatores como pH, umidade, tipo de cultura, profundidade do solo e histórico de manejo, os quais modulam a estrutura e atividade da microbiota edáfica (Wadduwage et al., 2023; Visioli et al., 2018). A presença de resíduos vegetais, por exemplo, pode potencializar os efeitos dos bioestimulantes ao fornecer substratos adicionais à microbiota estimulada (Hellequin et al., 2020).

Além dos efeitos biológicos, estudos recentes também relataram alterações em atributos físico-químicos do solo decorrentes do uso de bioestimulantes. Wadduwage et al. (2023) verificaram aumento na respiração microbiana e em atividades enzimáticas relacionadas ao ciclo do nitrogênio após a aplicação de compostos orgânicos em solos sob pastagens e trigo, evidenciando efeitos sistêmicos que transcendem o nível microbiano.

A aplicação de microrganismos promotores do crescimento vegetal representa uma das estratégias centrais da agricultura regenerativa e de baixa emissão. Tais microrganismos têm sido amplamente estudados por sua capacidade de mobilizar nutrientes, modular a fisiologia vegetal e induzir resistência a estresses bióticos e abióticos (Sarker et al., 2021). No entanto, sua eficácia em condições de campo ainda depende de fatores como formulação, compatibilidade com a microbiota nativa e estabilidade funcional no ambiente edáfico (Tabacchioni et al., 2021).

Diante disso, torna-se essencial compreender os mecanismos pelos quais os bioestimulantes influenciam a estrutura e o funcionamento da comunidade microbiana do solo, especialmente em contextos onde a mineralização da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes são determinantes para o desempenho agrícola. Tal compreensão é fundamental para o desenvolvimento de recomendações técnicas mais precisas, visando à maximização da eficiência agronômica e ecológica desses insumos.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da adubação mineral, em doses integral e reduzida, associada ao bioestimulante Vitacomplex®, sobre a composição taxonômica e a diversidade alfa das comunidades fúngicas e bacteriana do solo sob condições controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Montagem Experimental e tratamentos avaliados

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Urutaí, Goiás, Brasil (latitude:17°29'18.1"S longitude:48°12'53.9"W).

Foi conduzido em casa de vegetação com feijoeiro comum (cv. Pérola) com o objetivo de avaliar os efeitos da aplicação de adubação mineral e bioestimulantes (Vitacomplex®) sobre a estrutura da microbiota, com enfoque na bioprospecção de microrganismos decompositores e promotores de crescimento vegetal.

Para garantir condições controladas, utilizou-se solo previamente autoclavado a 120 °C por 30 minutos sob 1 atm de pressão, a fim de eliminar a microbiota nativa e permitir a observação direta dos efeitos induzidos pelos tratamentos. Após o resfriamento, o solo esterilizado foi transferido para vasos plásticos com volume de 6,28 L.

Deve-se considerar que o uso de solo autoclavado reduziu drasticamente a microbiota nativa e simplificou as interações ecológicas normalmente presentes em condições de campo. Dessa forma, os resultados devem ser interpretados como resposta em ambiente controlado, útil para avaliar tendências de colonização e modulação microbiana, mas não diretamente extrapolável para solos agrícolas não esterilizados. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e oito repetições, totalizando 40 unidades experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição dos tratamentos aplicados.

Tratamento	Descrição
T1	Solo autoclavado (SA) (testemunha sem adubação nem bioestimulante)
T2	Solo autoclavado (SA) + 100 % da recomendação de adubação mineral
T3	Solo autoclavado (SA) + 50 % da recomendação de adubação mineral
T4	Solo autoclavado (SA) + 100% adubação + Vitacomplex [®]
T5	Solo autoclavado (SA) + 50% adubação + Vitacomplex [®]

A adubação mineral foi composta por fontes comerciais puras (atendendo as necessidades do feijoeiro e análise de solo): ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, 45 % de N), superfosfato simples (21 % de P_2O_5) e cloreto de potássio (60 % de K_2O), aplicadas ao redor do leito de semeadura para evitar o contato direto com as sementes. As quantidades aplicadas nos vasos com 100 % de adubação (T2 e T4) foram de 1,4 g de ureia, 11,9 g de superfosfato simples e 2,6 g de cloreto de potássio por vaso. Para os tratamentos com 50 % da dose (T3 e T5), as quantidades foram reduzidas proporcionalmente para 0,7 g, 5,9 g e 1,3 g por vaso, respectivamente.

A aplicação do bioestimulante Vitacomplex[®] foi realizada proporcional à dose de 1 L por ha. A dosagem foi calculada e diluída em água o que permitiu a aplicação uniforme de 1 ml da solução por vaso, utilizando pipeta automática (modelo P1000).

Análise molecular por metabarcoding

As plantas (raízes e parte aérea) de feijoeiro comum foram retiradas e realizou-se a coleta do solo (amostragem composta dos tratamentos) para avaliação complementar e Análise molecular por metabarcoding do solo foi realizada aos 90 dias após a semeadura (DAS), a fim de caracterizar com maior profundidade os efeitos dos tratamentos na composição funcional da microbiota visando identificar alterações na estrutura taxonômica e funcional das comunidades fúngicas e bacterianas sob diferentes combinações de adubação e aplicação de bioestimulante.

A Análise molecular por metabarcoding de bactérias e fungos do solo inicia-se com a coleta de amostras representativas dos vasos de 3,6 litros (misturados e coletados 200 g para análise por tratamento), sendo que foi estabelecido o uso de ferramentas esterilizadas para evitar contaminações. As amostras foram armazenadas sob refrigeração

até o processamento, garantindo a integridade do material biológico. Em seguida, realizou-se a extração do DNA total do solo, utilizando kits específicos ou protocolos que combinam lise mecânica e química, permitindo recuperar o material genético de toda a comunidade microbiana, incluindo organismos não cultiváveis.

O DNA extraído é utilizado como molde para amplificação por PCR de regiões específicas, sendo o gene 16S rRNA empregado para bactérias e a região ITS para fungos (Quast et al., 2013). Após a amplificação, os produtos foram submetidos ao sequenciamento de alto desempenho em plataformas como Illumina (Callahan et al., 2016), possibilitando a obtenção de milhares de sequências simultaneamente (Nilsson et al., 2019).

