

MANUAL DE ANÁLISES DE BIOINSUMOS PARA USO AGRÍCOLA: INOCULANTES



Embrapa

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Soja
Ministério da Agricultura e Pecuária***

MANUAL DE ANÁLISES DE BIOINSUMOS PARA USO AGRÍCOLA INOCULANTES

*Eduara Ferreira
Marco Antonio Nogueira
Mariangela Hungria*

***Embrapa
Brasília, DF
2024***

Responsável pelo conteúdo e editoração

Embrapa

Parque Estação Biológica
Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Adeney de Freitas Bueno

Secretária-Executiva

Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite

Membros

Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros França Neto, Leandro Eugênio Cardamone Diniz, Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani Zavaglia Pereira e Norman Neumaier

Edição executiva

Vanessa Fuzinatto Dall'Agnol

Normalização bibliográfica

Valéria de Fátima Cardoso

Projeto gráfico e diagramação

Hermano Matos

Fotos da capa

Antonio Neto, Eduara Ferreira e Renan A. Ribeiro

1ª edição

1ª impressão (2024): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Soja

Ferreira, Eduara.

Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola : inoculantes / Eduara Ferreira, Marco Antonio Nogueira, Mariangela Hungria. – Brasília, DF : Embrapa, 2024.

164 p. : il. color. ; 20 cm x 27 cm.

ISBN 978-65-5467-029-6

1. Biofertilizante. 2. Controle biológico. 3. Nutrição de plantas. I. Embrapa Soja. II. Título.

CDD (21. ed.) 631.8

Valéria de Fátima Cardoso (CRB-9/1188)

© 2024 Embrapa

AUTORES

Eduara Ferreira

Farmacêutica industrial, mestre em Microbiologia,
analista da Embrapa Soja, Londrina, PR

Marco Antonio Nogueira

Engenheiro-agrônomo, doutor em Agronomia,
pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR

Mariangela Hungria

Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo,
pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR

AGRADECIMENTOS

Equipe apoiada pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia “Microrganismos Promotores do Crescimento de Plantas Visando à Sustentabilidade Agrícola e à Responsabilidade Ambiental” (CNPq 465133/2014-4, Fundação Araucária-STI 043/2019, CAPES), pelo projeto de Bioinsumos (CNPq 405666/2022-5) e pelo Projeto Rede FertBrasil (FINEP 01.22.0080.00).

APRESENTAÇÃO

Desde a sua concepção, a Embrapa Soja sempre valorizou o desenvolvimento de pesquisas com biológicos em substituição ou complementação a insumos químicos. O apoio à pesquisa com biológicos nesses anos levou ao reconhecimento da Embrapa Soja como uma das principais lideranças, tanto no controle biológico de pragas e doenças, como no desenvolvimento de tecnologias relacionadas à fixação biológica do nitrogênio e outros processos microbianos que contribuem para a nutrição de plantas.

A equipe do Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja tem sido responsável pelo lançamento de estirpes e tecnologias relacionadas ao uso de microrganismos para a nutrição de plantas. Citando apenas alguns dos lançamentos da equipe, estão a inoculação anual da soja com *Bradyrhizobium* spp., estirpes de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho, trigo e pastagens com braquiárias e a coinoculação da soja e do feijoeiro com rizóbios e *A. brasilense*. A equipe também tem buscado continuamente o aprimoramento em qualidade para a prestação de serviços para os setores público e privado. Nesse contexto, a equipe já conseguiu cadastrar o laboratório no Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) para a análise de inoculantes (LAB PR-00037), sua coleção de culturas é homologada como banco de germoplasma de microrganismos de interesse agrícola pelo Mapa para distribuição para a produção de inoculantes, é estação quarentenária do Mapa pós-entrada de microrganismos para uso como inoculante e o único laboratório público de pesquisa com ensaios de inoculantes acreditados pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro em ISO 17025 (CRL 1535).

O Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, que instituiu o Programa Nacional de Bioinsumos, veio a reforçar a vocação brasileira pelo uso de biológicos na agricultura. A importância do decreto foi ainda mais relevante porque surgiu em um cenário de falta de fertilizantes no mercado, de restrição ao uso de diversos produtos químicos e de carência de novas moléculas químicas. Como resultado, verificou-se uma corrida ao desenvolvimento e para a produção de bioinsumos.

A Embrapa Soja entende que o primeiro passo para a produção de bioinsumos reside no controle de qualidade dos produtos. A agricultura brasileira precisa de produtos com qualidade e é necessário saber avaliar os bioinsumos. Desse modo, este manual traz uma enorme contribuição ao setor de bioinsumos, detalhando com grande riqueza de imagens metodologias-chave para avaliação de inoculantes microbianos, e que podem ser aplicadas a outros bioinsumos.

Alexandre Lima Nepomuceno
Chefe-Geral da Embrapa Soja

PREFÁCIO

Há mais de três décadas nosso grupo de pesquisa em Biotecnologia do Solo na Embrapa Soja se esforça continuamente em oportunidades de crescimento técnico-científico em pesquisa, desenvolvimento tecnológico, inovação e extensão em inoculantes microbianos, agora também denominados como bioinsumos. Como resultado, somos hoje reconhecidos nacional e internacionalmente desde a pesquisa básica, por exemplo, em estudos da biodiversidade, com a descrição de dezenas de novas espécies de bactérias, até o lançamento de bioinsumos em parcerias público-privadas e que hoje são utilizados em milhões de hectares no país.

Qualquer pesquisa com produtos microbiológicos tem como base de sustentação o controle adequado de qualidade. Em nossa jornada, temos alocado esforços contínuos no aprimoramento de metodologias e na implementação de sistemas de qualidade nas análises de bioinsumos microbianos. Conseguimos nessa jornada, junto ao Mapa, o cadastramento como laboratório para análise de inoculantes, como estação quarentenária de microrganismos para uso como inoculantes e a homologação como banco de germoplasma de microrganismos de interesse agrícola. Houve, também, a acreditação em ISO 17025, pela Coordenação Geral de Acreditação do Inmetro, de ensaios com inoculantes.

Este manual foi idealizado e elaborado para retribuir à sociedade o investimento feito em nosso grupo de pesquisa e que nos permitiu tantos avanços técnico-científicos. Ele fornece as informações necessárias para a avaliação adequada de produtos inoculantes. Temos certeza de que essa contribuição representa o primeiro passo para o futuro que almejamos, de uso de bioinsumos rumo a uma agricultura altamente produtiva e regenerativa.

Eduara Ferreira
Marco Antonio Nogueira
Mariangela Hungria

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
APRESENTAÇÃO	5
PREFÁCIO	7
INTRODUÇÃO	11
CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES.....	13
Microrganismos utilizados	14
Método.....	17
Análise de concentração e pureza	17
Preparo da Série de Diluições Decimais.....	18
Método por Espalhamento em Meio de Cultura.....	24
Método por Gotejamento	27
Avaliação da Pureza	29
Método do Número Mais Provável (NMP) – Infecção em Plantas.....	31
Método do Número Mais Provável <i>in vitro</i> para Bactérias Diazotróficas	
Associativas ou Endofíticas	45
Método de Recuperação e Quantificação de Rizóbios em	
Sementes Inoculadas	48
Análise de Identidade Genética.....	51
Esgotamento.....	59
Coloração de Gram.....	61
Monitoramento e Verificações dos Equipamentos	63
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	69
APÊNDICE A – Ilustrações do Crescimento Típico das Estirpes em Meio de Cultura.....	70
APÊNDICE B – Exemplos de Cálculos de NMP	129
APÊNDICE C – Ilustrações de Perfis Genéticos (<i>Fingerprinting</i>)	132
APÊNDICE D – Ilustrações de Coloração de Gram.....	137
ANEXOS	139
ANEXO A – Composição e Modo de Preparo dos Meios de Cultura	140
ANEXO B – Composição e Modo de Preparo das Soluções	145
ANEXO C – Tabelas.....	151



INTRODUÇÃO

De acordo com a definição da legislação brasileira vigente, inoculante é definido como “a substância que contenha microorganismos com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal” (Brasil, 1980; Brasil, 1981). São também conhecidos como fertilizantes biológicos ou biofertilizantes e, segundo nomenclatura recentemente sugerida, classificam-se como bioinsumos (Brasil, 2020). Inoculantes têm grande relevância para a agricultura pelos benefícios econômicos, sociais e ambientais, possibilitando incremento na produtividade das culturas, benefícios na fertilidade do solo e menor impacto ambiental, resultando em maior sustentabilidade. No entanto, para que esses inoculantes resultem em benefícios à agricultura, à sociedade e ao meio ambiente é fundamental utilizar produtos de boa qualidade, incluindo o uso de estirpes eficientes, número suficiente e adequado de células viáveis desses microrganismos e a ausência de contaminantes.

A busca contínua por sistemas agroalimentares eficientes, inclusivos, resilientes e sustentáveis é imprescindível. Há projeções de aumento na demanda por alimentos devido ao crescimento populacional. Além disso, a crise sanitária provocada pela pandemia de covid-19 levou à crise de abastecimento de insumos agrícolas, que foi agravada pela existência de conflitos territoriais, com destaque para a invasão da Ucrânia pela Rússia iniciada em 2022, causando impactos econômicos globais. Diante da busca por soluções agroalimentares e ambientais, três planos ou programas relacionados à agricultura foram lançados pelo governo brasileiro. No mês de maio de 2020 foi publicado no Diário Oficial da União o Decreto nº 10.375, instituindo o Programa Nacional de Bioinsumos (Brasil, 2020). Esse programa foi criado com a finalidade de fortalecer e ampliar a utilização de bioinsumos no País, beneficiando o setor agropecuário. Entre as ações propostas nesse decreto, o Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) prevê a edição de manual de boas práticas a ser seguido pelas unidades produtoras de bioinsumos, assim como a promoção e a aplicação das boas práticas de produção por meio de treinamento e capacitação, garantindo o aperfeiçoamento contínuo e sustentável do uso desses produtos. Em 2021, por meio do Decreto nº 10.605 foi implementado o Plano Nacional de Fertilizantes (PNF)

visando fortalecer políticas de aumento da competitividade da produção e da distribuição de fertilizantes no Brasil de forma sustentável, incluindo o mercado de bioinsumos (Brasil, 2021). Por fim, em 2022, a publicação da Portaria nº 471 no Diário Oficial da União instituiu o Plano Setorial para Adaptação à Mudança do Clima e Baixa Emissão de Carbono na Agropecuária – ABC+ para o período 2020–2030, com o objetivo de adotar sistemas, práticas, produtos e processos de produção sustentáveis, com o compromisso de ampliar em 13 milhões de hectares a área com adoção de bioinsumos (Brasil, 2022).