Os dados gerados passaram por processamento bioinformático, incluindo filtragem de qualidade, remoção de sequências quiméricas e agrupamento em unidades taxonômicas operacionais ou variantes de sequência (Bolyen et al., 2019). A identificação dos microrganismos foi realizada por comparação com bancos de dados como SILVA para bactérias e UNITE para fungos. Posteriormente, foram conduzidas análises de diversidade alfa e beta, permitindo compreender tanto a riqueza e abundância dentro das amostras quanto as diferenças entre tratamentos ou ambientes (Thompson et al., 2012).

Essa abordagem permite não apenas identificar quais microrganismos estão presentes no solo, mas também inferir seu papel ecológico e funcional, contribuindo para a compreensão da saúde do solo, das interações planta-microrganismo e dos impactos de práticas agrícolas. Estudos como os de Zhernova et al. (2024), Maretto et al. (2023) e Guellout et al. (2026) demonstram que a metabarcoding é uma ferramenta robusta e indispensável para investigações modernas em microbiologia do solo, permitindo avanços significativos na fitossanidade e no manejo sustentável dos sistemas agrícolas.

Metodologia estatística

Com o objetivo de representar a estrutura taxonômica dos microrganismos foi realizada uma análise gráfica baseada em relações hierárquicas entre os níveis taxonômicos. A análise consistiu na conversão dos dados de classificação em um gráfico, onde cada nó representou um nível taxonômico (ex.: reino, divisão, classe, etc.) e cada aresta indicou uma conexão hierárquica direta entre os níveis sucessivos.

Foi gerada uma matriz de abundância com valores absolutos, a partir dessa matriz, calcularam-se três métricas de diversidade alfa: riqueza (número de táxons por amostra), índice de Shannon (que considera tanto a riqueza quanto a equitatividade entre os táxons) e índice de Simpson (que enfatizou a dominância de poucos grupos).

Para explorar as relações de similaridade entre os isolados, e as variáveis avaliadas, foi construído um “heatmap”, inicialmente os dados foram submetidos a uma padronização (z-score), para uniformizar as escalas entre variáveis, garantindo que diferentes magnitudes não dominassem a análise. Adotou-se distância Euclidiana como métrica e o método de agrupamento ward.D2 para construir os dendrogramas. Com uma escala de cores contínua variando de tons de amarelo (valores negativos) a azul (valores positivos), os dendrogramas permitem a visualização das relações de similaridade entre os tratamentos e as variáveis, pacote (pheatmap) (Kolde, 2019). Para facilitar a interpretação dos resultados, foi construída uma tabela com os 10 gêneros mais abundantes por tratamento.

Os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA), considerando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias como pressupostos básicos. A normalidade dos resíduos foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variância (homocedasticidade) entre os grupos foi avaliada com o teste de Bartlett. Quando os pressupostos não foram atendidos, foi utilizado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis com comparação múltipla entre médias realizada através do teste post hoc de Dunn, considerando 5% de significância.

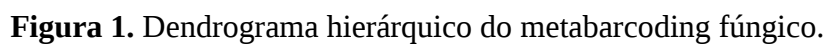
RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise molecular por metabarcoding revelou ampla diversidade de fungos nos solos avaliados, com predomínio das divisões Ascomycota e Basidiomycota, os quais constituíram os ramos principais da árvore filogenética. O filo Ascomycota apresentou elevada diversidade taxonômica, destacando-se as classes *Sordariomycetes*, *Dothideomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Leotiomycetes* e *Pezizomycetes*, com ordens funcionalmente relacionadas à decomposição da matéria orgânica e interações simbióticas com plantas (Figura 1).

A divisão Basidiomycota também apresentou representação expressiva, notadamente pelas classes *Agaricomycetes* e *Tremellomycetes*. Muitos dos gêneros

identificados, como *Trichoderma* sp., *Chaetomium* sp., *Humicola* sp. e *Clonostachys* sp., os quais estão associados à decomposição de lignina e componentes recalcitrantes, além de possuírem potenciais efeitos antagônicos a fitopatógenos (Figura 1).

Gêneros pertencentes às divisões Mortierellomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota também foram detectados, ainda que em menor frequência. A presença recorrente do gênero *Mortierella* sp. nos tratamentos com bioestimulantes sugere incremento na atividade saprofítica e na ciclagem de carbono (Figura 1)



Nos tratamentos com Vitacomplex® associado à adubação mineral, tanto na dose de 50% quanto na dose de 100%, observou-se maior abundância relativa de táxons frequentemente associados, na literatura, a funções ecológicas relevantes, como *Talaromyces* sp., *Chaetomium* sp., *Clonostachys* sp. e *Trichoderma* sp.. Esses gêneros possuem ampla documentação na literatura quanto à promoção da saúde do solo, decomposição de resíduos e supressão de doenças (Hellequin et al., 2018; Macías-Benítez et al., 2020) (Figura 2).

Por outro lado, a testemunha não tratada apresentou maior abundância relativa de gêneros associados a potenciais efeitos fitopatogênicos, como *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. e *Ectophoma* sp. Esse padrão é consistente com a hipótese de que ambientes não estimulados funcionalmente favorecem a dominância de fitopatógenos oportunistas (Berihu et al., 2023) (Figura 2).

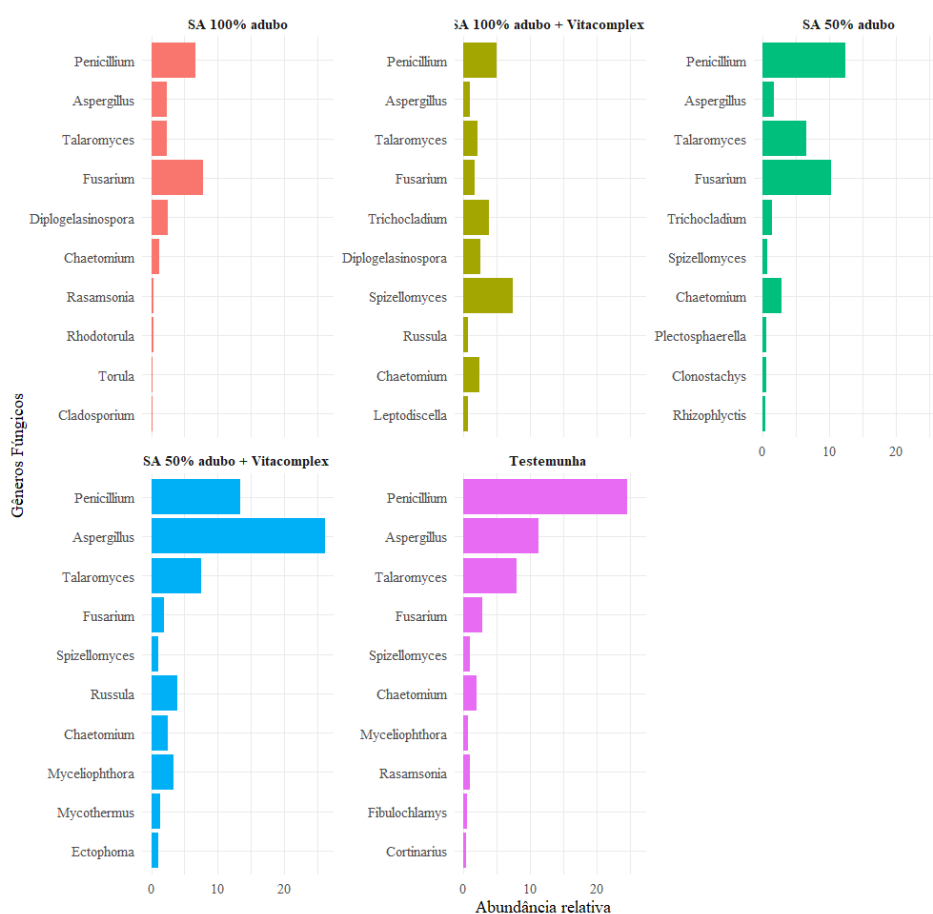


Figura 2. Gêneros fúngicos mais abundantes em cada tratamento experimental.

A análise da composição dos gêneros dominantes evidenciou padrões de diferenciação entre os tratamentos, sugerindo possível relação entre o uso do bioestimulante associado à adubação mineral e a modulação estrutural da comunidade fúngica. Os tratamentos com Vitacomplex® apresentaram maior abundância relativa de gêneros frequentemente associados, na literatura, a funções ecológicas relevantes, como *Trichocladium* sp., *Spizellomyces* sp. e *Russula* sp. Na testemunha, a menor presença relativa desses grupos e a ocorrência de gêneros como *Rasamsonia* sp. e *Myceliophthora* sp. sugerem uma comunidade distinta em relação aos tratamentos com bioestimulante (Figura 3).

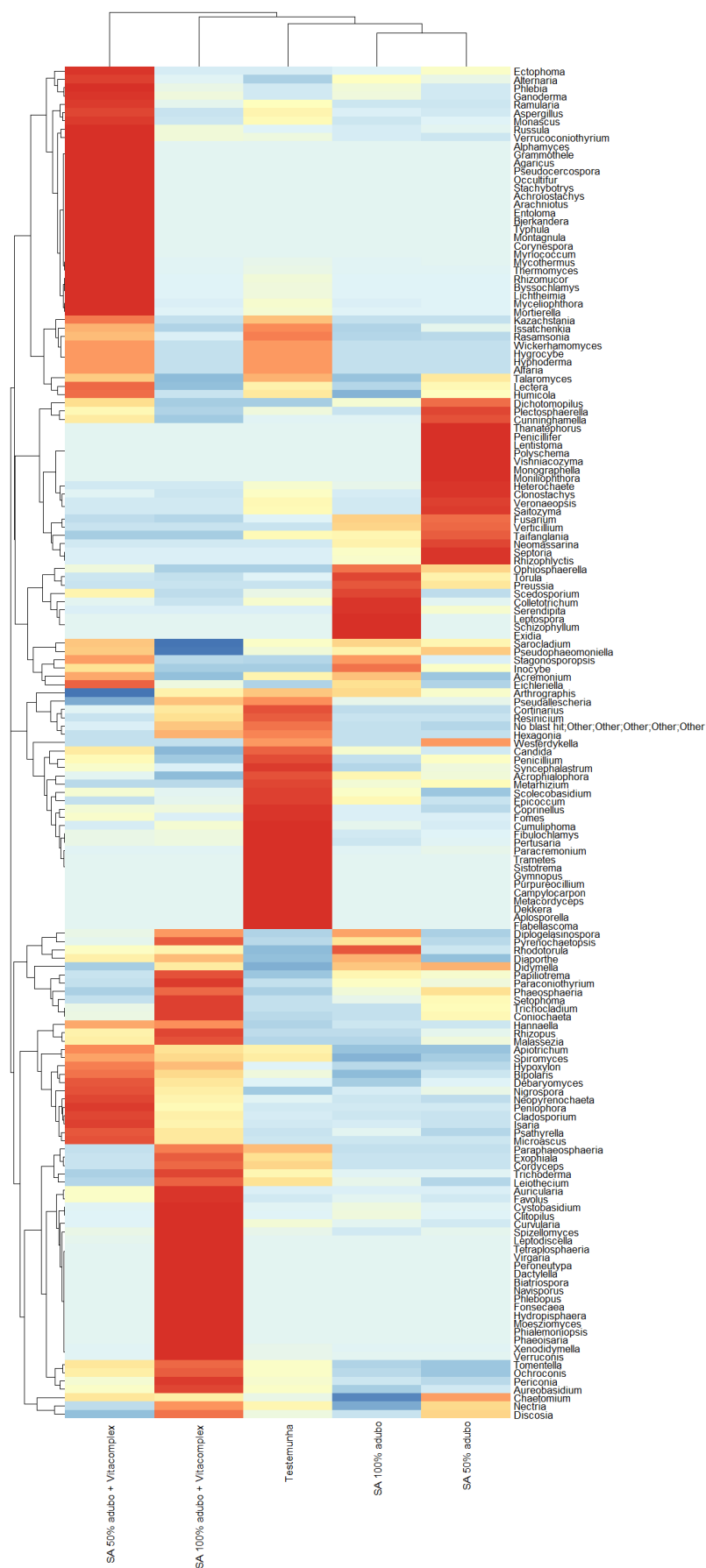


Figura 3. Heatmap dos gêneros fúngicos mais abundantes em função dos tratamentos.