Dessa forma, a perspectiva é de aumento do uso de bioinsumos e, sendo assim, é necessário que o acompanhamento da qualidade desses produtos, incluindo a categoria dos inoculantes, seja realizado de modo adequado pela pesquisa, pelas indústrias, pelas biofábricas e pelos laboratórios de prestação de serviços e daqueles encarregados de análises oficiais de fiscalização. A avaliação e o controle de qualidade dos inoculantes representam uma ferramenta da garantia da qualidade para a verificação se os requisitos da qualidade especificados estão sendo atendidos.

Os inoculantes produzidos, importados ou comercializados no País devem atender às normas, especificações e garantias descritas na legislação brasileira para cada microrganismo. Atualmente, os métodos para análises de inoculantes utilizados estão especificadas em Instruções Normativas do Mapa, de 2010 e 2018 (Brasil, 2010; Brasil, 2018).

Dada a enorme importância de uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas na agricultura, já foram elaborados manuais específicos de métodos, por exemplo, os manuais publicados por Vincent (1970), Bergersen (1980), Hungria e Araujo (1994); Somasegaran e Hoben (1994); Howieson e Dilworth (2016) e, para outras bactérias não rizóbios, Okon et al. (1977); Bergersen (1980); Hungria e Araujo (1994); Döbereiner et al. (1999); Bettiol et al. (2022). Contudo, dada a relevância do controle de qualidade na fabricação dos inoculantes e a garantia das especificações do fabricante ao consumidor, como número de microrganismos viáveis, ausência de contaminantes e identidade dos microrganismos declarados no produto, o objetivo deste Manual é disponibilizar uma referência para a análise de inoculantes, enriquecida com ilustrações, métodos e instruções detalhadas, facilitando a análise da qualidade desses produtos.

CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES

Este manual descreve três métodos para a avaliação da concentração e da pureza de inoculantes. Após a etapa de diluição seriada da análise, dependendo do produto inoculante, é viável escolher um dos métodos apresentados a seguir:

- I. Método de espalhamento e método de gotejamento para a contagem em placas de Petri com meio sólido para rizóbios, bactérias diazotróficas associativas e endofíticas e outras bactérias promotoras do crescimento de plantas;
- II. Método de infecção em plantas, também conhecido como método do Número Mais Provável (NMP) em leguminosas, para rizóbios;
- III. Método de contagem em meios semissólidos, também conhecido como método do Número Mais Provável (NMP), para bactérias diazotróficas associativas ou endofíticas.

Este manual também descreve:

- IV. Método de recuperação e quantificação de rizóbios em sementes inoculadas;
- V. Método de identificação genética de estirpes presentes em inoculantes pelo perfil de DNA amplificado por rep-PCR;
- VI. Técnicas básicas de microbiologia.

Os métodos são baseados, principalmente, na Instrução Normativa nº 30, de 12 Novembro de 2010 do Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) (Brasil, 2010) e na Instrução Normativa nº 14, de 13 de abril de 2018 (Brasil, 2018). Quando houver modificações nos procedimentos especificados nas instruções normativas, devidamente validadas no Laboratório de Biotecnologia do Solo, ou por meio de outras publicações, essas serão especificadas no texto deste manual.

Microrganismos utilizados

Para a edição deste manual foram utilizados microrganismos depositados na “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas” e que estão distribuídos nas espécies *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Rhizobium freirei*, *Rhizobium tropici*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus aryabhatai* (reclassificado como *Priestia aryabhatai*), *Bacillus megaterium* (reclassificado como *Priestia megaterium*) e *Bacillus subtilis*.

A coleção é homologada como Banco de Germoplasma de Microrganismos de Interesse Agrícola pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) para distribuição de estirpes para a produção de inoculantes (Portaria nº 17, 20/03/2018). A coleção também está cadastrada internacionalmente na “World Federation Culture Collection” (WFCC) (Coleção # 1213) e na “World Data Center for Microorganisms” (WDCM) (Coleção # 1054).

Os microrganismos apresentados neste manual incluem estirpes de depósito aberto (disponibilizadas aos setores público e privado sob solicitação e atendimento a preceitos legais) e de depósito fechado (depositadas pelo setor público ou privado e de uso exclusivo pelo depositante). A sigla CNPSo (Centro Nacional de Pesquisa de Soja) refere-se à entrada e à numeração do microrganismo na coleção de culturas da Embrapa Soja. As demais nomenclaturas se referem às informações que constam: do site AleloMicro da Embrapa (BRM) (<https://alelo.cenargen.embrapa.br/>); de entrada no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ (BR); na Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA) da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro), Porto Alegre, RS (SEMIA); na Universidade Federal de Lavras (Ufla), Lavras, MG; no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM e no Centro Internacional de Agricultura Tropical (Ciat), Cali-Colômbia e na Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS), Sete Lagoas, MG. Outras nomenclaturas se referem a coleções de trabalho específicas que geraram essas estirpes anteriormente ao uso de uma nomenclatura oficial da coleção e incluem rizóbios de feijão do Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar), atualmente Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (Iapar-Emater) (IDR-PR), Londrina, PR (PRF) e bacilos do CNPMS (CMPC) e da Embrapa Soja (PRBS).

- ✓ *Azospirillum brasilense* – Ab-V5, =CNPSo 2083, =BRM 54139
- ✓ *Azospirillum brasilense* – Ab-V6, =CNPSo 2084, =BRM 54140
- ✓ *Bradyrhizobium elkanii* – SEMIA 587, =CNPSo 14, =BRM 5131
- ✓ *Bradyrhizobium elkanii* – SEMIA 5019, =CNPSo 09, =BR 29, =BRM 5126
- ✓ *Bradyrhizobium japonicum* – SEMIA 5079, =CPAC 15, =CNPSo 07, =BRM 5124
- ✓ *Bradyrhizobium diazoefficiens* – SEMIA 5080, =CPAC 7, =CNPSo 06, =BRM 5123
- ✓ *Bradyrhizobium* sp. – SEMIA 6461, =CNPSo 2256, =UFLA 3-84, =BR 3302, =BRM 54052
- ✓ *Bradyrhizobium yuanmingense* – SEMIA 6462, =CNPSo 3084, =BR 3267, =BRM 54055
- ✓ *Bradyrhizobium* sp. – SEMIA 6463, =CNPSo 2975, =INPA 03-11B, =BR 3301, =BRM 54053
- ✓ *Rhizobium freirei* – SEMIA 4080, =PRF 81, =CNPSo 2217, =BRM 54067
- ✓ *Rhizobium tropici* – SEMIA 4077, =CIAT 899, =CNPSo 103, =BRM 5218
- ✓ *Pseudomonas fluorescens* – CNPSo 2719, =CCTB 03, =BRM 67171
- ✓ *Pseudomonas fluorescens* – CNPSo 2799, =BRM 61658
- ✓ *Priestia* (=Bacillus) *aryabhatai* – CNPSo 2603, =BRM 61465 (a estirpe não é usada em inoculantes comerciais, mas representativa da espécie)
- ✓ *Priestia* (=Bacillus) *megaterium* – CNPSo 4268, =CMPC 14, =CNPMS B119, =BRM 33112
- ✓ *Bacillus subtilis* – CNPSo 2657, =PRBS-1, =BRM 65838
- ✓ *Bacillus subtilis* – CNPSo 4269, =CMPC 151, =CNPMS B2084, =BRM 3480

Os métodos para a análise do inoculante, assim como o meio de cultura e tempo de crescimento para cada microrganismo especificado neste manual, encontram-se descritos na Tabela 1.

Neste manual são apresentadas as morfologias das colônias e das células de alguns microrganismos que constam na relação de microrganismos autorizados e recomendados para a produção de inoculantes, e que estão contemplados na legislação específica (Brasil, 2011) de registro, especificações, garantias, entre outros parâmetros estabelecidos pelo Mapa, assim como de alguns microrganismos que não constam nessa legislação, mas que são de relevância para o agronegócio. O Apêndice A apresenta ilustrações (figuras) do crescimento típico das estirpes em meio de cultura.

A composição dos meios de cultura e seu modo de preparo estão disponíveis no Anexo A.

Tabela 1. Microrganismos, meios de cultivo, método e tempo de incubação.

Microrganismo	Meio de cultivo ⁽¹⁾	Método	Tempo de incubação
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ⁽²⁾	YMA	Espalhamento	7–8 dias
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ⁽²⁾	YMA	Gotejamento	6–8 dias
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ⁽²⁾	YMA	Esgotamento	6–8 dias
<i>Rhizobium</i> sp. ⁽³⁾	YMA	Espalhamento	2–3 dias
<i>Rhizobium</i> sp. ⁽³⁾	YMA	Esgotamento	2 dias
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KING B	Espalhamento	2–3 dias
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KING B	Esgotamento	1–2 dias
<i>Priestia/Bacillus</i> sp. ⁽⁴⁾	TSA	Espalhamento	1 dia
<i>Priestia/Bacillus</i> sp. ⁽⁴⁾	TSA	Esgotamento	1 dia
<i>Azospirillum brasilense</i>	RC	Espalhamento	5 dias
<i>Azospirillum brasilense</i>	RC	Gotejamento	3–4 dias
<i>Azospirillum brasilense</i>	RC	Esgotamento	3–4 dias
Rizóbios	-	NMP (plantas)	25–30 dias
Bactérias diazotróficas	NFb semissólido	NMP in vitro	5–7 dias

Fonte: Brasil (2010, 2018).

⁽¹⁾ YMA (*Yeast-Manitol-Agar*, extrato de levedura-manitol-ágar, também conhecido como meio 79); RC (*Rojo Congo*); TSA (*Tryptic Soy Agar*); NFb (*N-Free-bromothymol blue*). A composição dos meios de cultura consta do Anexo A).

⁽²⁾ Inclui as espécies *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium yuanmingense*.

⁽³⁾ Inclui as espécies *Rhizobium freirei* e *Rhizobium tropici*.