O sequenciamento (16S/ITS) revelou uma comunidade bacteriana altamente diversa, com representantes das principais divisões bacterianas e arqueanas. Dentre os grupos predominantes, destacam-se as Divisões Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Acidobacteria (Figura 4).

A Divisão Proteobacteria foi a mais abundante, com ordens como *Rhizobiales*, *Burkholderiales* e *Pseudomonadales*, cujos gêneros (*Rhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Azospirillum* sp. e *Pseudomonas* sp.) os quais estão associados à fixação biológica de N, produção de reguladores de crescimento e controle biológico de fitopatógenos (Figura 4).

A Divisão Actinobacteria, especialmente o gênero *Streptomyces* sp., apresentou papel destacado na decomposição de compostos orgânicos complexos e na produção de antibióticos. Já a divisão Firmicutes foi representada principalmente por *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp., ambos amplamente estudados por sua atuação como biofertilizantes, solubilizadores de fósforo e promotores de crescimento vegetal (Figura 4).

As Divisões Bacteroidetes e Acidobacteria, embora menos representativos, incluem gêneros como *Chitinophaga* sp. e *Flavobacterium* sp., relevantes na degradação de polissacarídeos e na manutenção do equilíbrio da microbiota do solo (Figura 4).

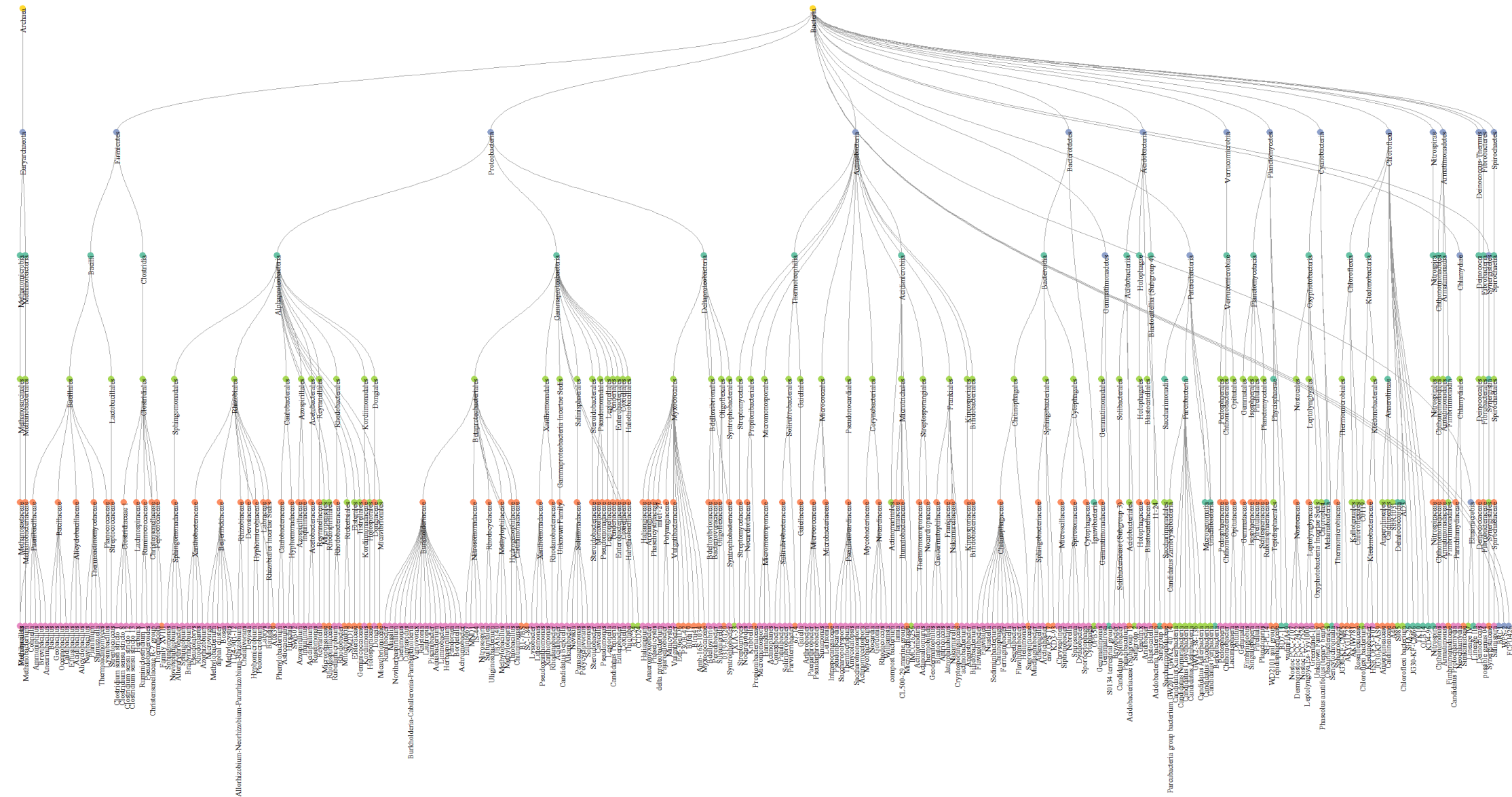


Figura 4. Dendrograma hierárquico da metabarcoding bacteriana.

Nos tratamentos com 100 % de adubação, com ou sem Vitacomplex[®], observou-se predominância de *Nocardioides* sp., *Tumebacillus* sp., *Streptomyces* sp. e *Paenibacillus* sp., indicando uma resposta microbiana robusta à adubação. Já os tratamentos com Vitacomplex[®] apresentaram ainda maior diversidade funcional, com ativação adicional de gêneros como *Massilia* sp., *Sphingomonas* sp. e *Rambacter* sp. (Figura 5).

A composição da testemunha, embora incluía *Tumebacillus* sp. e *Paenibacillus* sp., revelou menor diversidade e presença de táxons frequentemente associados a condições ambientais específicas ou ambientes com maior seletividade edáfica, como *Novibacillus* sp. e *Geobacillus* sp. Esses resultados sugerem que a aplicação do bioestimulante, especialmente quando associada à adubação mineral, pode estar relacionada a alterações na composição da comunidade microbiana e a menor abundância relativa de gêneros que incluem espécies potencialmente fitopatogênicas, indicando uma comunidade com maior presença relativa de táxons associados a processos como decomposição de resíduos, ciclagem de nutrientes e promoção de crescimento vegetal (Figura 5).

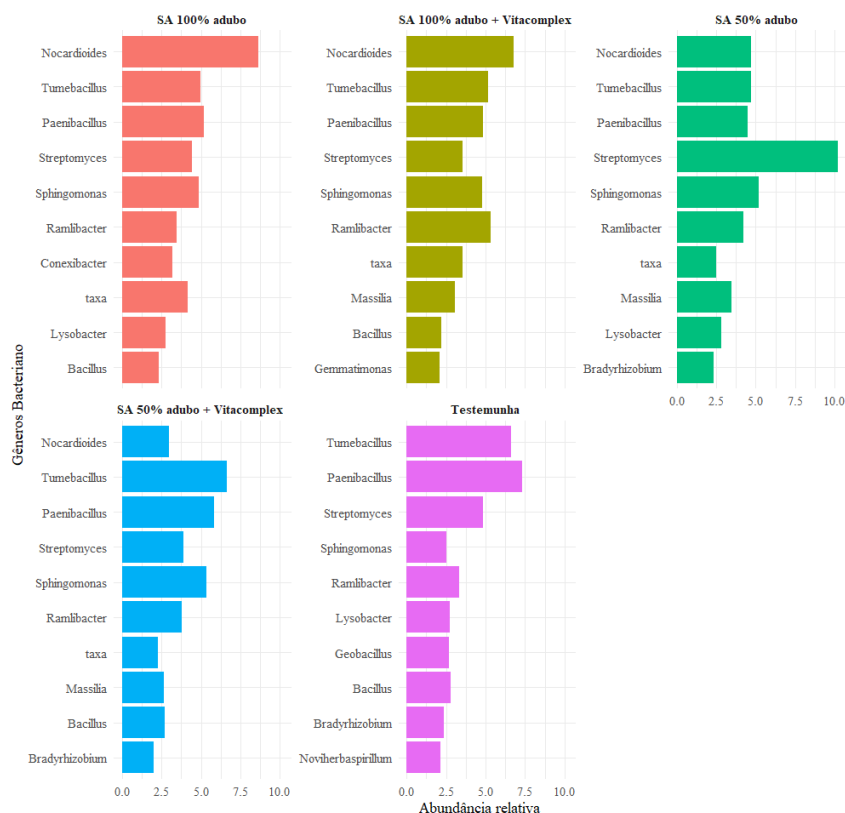


Figura 5. Gêneros bacterianos mais abundantes em cada tratamento experimental.

Os heatmaps de abundância relativa demonstraram clara diferenciação na composição microbiana entre os tratamentos, com destaque para os tratamentos com Vitacomplex® associado à adubação mineral. Nessas condições, observou-se maior abundância relativa de gêneros frequentemente associados, na literatura, a funções ecológicas relevantes como *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Paenibacillus* sp., *Rhizobium* sp. e *Burkholderia* sp. (Imam et al., 2021; Maffia et al., 2024) (Figura 6).

A presença ampliada de *Chitinophaga* sp. e *Flavobacterium* sp. nos solos tratados com bioestimulantes reforça a hipótese de ativação trófica da microbiota, com maior potencial para degradação de resíduos e ciclagem de nutrientes (Wadduwage et al., 2023). Em contraste, a testemunha apresentou maior proporção de gêneros menos funcionais ou associados a ambientes degradados, como *Gemmatimonas* sp. e bactérias gram positivas da Ordem Clostridiales (Figura 6).

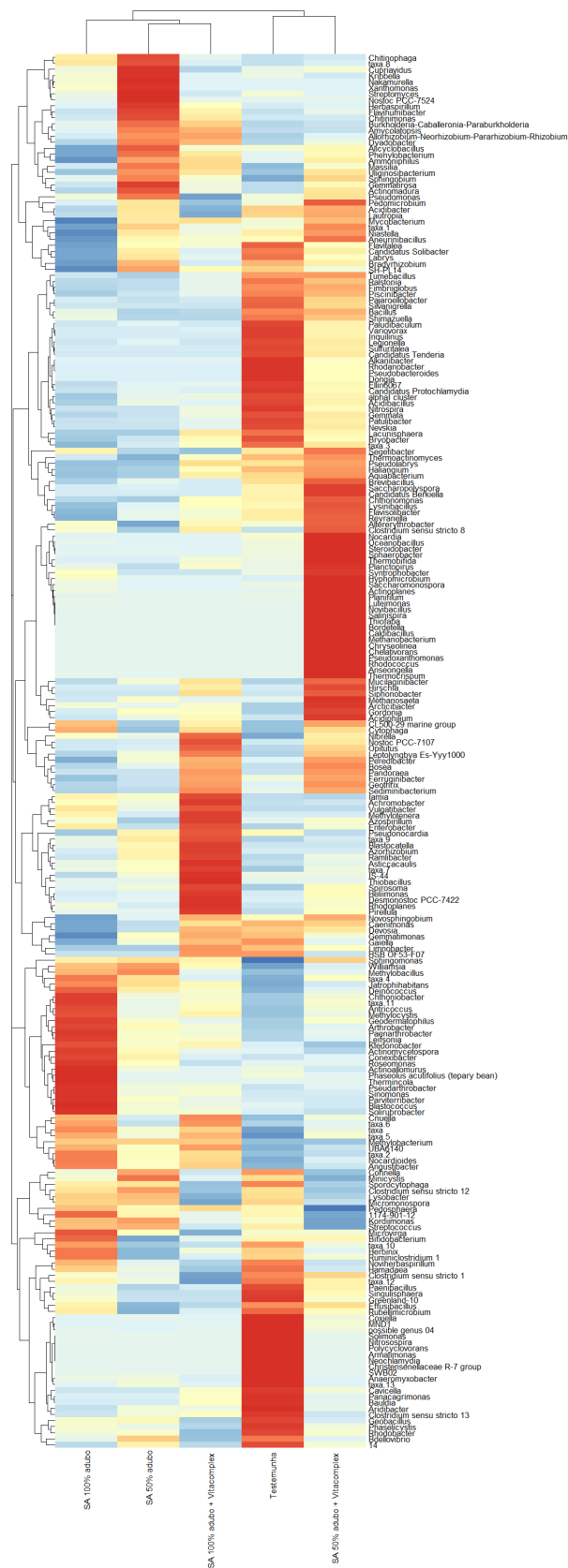


Figura 6. Heatmap dos gêneros bacterianos mais abundantes em função dos tratamentos.