⁽⁴⁾ Inclui as espécies *Priestia (=Bacillus) aryabhatai*, *Priestia (=Bacillus) megaterium* e *Bacillus subtilis* – CNPSo 2657 e *Bacillus subtilis* – CNPSo 4269.

A temperatura de crescimento para os microrganismos descritos na Tabela 1 é de 28 °C com variação aceitável de +/- 2 °C, com exceção do método do Número Mais Provável (NMP) em plantas, que será tratado na seção específica para esse método. A temperatura de 28 °C foi validada e padronizada no laboratório de Biotecnologia do Solo para todos os microrganismos descritos na Tabela 1. Contudo, embora a padronização tenha sido feita para todos os microrganismos citados, cabe salientar que a temperatura ótima de crescimento pode diferir levemente. Como exemplo, para algumas espécies de *Azospirillum* spp., as temperaturas ótimas de crescimento podem ser superiores a 30 °C (Holt et al., 1993).

Convém também ressaltar que alguns microrganismos podem apresentar quantificação diversificada quando analisados utilizando diferentes soluções diluentes e/ou meios de cultura distintos. Como por exemplo, um produto constituído pelas estirpes *Priestia (=Bacillus) megaterium* CNPMS B119 e *Bacillus subtilis* CNPMS B2084, foi submetido à análise de concentração pelo método por espalhamento em meio de cultura RC (*Rojo Congo*) com dois diferentes diluentes, um deles constituído por solução fisiológica 0,85% (NaCl 0,85%), e o outro composto por solução fisiológica 0,85% (NaCl 0,85%) e

Tween 80 (polioxietilenorbitano monolaurato) 0,1% p/v (peso/volume), e os resultados para análise de concentração, apresentaram diferenças relevantes quanto à concentração, quando os distintos diluentes foram comparados.

Método

Análise de concentração e pureza

O preparo dos materiais deve ser realizado em laboratório, sob condições adequadas de desinfecção. Todos os materiais, como os meios de cultura e soluções utilizados nas análises, deverão ser previamente esterilizados em autoclave, a 121 °C por 20 minutos.

O processo de desinfecção consiste em inviabilizar microrganismos ou inibir seu crescimento. Pode ser feito com o uso de agentes químicos e físicos, como o álcool etílico a 70% e a radiação ultravioleta, respectivamente. Tais agentes, denominados desinfetantes, são utilizados para tratar uma superfície ou substância inerte. O termo desinfecção é habitualmente utilizado para referir-se à destruição de patógenos na forma vegetativa, ou seja, não abrange a destruição de microrganismos formadores de estruturas de resistência, os endósporos. Para eliminação desses, é necessário o processo de esterilização, que consiste na remoção de todas as formas de vida microbiana, incluindo os endósporos (Madigan et al., 2016; Tortora; et al., 2012).

Antes de iniciar as análises, é necessário realizar a desinfecção dos equipamentos e materiais de apoio. Desta forma, para o preparo das amostras, realizar a limpeza das bancadas de apoio, bandejas e equipamentos com papel toalha embebido em álcool etílico a 70%. A abertura das embalagens de inoculantes e a amostragem devem ser realizadas em câmara de fluxo laminar, a fim de evitar contaminações.

A câmara deve ser previamente desinfetada com álcool etílico a 70% contemplando as paredes internas e a superfície da área de trabalho do equipamento. A seguir, realizar a desinfecção com lâmpada germicida por, no mínimo, 15 minutos antes do uso. É necessária atenção ao deixar a lâmpada germicida ligada, pois a luz ultravioleta (UV) pode ocasionar diferentes tipos de mutação no DNA das células da epiderme (Trabulsi e Alterthum, 2015), se ocorrer exposição sobre a pele. Dessa forma, é recomendável cobrir a abertura do equipamento, por exemplo, com uma lona, para bloquear a radiação e evitar acidentes de trabalho, embora o próprio vidro da câmara de fluxo laminar já proteja da exposição à luz UV emitida no interior da câmara. É muito importante certificar-se sempre se a lâmpada UV está desligada antes de iniciar os trabalhos na câmara de fluxo laminar.

Depois da desinfecção, deixar o fluxo de ar ligado por 20 minutos antes da utilização para que ocorra a recirculação e a filtragem do ar dentro do equipamento, a fim de garantir que a cabine esteja em condições adequadas e evitar contaminação do produto que será manipulado em seu interior. Outro ponto importante a ser considerado é que somente os objetos necessários à análise devem estar disponibilizados na área de trabalho no interior da câmara.

Cada amostra do inoculante deverá ser composta por duas séries de diluição (duas análises), designadas “A” e “B”, que deverão ser homogeneizadas para a alíquotagem. Antes da abertura, deve-se proceder à inspeção do produto. Acondicionar as embalagens em uma bandeja para verificar possíveis avarias, como vazamento e/ou furos na embalagem, e observar os aspectos de cor, odor e possível contaminação visível do produto. Após inspeção visual, desinfetar externamente a embalagem primária, com algodão ou papel toalha embebido em álcool etílico a 70%.

Preparo da Série de Diluições Decimais

A primeira etapa da análise de concentração e pureza do produto inoculante consiste na diluição seriada decimal, que também deverá ser preparada em câmara de fluxo laminar utilizando tubos de ensaio ou frascos de vidro esterilizados (Figura 1) com capacidade três vezes superior ao volume de 9 mL de solução fisiológica 0,85% (Anexo B) esterilizada, para a garantia da homogeneização.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 1. Frascos com solução fisiológica (NaCl 0,85%) para diluição seriada.

Para a distribuição da solução fisiológica, utilizar dispensador adequado para cada volume, podendo ser pipeta regulável (P1000), dispensador manual esterilizável, ou bomba peristáltica (dispensador automático) com acessórios autoclaváveis (mangueiras, tubulações), conforme demonstrado na Figura 2.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 2. Distribuição de solução fisiológica (NaCl 0,85%) esterilizada em frascos de vidro esterilizados com dispensador automático de soluções.

A primeira diluição (10^{-1}) será obtida de acordo com o suporte do inoculante a ser analisado, pois existem inoculantes com diferentes matrizes. Na Figura 3 visualiza-se um exemplo de inoculante com matriz líquida, enquanto na Figura 4 é exemplificado um inoculante com substrato sólido composto por turfa.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 3. Inoculante com matriz líquida.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 4. Inoculante com matriz sólida (turfa).

✓ Inoculantes Sólidos

Para inoculantes de natureza sólida, como os turfosos, pesar em balança de precisão de duas casas decimais, em câmara de fluxo laminar, 10,00 g do inoculante em um frasco Erlenmeyer esterilizado com capacidade de 250–300 mL, conforme ilustrado na Figura 5. Adicionar 90 mL de solução fisiológica 0,85% esterilizada, a fim de formar a diluição 10^{-1} (Figura 6).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 5. Balança de precisão e Erlenmeyer de 250 mL para pesagem de inoculante em matriz sólida.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 6. Distribuição de 90 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 10,00 g de inoculante em matriz sólida.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 7. Mesa agitadora orbital com frascos de Erlenmeyer contendo inoculante turfoso em solução fisiológica (NaCl 0,85%).

Agitar, em agitador orbital, por 20 minutos a, aproximadamente, 150 rpm (rotações por minuto) (Figura 7) para logo em seguida coletar, com pipeta regulável (P1000), uma alíquota de 1 mL da suspensão que será transferida para um frasco contendo 9 mL de solução fisiológica, formando a diluição 10^{-2} (Figura 8).

Do frasco com a diluição 10^{-2} , retirar 1 mL com uma nova ponteira esterilizada e transferir para outro frasco contendo 9 mL de solução fisiológica 0,85% para formar a diluição 10^{-3} e, assim, sucessivamente, até a diluição que permita a contagem por espalhamento em placa e que contemple a concentração garantida no produto.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 8. Transferência, em câmara de fluxo laminar, da alíquota de 1 mL da diluição 10^{-1} do inoculante turfoso para frasco com 9 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), formando a diluição 10^{-2} .

Em cada procedimento de transferência da alíquota de 1 mL, descartar a pipeta ou ponteira utilizada e agitar o frasco por 20 segundos. Todos os procedimentos devem ser realizados dentro da câmara de fluxo laminar.

O uso de solução fisiológica 0,85% como diluente para a realização da diluição seriada é adequado porque essa solução é osmoticamente compatível com este tipo de análise (O'Hara et al., 2016). O uso de outros diluentes deve ser validado em cada laboratório.

✓ Inoculantes líquidos

Para inoculantes líquidos, após a desinfecção e inspeção visual da embalagem primária, homogeneizar cuidadosamente a embalagem e coletar assepticamente uma alíquota de 1 mL (Figura 9) em câmara de fluxo laminar, transferindo para um frasco contendo 9 mL de solução fisiológica 0,85% esterilizada, a fim de formar a diluição 10^{-1} (Figura 10) e continuar procedendo da mesma forma descrita para o inoculante turfoso, até formar a diluição que permita a contagem e que contemple a concentração garantida no produto.

Como exemplo de definição das diluições a serem preparadas, para inoculantes cuja concentração mínima esperada ou garantia mínima seja de 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro ou grama do produto, realizar a diluição seriada até pelo menos a diluição 10^{-7} .

De cada amostra do inoculante deverão ser preparadas duas séries de diluição, ou duas análises, denominadas "A" e "B" (Figura 11), sendo que o resultado final de cada amostra será obtido pela média dos resultados das duas séries de diluição.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 9. Aliquotagem de 1 mL de inoculante em matriz líquida em embalagem plástica.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 10. Transferência de 1 mL de inoculante líquido para frasco com 9 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), a fim de formar a diluição 10^{-1} .

Foto: Eduara Ferreira

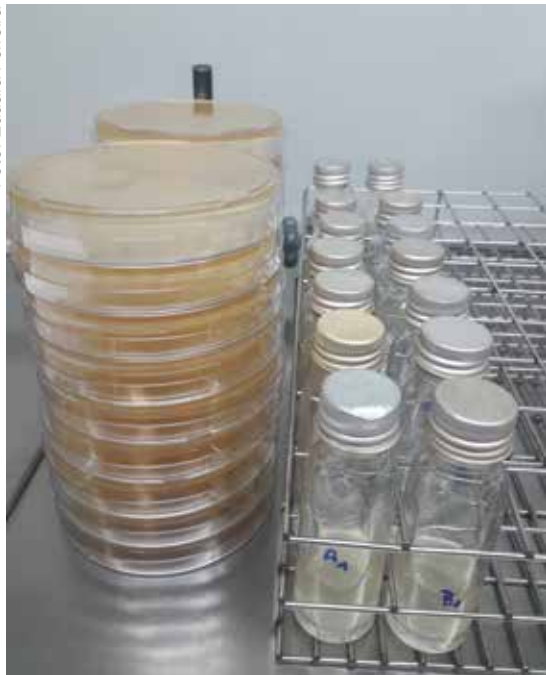


Figura 11. Placas de Petri com meio de cultura, frascos com 9 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%) para diluição seriada com subamostras A e B.

Método por Espalhamento em Meio de Cultura

Realizar a semeadura das placas contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo, de acordo com a Tabela 1, utilizando três placas distintas para cada diluição a ser plaqueada.

Com o auxílio de uma pipeta regulável com capacidade de 100 µL, semear 100 µL de cada uma das diluições (por exemplo, 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}), de cada série de diluição decimal, sobre a superfície do meio de cultura nas placas, em triplicata. Agitar o tubo ou frasco com a diluição decimal por 20 s, antes da semeadura sobre o meio de cultura na placa de Petri (Figura 12).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 12. Semeadura da diluição seriada em placas de Petri com meio sólido para avaliação da concentração de células pelo método do espalhamento.

Espalhar o inóculo na superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalsky ou similar, até que o inóculo tenha sido absorvido pelo meio de cultura (Figura 13). No caso de alças de Drigalsky, de vidro, não esterilizadas previamente, flambar a alça antes e após o espalhamento do inóculo na superfície do meio.

Incubar as placas, em posição invertida, ou seja, com a tampa para baixo, em estufa de crescimento na temperatura e no período indicados para cada microrganismo (Tabela 1). As placas devem ser incubadas e armazenadas em posição invertida (Figura 14) para evitar que a condensação caia sobre a superfície do meio de cultura e prejudique a formação de colônias isoladas e a análise em questão.

A fim de evitar dúvidas sobre os resultados, é altamente recomendável incluir simultaneamente no ensaio três placas com controle positivo (estirpe conhecida para o meio em questão) e três placas com controle negativo (solução fisiológica 0,85%). Deverá

haver crescimento do microrganismo conhecido no controle positivo e não poderá haver crescimento de quaisquer microrganismos no controle negativo.

Foto: Eduara Ferreira

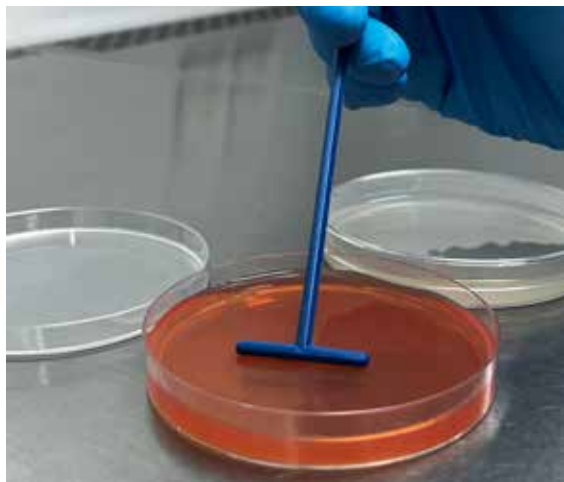


Figura 13. Espalhamento da alíquota da respectiva diluição do inoculante com alça de polipropileno em formato T em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 14. Placas de Petri incubadas em posição invertida em estufa de crescimento armazenadas em prateleiras.

Acompanhar o desenvolvimento das colônias com verificação diária do crescimento, a partir do segundo dia de incubação.

Efetuar a contagem do número de colônias das placas sob lupa e, para melhores condições de visibilidade, a lupa deve conter iluminação com lâmpada fluorescente e aumento de pelo menos 1,5 vezes (Figura 15). As colônias poderão ser contadas com auxílio de um contador manual (Figura 16), ou com equipamentos e softwares específicos para esse fim.

Para a técnica de espalhamento deve ser considerada a diluição cuja média de contagem das três placas estiver na faixa entre 30 unidades formadoras de colônia (UFC) e 300 UFC para o cálculo da média das duas séries de diluição, designadas “A” e “B”. Se nenhuma das diluições sucessivas estiver na faixa de contagem recomendada, realizar a contagem nas diluições mais próximas.

Foto: Eduara Ferreira

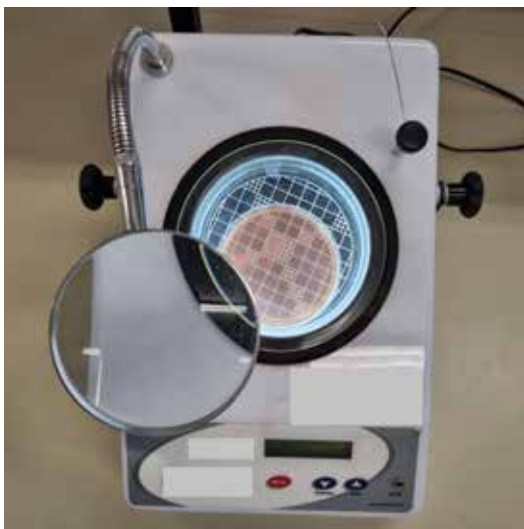


Figura 15. Lupa com aumento de 1,5 vezes contendo lâmpada circular fluorescente de 22 W (Watts) e haste flexível para a contagem de colônias de bactérias.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 16. Contador manual de colônias.

Caso uma das contagens nas três placas da mesma diluição apresente variação superior a 50% da média das outras duas placas, essa deve ser desconsiderada no cálculo da média encontrada na diluição;

Sugere-se que a média das contagens em “A” e “B” não apresente variação superior a 20% entre si. Caso isso ocorra, repetir a análise.

Para o cálculo da concentração, multiplicar a média do número de UFC pela diluição em que a contagem foi efetuada e pelo fator de correção 10 (correção da alíquota de 100 µL para 1 mL), determinando o número de UFC por g ou mL do produto testado, conforme o exemplo a seguir:

Exemplo 1: em uma contagem, a média das três placas foi 75 UFC/placa, na diluição 10^{-6} , então:

Média = 75

Fator de correção = 10

Diluição da leitura = 10^6

nº de bactérias viáveis = $75 \times 10 \times 10^6 = 7,5 \times 10^8$ UFC/g ou mL

Para o resultado final, obter a média entre os resultados das análises das séries de diluição “A” e “B”.

A escolha da diluição dentro da faixa de contagem de 30 UFC-300 UFC para o cálculo da concentração de células é importante, pois o número de colônias crescidas

na placa não deve ser muito elevado, nem muito baixo. Em placas muito populosas, as colônias podem coalescer, ou seja, se fundir, levando a erros de contagem e chances de subestimar os resultados. Por outro lado, quando o número de colônias é pequeno, a precisão da análise fica prejudicada, aumentando as chances de superestimar ou subestimar os resultados (Madigan et al., 2016).

Método por Gotejamento

Na Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010 (Brasil, 2010), o método do gotejamento não está incluído para contagem de inoculantes. Contudo, se bem realizado e validado comparativamente com o método de espalhamento, os resultados são equivalentes, com economia considerável de material e tempo. Nessa mesma IN, o método de gotejamento consta para o “Método 2 - Recuperação e quantificação de Rizóbios em sementes inoculadas” (Brasil, 2010).

Realizar a semeadura das placas contendo o meio de cultura específico para cada microrganismo, de acordo com a Tabela 1, utilizando três placas distintas para cada série de diluição, denominadas “A” e “B”.

Dividir cada placa em seis setores. Utilizar dois setores de cada placa para cada diluição da série de diluições decimais a ser contada, obtendo um total de seis repetições para cada diluição (Figura 17).

Foto: Eduara Ferreira

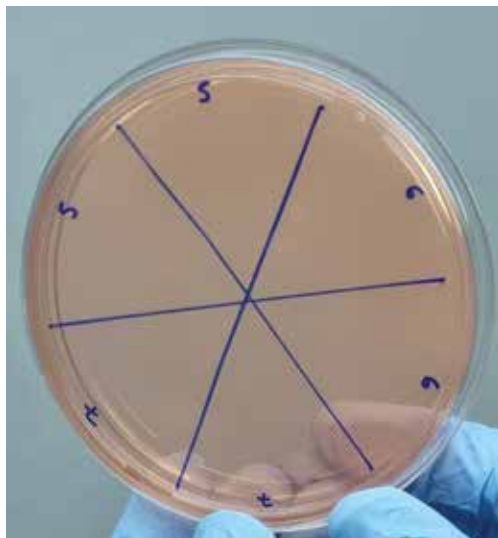


Figura 17. Placa de Petri com meio de cultivo dividida em seis setores para a semeadura pelo método de gotejamento.

Com o auxílio de uma pipeta regulável com capacidade para 30 μ L, gotejar uma ou duas gotas de 30 μ L de cada uma das diluições de interesse da série de diluições decimais, nos setores correspondentes (Figura 18). Na instrução normativa vigente, na

qual constam os métodos analíticos oficiais para a análise de inoculantes, é indicada a inoculação de uma gota por setor para a realização dessa técnica (Brasil, 2010). O método contemplando duas gotas foi validado no laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 18. Semeadura em placas de Petri pela técnica de gotejamento.

Aguardar até que o meio de cultura, na placa, tenha absorvido o inóculo e incubar as placas, em posição invertida, em estufa de crescimento.

Da mesma forma descrita para a técnica de espalhamento, incluir simultaneamente ao ensaio analítico um controle positivo e um controle negativo, sendo três placas com controle positivo (estirpe recomendada para o meio em questão) e três placas com controle negativo (solução fisiológica 0,85%).

Conforme a técnica de espalhamento, efetuar a contagem do número de colônias formadas na posição de cada gota sob lupa, ou similar. Contar as colônias com auxílio do contador manual, ou com *software* específico e calibrado para esse fim.

Após a contagem do número de colônias (UFC), calcular a média do número de UFC por gota dos seis setores da diluição mais apropriada para a contagem.

Para a técnica de gotejamento, deve ser considerada a diluição cuja média de contagem das três placas estiver entre 10 colônias e 30 colônias por gota.