Diversidade e uniformidade da comunidade microbiana

A diversidade fúngica foi influenciada pelos tratamentos avaliados, com variações tanto na riqueza quanto nos índices de diversidade. O índice de Shannon variou de 1,946 na testemunha a 2,356/2,772 no tratamento SA 50 % e SA 100 % adubo + Vitacomplex®, indicando aumento da diversidade em resposta à adubação associada ao bioinsumo. Nos tratamentos SA 50 % e 100 % adubo o valor de Shannon (2,159 e 2,193) foi superior ao observado na testemunha, porém inferior aos com Vitacomplex®. O índice de Simpson corroborou esse padrão, apresentando valores mais elevados nos tratamentos com suplementação de Vitacomplex® (0,893 e 0,813) em comparação à testemunha (0,742), refletindo menor dominância de espécies específicas e maior uniformidade da comunidade fúngica (Tabela 2).

Para a comunidade bacteriana, observou-se valores de Shannon mais elevados do que para fungos, com variação de 3,64 a 3,90 entre os tratamentos. O maior valor foi registrado em SA 50 % adubo + Vitacomplex®, indicando maior diversidade bacteriana neste sistema. O índice de Simpson apresentou valores elevados em todos os tratamentos (>0,95), evidenciando uma comunidade altamente uniforme, sem dominância marcante de grupos específicos (Tabela 2).

Tabela 2. Índices de diversidade (Shannon e Simpson) das comunidades fúngicas e bacterianas em diferentes tratamentos de adubação e aplicação de bioestimulante (Vitacomplex®).

Tratamento	Diversidade fúngica			Diversidade bacteriana		
	Riqueza	Shannon	Simpson	Riqueza	Shannon	Simpson
SA 100% adubo	89	2,193	0,817	165	3,647	0,957
SA 100% adubo + Vitacomplex®	99	2,772	0,893	184	3,805	0,962
SA 50% adubo	92	2,159	0,809	176	3,686	0,956
SA 50% adubo + Vitacomplex®	102	2,356	0,813	211	3,903	0,964
Testemunha	95	1,946	0,742	185	3,848	0,963

Resultados semelhantes foram relatados por Hellequin et al. (2018), que observaram que a aplicação de bioestimulantes no solo promoveu o recrutamento específico de fungos decompositores, aumentando a biomassa microbiana, mas também podendo reduzir a diversidade pela dominância de alguns grupos adaptados ao novo substrato.

A comparação entre comunidades fúngicas e bacterianas revelou diferenças marcantes na estruturação da diversidade. Enquanto os fungos apresentaram valores mais baixos de Shannon (1,946–2,772) e Simpson (0,742–0,893), indicando comunidades menos uniformes e mais suscetíveis à dominância de determinados grupos, as bactérias exibiram índices superiores (Shannon: 3,647–3,903; Simpson: 0,956–0,964), refletindo maior complexidade e estabilidade ecológica. Esses resultados corroboram o que foi discutido por Wadduwage et al. (2023), ao destacar que comunidades bacterianas tendem a responder de forma mais estável à aplicação de bioestimulantes em campo, enquanto fungos mostram maior sensibilidade às variações no manejo. Além disso, a literatura apontou que a diversidade bacteriana é frequentemente mais resiliente a perturbações e desempenhou papel central na ciclagem de nutrientes e na resiliência do solo a estresses bióticos (Berihu et al., 2023).

O tratamento combinado de SA 50 % adubo + Vitacomplex® apresentou a maior riqueza fúngica, significativamente superior aos demais, enquanto a adubação exclusiva (100 % adubo) resultou na menor diversidade. Assim como nos fungos, o tratamento com 50 % adubo + Vitacomplex® apresentou a maior riqueza bacteriana, sendo estatisticamente superior a todos os outros, enquanto SA com 100 % adubo apresentou os menores valores de riqueza (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de rarefação alfa das comunidades fúngicas e bacterianas, ajustados ao número de sequências por amostra, em diferentes tratamentos de adubação e aplicação de bioinsumo (Vitacomplex®).

Tratamentos	Fungos		Bactérias	
	Sequências por amostra	Rarefação α	Sequências por α	Rarefação α
Testemunha	41000	354 b	35000	855 b
SA 100 % adubo	41000	275,5 e	35000	730,5 e
SA 50 % adubo	41000	297,5 d	35000	778,5 d
SA 100 % adubo + Vitacomplex®	41000	310,5 c	35000	816,5 c
SA 50 % adubo + Vitacomplex®	41000	364 a	35000	933,5 a
P valor		<0,05		<0,05

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não se diferem entre si pelo teste de Dunn à significância de $P \sim 0,05$.

Os resultados sugerem que a redução parcial da adubação mineral, quando associada ao Vitacomplex®, apresentou os maiores valores de riqueza rarefeita para fungos e bactérias, conforme evidenciado pelos valores de rarefação alfa. Portanto, os resultados obtidos neste estudo reforçaram que o uso combinado de fertilização mineral

reduzida e bioinsumos não apenas mantiveram, mas estiveram associados ao aumento da riqueza microbiana rarefeita, indicando uma estratégia promissora para aumentar a resiliência e a sustentabilidade dos agroecossistemas.