Se nenhuma das diluições sucessivas estiver na faixa de contagem recomendada, calcular a média da diluição mais próxima da faixa de contagem.

Caso uma das réplicas (placas) apresente variação acima de 50% da média das outras duas placas, essa não deve ser considerada no cálculo da média final representativa da diluição.

Sugere-se que a média das contagens em “A e B” não apresente variação superior a 20% entre si. Caso isso ocorra, repetir a análise.

Multiplicar a média do número de UFC pela diluição na qual foram feitas as contagens e pelo fator de correção 33,33 (correção da alíquota de 30 µL para 1 mL), determinando o número de UFC por grama ou mililitro do produto avaliado, conforme o exemplo a seguir:

Exemplo 2: em uma contagem, a média dos seis setores foi de 20 UFC/gota, na diluição 10^{-6} , então:

Média = 20

Fator de correção = 33,33

Diluição da leitura = 10^6

nº de bactérias viáveis = $20 \times 33,33 \times 10^6 = 6,66 \times 10^8$ UFC/g ou mL

Para o resultado final, fazer a média geral entre as séries de diluição denominadas “A” e “B”.

Avaliação da Pureza

A avaliação de pureza do produto inoculante consiste na observação da manifestação do crescimento e das características morfológicas das colônias nas placas ao final do período de incubação estipulado (Figura 19).

De acordo com a legislação brasileira vigente, os inoculantes devem estar livres de microrganismos não especificados em fator de diluição 1×10^{-5} (Brasil, 2011). Para essa verificação, “a avaliação da pureza dos inoculantes deverá ser realizada pelo método do espalhamento em placas de Petri” (Brasil, 2010).

A ausência de contaminantes na diluição especificada é verificada na placa que recebeu a diluição 10^{-5} , ou seja, a alíquota de 100 µL da diluição 10^{-5} é inoculada na superfície de meios de cultura específicos para cada microrganismo, em placas de Petri e, esse inóculo deve ser uniformemente distribuído na superfície do meio, com o auxílio de alça de Drigalski, ou similar.

Para isso, inocular três placas distintas para cada uma das séries de diluição denominadas “A” e “B”, das respectivas diluições e acompanhar diariamente o eventual desenvolvimento de colônias atípicas, morfológicamente distintas do microrganismo alvo,

já a partir do segundo dia da incubação. Para os rizóbios, a ausência de contaminação baseia-se no princípio de que as colônias de rizóbios, em sua grande maioria, não absorvem o corante vermelho Congo, que é acrescido ao meio de cultura utilizado na análise. Nos raros casos em que os rizóbios absorvem o corante, verificar a viabilidade, ou não, de utilizar essa avaliação. Além disso, assume-se o conhecimento da morfologia de colônia da estirpe inoculante.

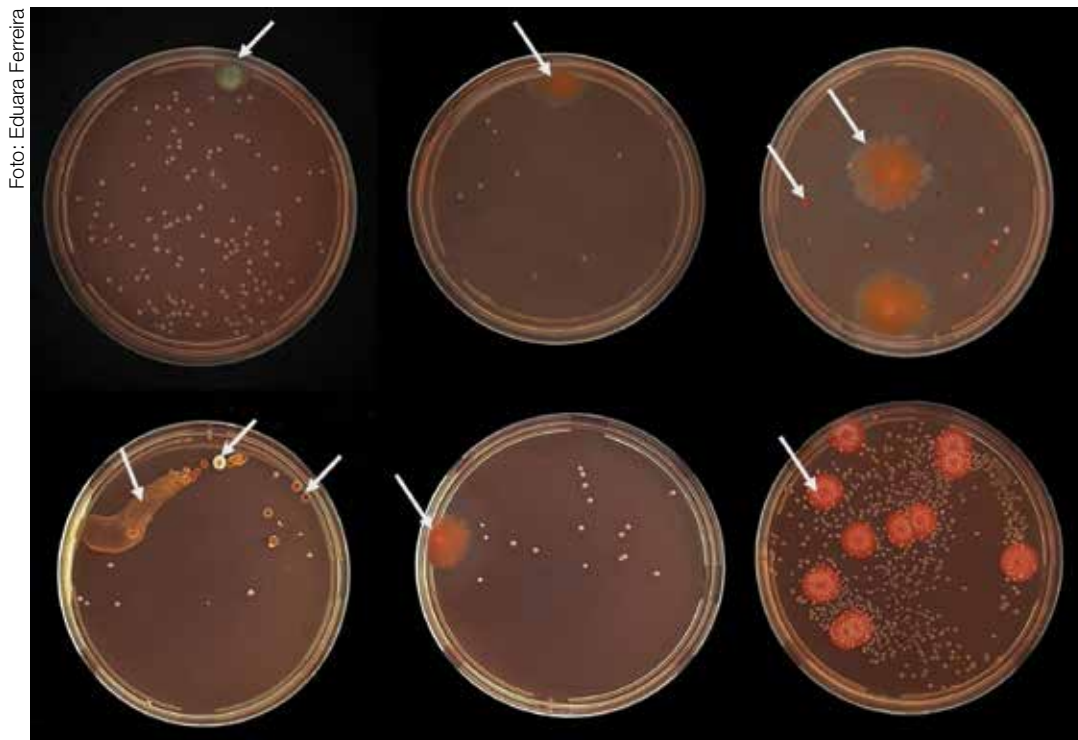


Foto: Eclara Ferreira

Figura 19. Placas de Petri com meio de cultura YMA demonstrando crescimento de rizóbios e contaminantes. As setas indicam o crescimento de contaminantes.

Na avaliação de contaminantes nos substratos sólidos, como as turfas, preparar duas séries de diluição (“A” e “B”), conforme descrito no item Preparo da Série de Diluições Decimais – Inoculantes sólidos, para a verificação da ausência de microrganismos contaminantes no fator de diluição 10^{-2} , conforme definido na Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011 (Brasil, 2011).

Caso a análise morfológica não seja suficiente para a distinção das colônias de contaminantes, testes complementares de identidade deverão ser realizados, como microscopia óptica, testes bioquímicos e moleculares, como por exemplo, pela análise do perfil de DNA por rep-PCR.

Método do Número Mais Provável (NMP) – Infecção em Plantas

O preparo dos materiais, o preparo da amostra e da série de diluições decimais seguem os mesmos critérios dos métodos diretos de determinação da concentração de rizóbios por espalhamento. No entanto, recomenda-se utilizar somente uma série de diluição (“A”) para o método do Número Mais Provável (NMP).

O método de análise pelo NMP em plantas é um procedimento que se aplica nos casos em que se deseja quantificar ou estimar a população de rizóbios capazes de formar nódulos em leguminosas nodulíferas. A avaliação pode ser feita em amostras de solo, ou em amostras de inoculantes.

No caso de inoculantes, o método se aplica quando há elevada contaminação, dificultando a contagem dos rizóbios pelos métodos baseados em cultivo ou microscopia. Desse modo, quando a contagem de células viáveis de rizóbios por esses métodos não for possível, como no caso de inoculantes com alta concentração de contaminantes, ou em amostras de solo, pode-se utilizar um processo indireto de contagem que envolve a inoculação de diluições seriadas decimais das amostras em leguminosas específicas, que sejam hospedeiras da estirpe em avaliação, cultivadas em condições assépticas (Hungria; Araujo, 1994).

A infectividade é avaliada pela formação de nódulos que conferem caráter positivo ao teste, enquanto a ausência de nodulação confere caráter negativo ao mesmo.

Para evitar a subestimação dos valores e a garantia da eficácia da avaliação, pelo menos a última diluição deve apresentar todas as repetições negativas.

Após a diluição seriada do inóculo e a sua inoculação das diluições selecionadas, são necessários, para a maioria das leguminosas, de 25 a 30 dias para a sua avaliação. Para a estimativa do número de bactérias no produto inoculante utilizam-se as Tabelas C1, C2 ou C3 (Anexo C), dependendo do número de replicatas.

Cada unidade teste para avaliação do NMP em plantas deve constar de uma plântula que poderá ser conduzida em tubos de ensaio, saco de polipropileno, frasco de vidro, vaso de Leonard, ou sistemas adaptados, com pelo menos três repetições.

Neste manual serão abordados os testes empregando sacos de polipropileno e vasos de Leonard.

Controles positivos e negativos, com no mínimo três repetições, são indicativos da não interferência de fatores externos, que podem ocorrer na técnica de contagem do NMP em plantas. Esses controles devem ser incluídos simultaneamente às avaliações. O controle positivo, inoculado com um isolado de rizóbio eficiente para a leguminosa utilizada indica se as condições experimentais foram adequadas ao estabelecimento da

simbiose e seu funcionamento. O controle negativo, sem inoculação, indica se as condições experimentais tiveram desinfecção adequada para eliminar contaminantes; caso as plantas do controle negativo apresentem nodulação, o resultado do teste de NMP não pode ser aceito.

- ✓ Desinfecção Superficial de Sementes
- ✓ Sementes com necessidade de quebra de dormência, ou sementes com tegumentos duros que necessitem escarificação:

Imergir as sementes em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 3 a 5 minutos. Em capela de exaustão, colocar as sementes em um béquer e adicionar o ácido sulfúrico em quantidade que permita a cobertura da semente. Drenar o ácido e enxaguar, no mínimo, seis vezes com água deionizada esterilizada para remover todo o ácido. Após a última lavagem, deixar as sementes imersas em água deionizada esterilizada por cerca de cinco minutos para promover o intumescimento e a germinação homogênea das sementes. Esse processo é eficaz para a maioria das espécies com dormência, contudo, pode haver recomendação específica para algumas espécies.

Nota: Água deionizada - Água que passou por um sistema de tratamento, contendo resinas e filtros, para remoção dos íons e impurezas dissolvidos. De acordo com a Norma Britânica, British Standard – BS EM ISO 3696: 1995, classifica-se como grau 3 (condutividade elétrica de até $0,5 \text{ mS m}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$), água adequada para a maioria das atividades em laboratório, trabalhos analíticos, preparação de soluções, produzidos por sistemas de destilação simples, deionização ou por osmose reversa (British Standards Institution, 1995)

- ✓ Sementes que não necessitem de escarificação ou quebra de dormência, como soja [*Glycine max* (L.) Merr.], feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), entre outras:

Imergir as sementes em álcool etílico 70% por 60 s para quebrar a tensão superficial, facilitando o contato da solução de hipoclorito de sódio com o tegumento da semente.

Escorrer o líquido com o auxílio de uma peneira desinfetada em álcool etílico 70% e transferir as sementes para um béquer. Adicionar solução de hipoclorito de sódio 0,4–0,6% (Anexo B) em quantidade suficiente para cobrir as sementes e deixar em imersão durante 5 min. Em seguida, enxaguar pelo menos seis vezes com água deionizada esterilizada, ou até que não haja mais odor de hipoclorito de sódio. Na Figura 20 são apresentados os itens necessários para realizar a desinfecção de sementes que não necessitam de escarificação.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 20. Reagente hipoclorito de sódio, água deionizada esterilizada, proveta graduada, bêquer com sementes de soja, solução de álcool etílico a 70%, e peneira plástica.

A pré-germinação das sementes tem como objetivo garantir o desenvolvimento de plântulas homogêneas para o transplante em sacos de polipropileno, vasos de Leonard, ou similares. Utilizar como substrato, papel próprio para germinação de sementes esterilizado. Os tipos de papel comumente utilizados são o mata-borrão, papel-toalha e o papel filtro, sendo as especificações gerais claramente descritas na publicação “Regras para Análises de Sementes” (RAS) do Mapa (Brasil, 2009). Embalar o papel para germinação de sementes em papel tipo “kraft” antes de autoclavar. Pesquisar o papel para germinação de sementes para calcular a quantidade de água necessária para umedecê-lo. Para a maioria das sementes, deve ser adicionado um volume de água em quantidade equivalente a 2,0 a 3,0 vezes o peso do substrato (Brasil, 2009). Desta forma, a quantidade de água para umedecimento deve ser estimada pelo peso do papel multiplicado por 2,5 (Figura 21), que está dentro do intervalo indicado pela RAS.

Desinfetar a superfície da bancada de serviço com álcool etílico a 70%, estender duas folhas de papel para germinação de sementes (papel tipo Germitest®) esterilizado previamente umedecidas com água deionizada esterilizada.

Nota: Papel Germitest® — papel-toalha para germinação de sementes, isento de impurezas, fungos, bactérias, com estrutura aberta e porosa.

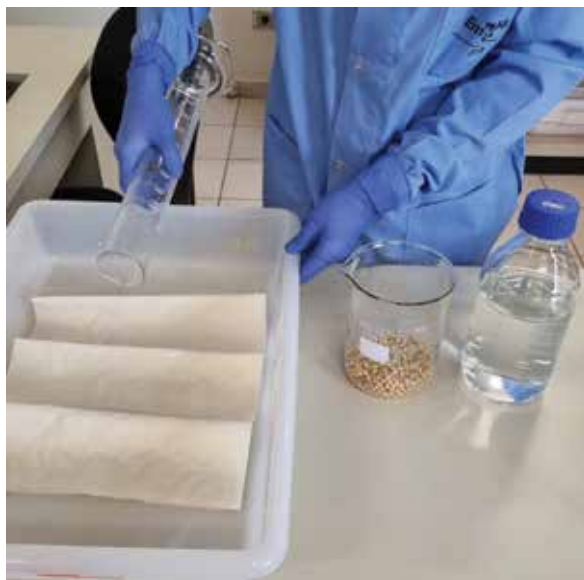


Figura 21. Papel Germitest® sendo umedecido com água deionizada esterilizada.

Em seguida, distribuir em torno de 50 sementes uma a uma sobre a superfície das folhas de papel (Figura 22).

Foto: Eduara Ferreira

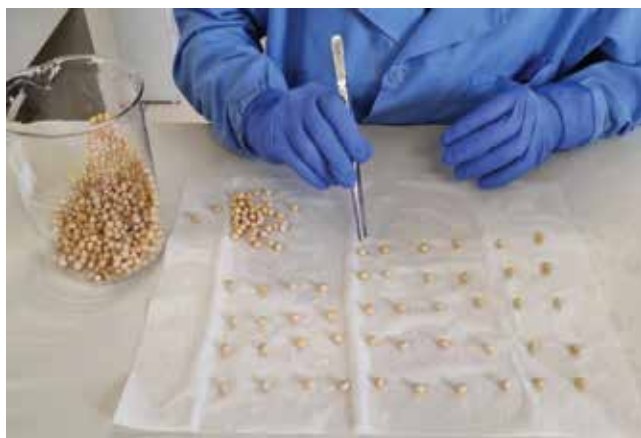


Figura 22. Distribuição de sementes de soja em papel Germitest® umedecido para o teste de NMP de infecção em plantas.

Recobrir as sementes com mais uma folha de papel Germitest® umedecida, totalizando três folhas de papel, ou seja, duas na parte inferior e uma cobrindo as sementes. Dobrar a parte inferior do papel no sentido horizontal e enrolar no sentido vertical formando rolos (Figura 23).

Com o auxílio de atilhos de borracha, formar conjuntos entre dois a quatro rolos e levar a um germinador à temperatura aproximada de 25 °C a 28 °C (+/- 2 °C), ou à temperatura recomendada para cada espécie de leguminosa, por 48 h-96 h, ou de acordo com o tempo de germinação da planta hospedeira (Figuras 24 e 25).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 23. Sementes de soja sendo preparadas em papel Germitest® para pré-germinação para o teste de NMP de infecção em plantas.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 24. Sementes de soja sendo preparadas em papel Germitest® para pré-germinação para o teste de NMP de infecção em plantas.



Figura 25. Sementes incubadas em germinador com temperatura controlada de 28 °C +/- 2 °C para pré-germinação para uso no teste de NMP de infecção em plantas.

✓ Montagem dos Sacos Plásticos para Cultivo de Plantas

Para a montagem deste sistema são necessários sacos plásticos compostos de material autoclavável (polipropileno), substrato em papel para germinação de sementes, palitos de madeira, grampos e caixa de madeira ou qualquer outro material para o suporte dos sacos plásticos.

Os sacos plásticos deverão ter espessura de, aproximadamente, 0,12 mm e dimensões de base e altura de, respectivamente, 120 mm x 250 mm (Figura 26).

O papel Germitest® deverá ter, aproximadamente, comprimento e largura entre 330–370 mm e 100 mm, respectivamente. Será preciso fazer um orifício no papel a uma altura de, aproximadamente, 210 mm e a, aproximadamente, 50 mm da margem, para abrigar as sementes pré-germinadas e fazer uma dobra no papel, aproximadamente 5 mm acima do orifício (Figura 27).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 26. Saco plástico de polipropileno com as respectivas medidas, contendo em seu interior papel Germitest® com dobra e perfuração para abrigar as sementes para o teste de NMP de infecção em plantas.

Foto: Eduara Ferreira

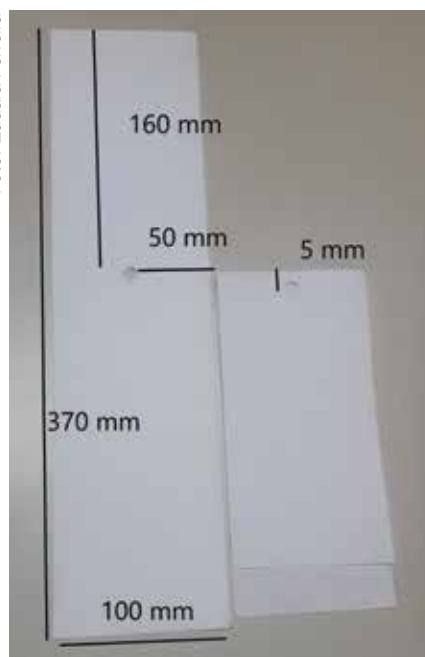


Figura 27. Medidas do papel Germitest® aberto e ao lado do papel Germitest® dobrado, empregados no sistema em sacos plásticos de polipropileno para o teste de NMP de infecção em plantas.

Inserir o papel dobrado no saco plástico, de modo que o orifício fique próximo à abertura e prender, com um grampo, o papel Germitest® ao saco plástico (Figuras 26 e 28).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 28. Unidade teste para análise de Número Mais Provável (NMP) em saco plástico de polipropileno com plantas de soja.

Após a montagem do papel Germitest® no saco plástico, adicionar cerca de 300 mL de solução nutritiva isenta de nitrogênio (Anexo B) a cada saco plástico, dobrar a abertura do saco plástico acima da borda do papel Germitest® e grampear a unidade.

Em seguida, esterilizar as unidades em autoclave a 121 °C, por 20 minutos, deixar esfriar por 24 horas e descartar as unidades que apresentarem vazamentos.

Inserir um palito de madeira desinfetado em álcool etílico 70% com, aproximadamente, 200 mm de comprimento na dobra do saco plástico.

Acondicionar as unidades em um suporte adequado, como, por exemplo, caixa de arquivo ou caixa de madeira, de modo que as unidades fiquem suspensas pelos palitos de madeira (Figura 29).

Com o auxílio de um estilete desinfetado em álcool etílico 70%, fazer um pequeno corte no saco plástico, na mesma posição do orifício já existente no papel Germitest® e inserir a semente pré-germinada no orifício com uma pinça desinfetada em álcool etílico 70% (Figuras 30 e 31).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 29. Suporte em madeira com unidades testes para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas leguminosas em sacos plásticos de polipropileno, na ilustração com sementes pré-germinadas de soja.

Fotos: Eduara Ferreira

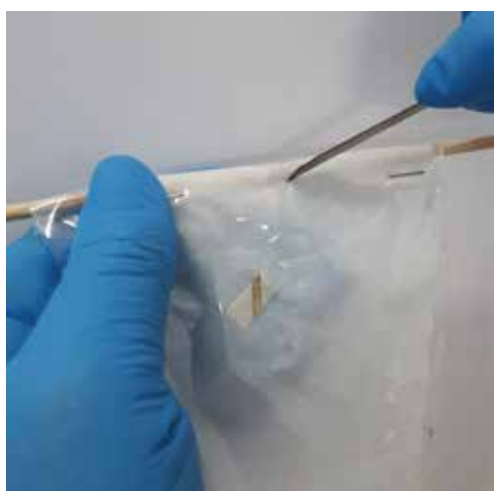


Figura 30. Corte no saco plástico com estilete para a montagem do sistema teste para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas.