A maior riqueza observada no tratamento com 50% da adubação mineral associado ao Vitacomplex®, em comparação ao tratamento com 100% da adubação mineral, pode estar relacionada ao menor efeito seletivo da fertilização sobre a comunidade microbiana. A literatura indica que aplicações elevadas ou contínuas de fertilizantes minerais, especialmente nitrogenados, podem alterar propriedades químicas do solo, como pH, disponibilidade de nutrientes e equilíbrio iônico, afetando a composição e a diversidade das comunidades microbianas (Zeng et al., 2016; Wang et al., 2018; Ren et al., 2020).

Em alguns casos, o aumento da disponibilidade mineral favorece grupos mais adaptados a essas condições, enquanto reduz a presença relativa de táxons mais sensíveis, resultando em menor riqueza ou diversidade microbiana (Wang et al., 2018; Wang et al., 2024).

Por outro lado, a redução parcial da adubação mineral, quando associada a um bioestimulante, pode criar uma condição menos seletiva e mais favorável à manutenção de diferentes grupos microbianos, especialmente aqueles associados à decomposição de resíduos, ciclagem de nutrientes e interação planta-microrganismo (Wadduwage et al., 2023).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que a aplicação do bioestimulante Vitacomplex® associado à adubação mineral alterou a composição taxonômica das comunidades fúngica e bacteriana do solo em condições controladas de cultivo. Entre os tratamentos avaliados, a combinação de 50% da adubação mineral com Vitacomplex® apresentou os maiores valores de riqueza e rarefação alfa para as comunidades fúngica e bacteriana, sugerindo maior diversidade microbiana em comparação aos demais tratamentos.

Os tratamentos com Vitacomplex® apresentaram maior abundância relativa de gêneros frequentemente associados, na literatura, a processos de decomposição de resíduos, ciclagem de nutrientes, antagonismo microbiano e promoção de crescimento

vegetal, como *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Clonostachys*, *Bacillus*, *Streptomyces* e *Paenibacillus*. Entretanto, essas possíveis funções foram inferidas a partir da identidade taxonômica dos microrganismos, não tendo sido avaliadas diretamente por análises funcionais, enzimáticas ou fisiológicas.

Dessa forma, os resultados sugerem que a associação entre adubação mineral reduzida e bioestimulante pode representar uma estratégia promissora para modular a microbiota do solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, L. K.; Macdonald, L. M.; Wong, M. T. F.; Webb, M. J.; Jenkins, S. N.; Farrell, M. Potential roles of biological amendments for profitable grain production – A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 256, p. 34–50, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.021>.

Berihu, M.; Somera, T. S.; Malik, A.; Medina, S.; Piombo, E.; Tal, O.; Cohen, M.; Ginatt, A.; Ofek-Lalzar, M.; Doron-Faigenboim, A.; Mazzola, M.; Freilich, S. A framework for the targeted recruitment of crop-beneficial soil taxa based on network analysis of metagenomics data. *Microbiome*, v. 11, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01438-1>.

Bolyen, E.; Rideout, J. R.; Dillon, M. R.; Bokulich, N. A.; Abnet, C. C.; Al-Ghalith, G. A.; Alexander, H.; Alm, E. J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; Bai, Y.; Bisanz, J. E.; Bittinger, K.; Brejnrod, A.; Brislawn, C. J.; Brown, C. T.; Callahan, B. J.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Chase, J.; Cope, E. K.; Da Silva, R.; Diener, C.; Dorrestein, P. C.; Douglas, G. M.; Durall, D. M.; Duvallet, C.; Edwardson, C. F.; Ernst, M.; Estaki, M.; Fouquier, J.; Gauglitz, J. M.; Gibbons, S. M.; Gibson, D. L.; Gonzalez, A.; Gorlick, K.; Guo, J.; Hillmann, B.; Holmes, S.; Holste, H.; Huttenhower, C.; Huttley, G. A.; Janssen, S.; Jarmusch, A. K.; Jiang, L.; Kaehler, B. D.; Kang, K. B.; Keefe, C. R.; Keim, P.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koester, I.; Kosciulek, T.; Kreps, J.; Langille, M. G. I.; Lee, J.; Ley, R.; Liu, Y. X.; Loftfield, E.; Lozupone, C.; Maher, M.; Marotz, C.; Martin, B. D.; McDonald, D.; McIver, L. J.; Melnik, A. V.; Metcalf, J. L.; Morgan, S. C.; Morton, J. T.; Naimey, A. T.; Navas-Molina, J. A.; Nothias, L. F.; Orchanian, S. B.; Pearson, T.; Peoples, S. L.; Petras, D.; Preuss, M. L.; Priesse, E.; Rasmussen, L. B.; Rivers, A.; Robeson, M. S.; Rosenthal, P.; Segata, N.; Shaffer, M.; Shiffer, A.; Sinha, R.; Song, S.

J.; Spear, J. R.; Swafford, A. D.; Thompson, L. R.; Torres, P. J.; Trinh, P.; Tripathi, A.; Turnbaugh, P. J.; Ul-Hasan, S.; van der Hooft, J. J. J.; Vargas, F.; Vázquez-Baeza, Y.; Vogtmann, E.; von Hippel, M.; Walters, W.; Wan, Y.; Wang, M.; Warren, J.; Weber, K. C.; Williamson, C. H. D.; Willis, A. D.; Xu, Z. Z.; Zaneveld, J. R.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Knight, R.; Caporaso, J. G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, v. 37, p. 852-857, 2019.

Callahan, B. J.; McMurdie, P. J.; Rosen, M. J.; Han, A. W.; Johnson, A. J. A.; Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, v. 13, p. 581-583, 2016.

Caporaso, J. G.; Lauber, C. L.; Walters, W. A.; Berg-Lyons, D.; Huntley, J.; Fierer, N.; Owens, S. M.; Betley, J.; Fraser, L.; Bauer, M.; Gormley, N.; Gilbert, J. A.; Smith, G.; Knight, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, v. 6, p. 1621-1624, 2012.

du Jardin, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 3-14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>.

Hellequin, E.; Monard, C.; Chorin, M.; Le Bris, N.; Daburon, V.; Klarzynski, O.; Binet, F. Responses of active soil microorganisms facing a soil biostimulant input compared to plant legacy effects. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70695-7>.