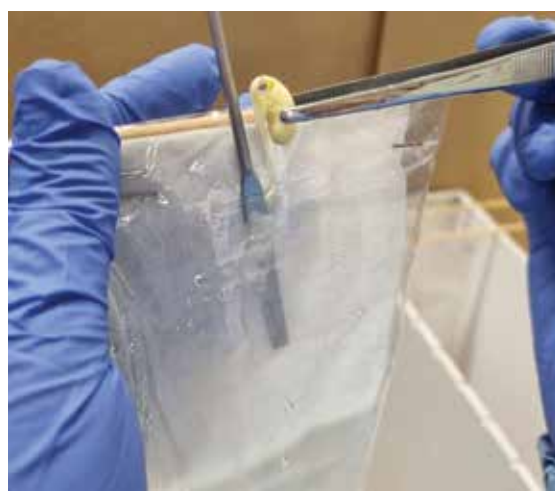


Figura 31. Inserção de uma semente pré-germinada de soja no orifício do papel Germitest® em sistema para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas.

Transferir alíquotas de 1 mL das diluições desejadas do inoculante (Figura 32), no mínimo, em triplicata, até o segundo dia após o transplântio das sementes pré-germinadas e conduzir as unidades em casa de vegetação, ou em câmara de crescimento, mantendo as unidades no local durante toda a condução do teste. Essa análise também pode ser realizada com quatro ou cinco réplicas.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 32. Transferência de 1 mL da diluição 10^{-3} de um inoculante para a região das radículas de uma plântula pré-germinada de soja, em sistema teste em saco plástico de polipropileno para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção de plantas.

O resultado do controle negativo não inoculado não deve apresentar nodulação (Figura 33), enquanto o controle positivo deve apresentar nodulação plena (Figura 34).

A avaliação da nodulação poderá ser efetuada com segurança entre 25 e 30 dias após a inoculação para a maioria das espécies de leguminosas (Figuras 35 e 36). Caso seja necessário para outras espécies de leguminosas, deixar pelo tempo necessário, mas, nesse caso, verificar a necessidade de reposição de solução nutritiva estéril isenta de nitrogênio (Anexo B).

Cabe comentar que esse sistema também pode ser usado para contagem da população de rizóbios no solo. Nesse caso, em vez de diluições de inoculante, procede-se à diluição seriada da amostra de solo e inoculação nas plantas teste. A planta hospedeira escolhida dependerá da população de rizóbio a ser determinada, por exemplo, de micros-simbiontes de soja ou do feijoeiro. Há também leguminosas mais promíscuas, como é o caso do siratro [*Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urb.].

Fotos: Eduara Ferreira



Figura 33. Raiz sem nódulos de uma planta de soja que recebeu apenas solução nutritiva estéril (controle negativo) em sistema teste em sacos plásticos de polipropileno para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas.

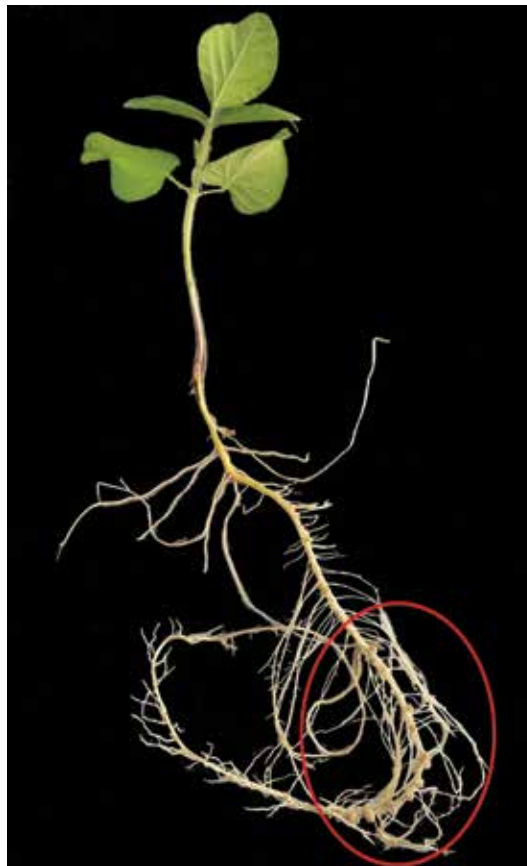


Figura 34. Raiz com nódulos (elipse vermelha), em planta de soja inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* (CNPSO 07) em sistema teste em sacos plásticos de polipropileno para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 35. Visão geral do sistema teste com sacos plásticos de polipropileno para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas de soja em casa de vegetação. Cada caixa representa um inoculante, suas diluições e replicatas.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 36. Visão geral do sistema teste com sacos plásticos de polipropileno para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas de soja em casa de vegetação após 25 dias de inoculação.

✓ Montagem de Vasos de Leonard

Os vasos de Leonard consistem em um sistema composto por um reservatório para solução nutritiva e outro para o suporte das plantas. Para a montagem de vasos de Leonard podem ser utilizadas garrafas comuns de vidro cortadas (Figura 37), sistema que será explicado aqui. Mas podem ser usadas também caixas de plástico, garrafas pet, ou de outros materiais, seguindo os princípios do vaso de Leonard, conforme descrito em literaturas clássicas, como em Vincent (1970).

Para montar um vaso de Leonard utilizando “garrafas de vinho” de aproximadamente 750 mL, são utilizadas duas garrafas para produzir o conjunto composto de reservatório para a solução nutritiva e o outro para o suporte das plantas. No caso de “garrafas de vinho”, para o reservatório da solução nutritiva, as

Foto: Rinaldo B. Conceição



Figura 37. Garrafa de vidro cortada para a montagem do vaso de Leonard utilizado na análise de Número Mais Provável de infecção em plantas.

garrafas são cortadas a, no mínimo 12 cm de altura, aproximadamente, a partir da base. Para a obtenção do reservatório destinado ao suporte das plantas, que conterà o substrato, cortam-se os fundos das garrafas, a, no mínimo 23 cm da base, aproximadamente, de forma a se obter uma forma de “taça”, fechando-se os gargalos com rede plástica de malha fina ou tecido de algodão, como por exemplo, compressa de gaze 100% algodão, 11 fios/cm². Uma vez obtidas as duas peças, posiciona-se uma sobre a outra, como ilustrado (Figura 38). Para as alturas de corte de outros tipos de garrafas, seguir as mesmas proporções empregadas às “garrafas de vinho”.

Foto: Rinaldo B. Conceição



Figura 38. Sistema teste em vasos de Leonard para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas composto por garrafa de vidro com reservatório para substrato e reservatório para solução nutritiva para plantas.

O substrato utilizado poderá ser areia, ou uma mistura de areia e carvão. Um bom resultado para o crescimento de plantas tem sido obtido em vasos com uma mistura de areia e carvão moído a 2:1 (v:v) (Figuras 39 e 40).

A areia a ser usada nos vasos de Leonard deve estar isenta de nitrogênio e de qualquer elemento que possa causar toxidez às plantas. Dessa forma, preliminarmente, a areia deve ser lavada com água corrente até que fique límpida e, em seguida, imergir em solução de ácido clorídrico 5% (HCl 5%), com a finalidade de lavagem química e remoção de possíveis elementos químicos tóxicos, como elementos traços (Ets) ou outras impurezas (Cheng; et al., 2011), durante cerca de 5 horas, com agitação ocasional. A seguir, drenar o ácido e lavar com água corrente até a completa eliminação do ácido e, por último, lavar com água deionizada.

Colocar a areia para secagem em bandejas apropriadas, em temperatura ambiente, em local limpo e reservado, para evitar contaminações cruzadas. A areia lavada e seca pode ser armazenada em sacos de polietileno.

Tradicionalmente tem sido usada mistura de areia e vermiculita e não areia e carvão. Contudo, com frequência a vermiculita traz problemas de toxidez, ainda que passe pelo mesmo tratamento especificado aqui para a areia.



Figura 39. Areia e carvão moído na proporção de 2:1 (v:v), para o preparo de substrato para a composição de vasos de Leonard.



Figura 40. Resultado da mistura de areia e carvão moído 2:1 (v:v) no preparo de substrato para a composição de vasos de Leonard.

No vaso de Leonard, preencher o reservatório destinado ao suporte de plantas com o substrato escolhido até, aproximadamente, faltando 2 cm da borda do vaso (Figuras 38 e 41) dependendo do tamanho dos vasos e no reservatório inferior, adiciona-se quantidade suficiente de solução nutritiva isenta de nitrogênio (Anexo B) para umedecer o substrato (Figura 42).

Recobrir a parte superior dos vasos com um saco de papel e a parte inferior envolver em papel tipo “kraft” antes da esterilização em autoclave a 121 °C, por 120 minutos (Figura 43). O objetivo do recobrimento é proteger o conjunto de contaminações após a retirada da autoclave. Na parte inferior, visa também proteger da entrada de raios solares para evitar o crescimento de algas e favorecer o crescimento de raízes.

Após a esterilização, transferir os vasos para a casa de vegetação e efetuar o transplante de sementes pré-germinadas, preenchendo o reservatório com solução nutritiva isenta de nitrogênio, repondo-a quando necessário, para garantir um bom desenvolvimento das plântulas.

É possível também conduzir o ensaio realizando a semeadura diretamente no vaso, sem pré-germinação. Contudo, há o risco de problemas de germinação, ou sementes com diferenças no vigor, o que pode resultar em falhas ou plântulas desuniformes. Com o

uso de sementes pré-germinadas é possível escolher as mais uniformes para o transplante. Se optar pela germinação direta, semear o dobro das sementes e, após a emergência, realizar o desbaste, deixando uma ou duas plantas mais vigorosas.

Após o devido preparo dos vasos, inocular alíquotas de 1 mL das diluições desejadas em triplicata, até dois dias após o transplante das sementes pré-germinadas e manter as unidades em casa de vegetação durante a condução do ensaio. Essa análise também pode ser realizada com quatro ou cinco réplicas.

A limpeza e a manutenção da casa de vegetação devem ser frequentes e a temperatura máxima não deve ultrapassar 28–30 °C para o caso da maioria das espécies utilizadas no Brasil.

Fotos: Rinaldo B. Conceição



Figura 41. Suporte de plantas demonstrando a quantidade de substrato adicionada até, aproximadamente, 2 cm da borda do vaso para compor o sistema teste em vasos de Leonard para análise de Número Mais Provável (NMP) de infecção em plantas.