Hellequin, E.; Monard, C.; Quaiser, A.; Henriot, M.; Klarzynski, O.; Binet, F. Specific recruitment of soil bacteria and fungi decomposers following a biostimulant application increased crop residues mineralization. *PLOS ONE*, v. 13, n. 12, p. 1-19, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209089>.

Imam, N.; Belda, I.; Duehl, A. J.; Doroghazi, J. R.; Almonacid, D. E.; Thomas, V. P.; Acedo, A. Soil microbial composition and structure allow assessment of biological product effectiveness and crop yield prediction. *bioRxiv*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.02.09.430373>.

Kolde, R. pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12, CRAN, 2019. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>.

Macias-Benitez, S.; Garcia-Martinez, A. M.; Caballero Jimenez, P.; Gonzalez, J. M.; Tejada Moral, M.; Parrado Rubio, J. Rhizospheric Organic Acids as Biostimulants: Monitoring Feedbacks on Soil Microorganisms and Biochemical Properties. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00633>.

Maffia, A.; Scotti, R.; Wood, T.; Muscolo, A.; Lepore, A.; Acocella, E.; Celano, G. Transforming Agricultural and Sulfur Waste into Fertilizer: Assessing the Short-Term Effects on Microbial Biodiversity via a Metagenomic Approach. *Life*, v. 14, n. 12, p. 1633, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/life14121633>.

Maretto, D. A.; Rangel, D. E. N.; Fernandes, G. W. Advances in soil metagenomics and microbial ecology: applications and challenges. *Microbial Ecology*, v. 85, p. 1234-1248, 2023.

Mickan, B. S.; Alsharmani, A. R.; Solaiman, Z. M.; Leopold, M.; Abbott, L. K. Plant-dependent soil bacterial responses following amendment with a multispecies microbial biostimulant compared to rock mineral and chemical fertilizers. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 1-13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.550169>.

Nilsson, R. H.; Larsson, K. H.; Taylor, A. F. S.; Bengtsson-Palme, J.; Jeppesen, T. S.; Schigel, D.; Kennedy, P.; Picard, K.; Glöckner, F. O.; Tedersoo, L.; Saar, I.; Kõljalg, U.; Abarenkov, K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research*, v. 47, p. D259-D264, 2019.

Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, p. D590-D596, 2013.

Ren, N.; Wang, Y.; Ye, Y.; Zhao, Y.; Huang, Y.; Fu, W.; Chu, X. Effects of continuous nitrogen fertilizer application on the diversity and composition of rhizosphere soil bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1948, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01948>.

Sarker, A.; Ansary, M. W. R.; Hossain, M. N.; Islam, T. Prospect and Challenges for Sustainable Management of Climate Change-Associated Stresses to Soil and Plant Health

by Beneficial Rhizobacteria. *Stresses*, v. 1, n. 4, p. 200-222, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/stresses1040015>.

Tabacchioni, S.; Passato, S.; Ambrosino, P.; Huang, L.; Caldara, M.; Cantale, C.; Hett, J.; Del Fiore, A.; Fiore, A.; Schlüter, A.; Sczyrba, A.; Maestri, E.; Marmiroli, N.; Neuhoﬀ, D.; Nesme, J.; Sørensen, S. J.; Aprea, G.; Nobili, C.; Presenti, O.; Giovannetti, G.; Giovannetti, C.; Pihlanto, A.; Brunori, A.; Bevivino, A. Identification of Beneficial Microbial Consortia and Bioactive Compounds with Potential as Plant Biostimulants for a Sustainable Agriculture. *Microorganisms*, v. 9, n. 2, p. 426, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020426>.

Thompson, L. R.; Sanders, J. G.; McDonald, D.; Amir, A.; Ladau, J.; Locey, K. J.; Prill, R. J.; Tripathi, A.; Gibbons, S. M.; Ackermann, G.; Navas-Molina, J. A.; Janssen, S.; Kopylova, E.; Vázquez-Baeza, Y.; González, A.; Morton, J. T.; Mirarab, S.; Xu, Z. Z.; Jiang, L.; Haroon, M. F.; Kanbar, J.; Zhu, Q.; Jin Song, S.; Kosciulek, T.; Bokulich, N. A.; Lefler, J.; Brislawn, C. J.; Humphrey, G.; Owens, S. M.; Hampton-Marcell, J.; Berg-Lyons, D.; McKenzie, V.; Fierer, N.; Fuhrman, J. A.; Clauset, A.; Stevens, R. L.; Shade, A.; Pollard, K. S.; Goodwin, K. D.; Jansson, J. K.; Gilbert, J. A.; Knight, R.; Earth Microbiome Project Consortium. A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. *Nature*, v. 551, p. 457-463, 2017.

Visioli, G.; Sanangelantoni, A. M.; Vamerali, T.; Dal Cortivo, C.; Blandino, M. 16S rDNA profiling to reveal the influence of seed-applied biostimulants on the rhizosphere of young maize plants. *Molecules*, v. 23, n. 6, p. 1-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23061461>.

Wadduwage, J.; Liu, H.; Egidi, E.; Singh, B. K.; Macdonald, C. A. Effects of biostimulant application on soil biological and physicochemical properties: A field study. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, v. 2, n. 3, p. 285–300, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/sae2.12057>.

Wang, C.; Liu, D.; Bai, E. Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing microbial biomass under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 120, p. 126-133, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.02.003>.

Wang, F.; Liu, X.; Zhang, Y.; Li, H.; Chen, J.; Zhao, M. Reducing application of nitrogen fertilizer increases soil bacterial diversity and stability. *Microorganisms*, v. 12, n. 7, artigo 1434, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071434>.

Yakhin, O. I.; Lubyantsev, A. A.; Yakhin, I. A.; Brown, P. H. Biostimulants in plant science: A global perspective. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1-39, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>.

Zeng, J.; Liu, X.; Song, L.; Lin, X.; Zhang, H.; Shen, C.; Chu, H. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 92, p. 41-49, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.018>.

Zhernova, N. A.; Kurakov, A. V.; Kachalkin, A. V. Metabarcoding approaches for assessing soil microbial diversity: current trends and perspectives. **Data in Brief**, v. 52, p. 1-7, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dib.2023.109856>.