Figura 42. Sistema teste para análise do Número Mais Provável (NMP) por infecção em plantas, composto por recipientes de vidro para substrato e reservatório para solução nutritiva (vaso de Leonard) para plantas.



Figura 43. Sistema teste (vasos de Leonard) protegido com papel para esterilização em autoclave.

Efetuar a avaliação da nodulação das unidades cerca de 35 dias após a emergência (Figura 44), ou conforme especificado para cada leguminosa.

Foto: Rinaldo B. Conceição



Figura 44. Visão geral do sistema teste para análise do NMP composto por vasos de Leonard com plantas de soja, após 35 dias da emergência.

Para a estimativa da concentração do número de rizóbios, a última diluição precisa apresentar todas as replicatas negativas e considerar como resultado positivo a presença de pelo menos um nódulo no sistema radicular da unidade teste.

No Apêndice B há um exemplo de cálculo da estimativa da concentração de rizóbios pelo método de NMP.

Método do Número Mais Provável in vitro para Bactérias Diazotróficas Associativas ou Endofíticas

Esse método utiliza um meio de cultura isento de nitrogênio, em que apenas as bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico in vitro podem se desenvolver. Pressupõe-se que o crescimento em meio sem nitrogênio e a formação de uma película no meio semissólido, contendo 1,7 a 2 g L⁻¹ de ágar, confere caráter positivo ao teste, enquanto a ausência de película implica em caráter negativo (Figura 45).

O princípio do meio semissólido é que a bactéria migrará até encontrar a concentração ideal de oxigênio que permita o seu crescimento em meio sem nitrogênio, conhecida como microaerofilia. Nessa condição, há disponibilidade de oxigênio para o crescimento bacteriano, mas não em excesso para causar oxidação da nitrogenase, permitindo adquirir o nitrogênio pelo processo de fixação biológica. A película característica então se forma como resultado do crescimento dos microrganismos diazotróficos na concentração adequada de oxigênio.

As amostras para esse ensaio podem ser constituídas por solo rizosférico, solo não rizosférico, fragmentos de raízes, partes de plantas como folhas e caules, produtos inoculantes contendo bactérias diazotróficas, associativas ou endofíticas, como *Azospirillum* e *Herbaspirillum*.

Para iniciar o teste, realizar a diluição seriada conforme descrito no item Preparo da Série de Diluições Decimais.

Para solo rizosférico, solo não rizosférico, fragmentos de raízes, partes de plantas, como folhas, caules, inoculantes com substrato sólido, pesar 10 g do material a ser testado em frasco de 250–300 mL e adicionar 90 mL de solução fisiológica 0,85% (diluição 10^{-1}).

Em câmara de fluxo laminar, distribuir 5 mL de meio de cultura semissólido (Tabela 1 e Anexo A) em frascos de vidros esterilizados (Figura 46) e deixar esfriar antes da inoculação.

Com o auxílio de uma pipeta regulável com capacidade para 100 μL , transferir uma alíquota de 100 μL de cada uma das diluições 10^{-2} a 10^{-8} ou a 10^{-9} para os frascos contendo o meio de cultura, tomando o cuidado de não os agitar para não desfazer o gel formado pela solidificação do ágar adicionado ao meio de cultura (Figura 47). Utilizar de três a cinco frascos para cada diluição, conforme a disponibilidade. Neste Manual são fornecidas tabelas para três e cinco frascos para cada diluição (Tabelas C4 e C5 - Anexo C).

Com auxílio de uma pinça esterilizada, tampar os frascos com algodão hidrofóbico esterilizado (Figura 48).



Figura 45. Frascos com meio de cultura semissólido isento de nitrogênio (meio NFb, Anexo A) com *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 e com presença de película característica (seta vermelha). O meio contém o corante azul de bromotimol e, com o crescimento de *A. brasilense*, adquire a cor azul decorrente da alcalinização do meio, enquanto que frascos com meio semissólido inoculados com solução fisiológica (NaCl 0,85%), sem crescimento e sem película, possuem coloração verde.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 46. Distribuição de meio de cultivo semissólido NFb (Anexo A) em frascos de vidro esterilizados, para uso na técnica de Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas *in vitro*.

Fotos: Eduara Ferreira



Figura 47. Semeadura de 100 μL de suspensão diluída de bactéria diazotrófica em frascos de vidro com meio de cultivo semissólido NFb (Anexo A) para análise do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas *in vitro*.



Figura 48. Fechamento dos frascos com tampas de algodão hidrofóbico contendo meios de cultivo semissólido NFb (Anexo A) inoculados com a diluição desejada da suspensão de *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 visando a análise de Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas *in vitro*.

Incubar os frascos/tubos em estufa de crescimento a 28 °C, ou na temperatura considerada ideal para cada bactéria, com variação aceitável de +/- 2 °C, por 5 a 7 dias e proceder à leitura dos frascos, determinando o número de células presentes no inóculo com o auxílio das Tabelas C4 e C5 do anexo C.

Considerar como resultado positivo a presença de película nos frascos do teste (Figura 49).



Figura 49. Ensaios de avaliação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas in vitro, em frascos com meio de cultura semissólido NFb (Anexo A) e inoculados com *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V6. Destaque para a presença de película típica (seta vermelha) e frascos controle sem crescimento, que receberam apenas solução fisiológica (NaCl 0,85%), sem a formação de película.

Para eficácia do teste, a última diluição deve apresentar todas as replicatas negativas, para diminuir a subestimação do resultado.

Preparar os controles positivo e negativo para a verificação de interferência por fatores externos. Para compor o controle positivo, pode-se utilizar uma cultura pura de bactéria específica, preparando-se alíquotas e repetições equivalentes às empregadas nas contagens das amostras. O controle negativo poderá ser composto pela solução diluente.

No Apêndice B há um exemplo de cálculo da estimativa da concentração de bactérias diazotróficas associativas ou endofíticas pelo método de NMP.

Método de Recuperação e Quantificação de Rizóbios em Sementes Inoculadas

Para realizar a recuperação e a quantificação de rizóbios em sementes inoculadas, deve-se efetuar o tratamento de sementes, quando for o caso, e a inoculação em 500 a 1000 g de sementes. No caso de tratamento químico, tratar as sementes e deixar secar por 30 min antes de fazer a inoculação.

Para inoculantes turfosos, é necessário utilizar solução açucarada 10% (10 g de açúcar comum em 100 mL de água deionizada), ou adesivos e/ou protetores, de acordo com a especificação de cada teste, ou ainda de acordo com as especificações comerciais para promover a adesão do inoculante às sementes.

Para o tratamento das sementes, colocá-las em uma bolsa de polietileno ou saco plástico com capacidade aproximadamente três vezes maior que o volume a ser tratado. Adicionar as quantidades dos produtos às sementes (Figura 50A), fechar a bolsa e misturar com movimentos rotativos para distribuição homogênea dos produtos (Figura 50B). Deixar secar por duas horas, ou conforme a recomendação específica do ensaio.



Fotos: Eduara Ferreira

Figura 50. Ensaio de recuperação e quantificação de rizóbios em sementes inoculadas. Tratamento de sementes de soja com inoculante líquido (A) e movimentos rotativos da bolsa para distribuição homogênea dos produtos adicionados nas sementes (B).

Para o tratamento das sementes utilizando inoculante líquido, não é necessário adicionar solução açucarada 10%.

Conforme validado no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, é recomendado tomar três subamostras de 100 sementes. Pode-se utilizar um tabuleiro para 100 sementes e calcular a média do peso de 100 sementes de cada lote (Figura 51A). Sendo assim, o peso médio de 100 sementes (Figura 51B), permitindo um desvio na primeira casa decimal, ou seja, de +/- 0,1, (desvio absoluto) será utilizado para a tomada de três subamostras, denominadas “A”, “B” e “C”. Transferir cada uma das subamostras

para um Erlenmeyer estéril com capacidade para 250 mL-300 mL (Figura 51C), contendo 100 mL de solução fisiológica com 0,4 mL de solução estoque de Tween 80 (polioxietileno-norbitano monolaurato) 2,5% p/v (peso volume) (Anexo B) por litro de solução fisiológica 0,85% (Anexo B). Essa diluição representa a diluição 10^0 . O processo de transferência do peso médio de 100 sementes para os Erlenmeyers deve ser realizado em câmara de fluxo laminar, fechando-se os tubos com chumaço de algodão hidrofóbico esterilizado, caso os Erlenmeyers não sejam de tampa rosqueáveis.

Em seguida, agitar em agitador orbital (Figura 51D) a, aproximadamente, 150 rpm, por 15 minutos. Em câmara de fluxo laminar, tomar alíquota de 1 mL da diluição 10^0 (Figura 51E) e transferir para frasco estéril contendo 9 mL de solução fisiológica 0,85%, obtendo-se a diluição 10^{-1} (Figura 51F). Agitar em agitador de tubos por, aproximadamente, 20 segundos. Repetir a operação anterior (Figura 51G) até obter a diluição 10^{-4} para semeadura em placas de Petri (Figuras 51H e 51I), ou seja, inocular as diluições 10^{-2} a 10^{-4} em triplicata, ou até a diluição desejada, de acordo com a especificação do fabricante do produto. Caso a análise seja realizada após o dia do tratamento das sementes, inocular as diluições 10^{-1} a 10^{-3} , ou 10^0 a 10^{-2} , conforme a recomendação do ensaio e a previsão de recuperação celular.

Em cada procedimento de transferência de alíquota de 1 mL, descartar a ponteira utilizada e agitar o frasco em agitador de tubos por 20 s para homogeneização.

Inocular, em triplicata, 0,1 mL das diluições, pela técnica de espalhamento (Figura 51J), conforme descrito no item Método por Espalhamento em Meio de Cultura, em placas de Petri, contendo meio de cultura YMA (Anexo A), adicionado das soluções de vancomicina (cloridrato de vancomicina) e actidione (cicloheximida) (Anexo B), com o objetivo de inibir o crescimento de contaminantes. Após a inoculação das diluições, incubar as placas em posição invertida, em estufa de crescimento, com temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por sete dias.

Efetuar a contagem e os cálculos de acordo com o item Método por Espalhamento em Meio de Cultura, no entanto, utilizando três subamostras, calcular a média, considerando a triplicata.

O método de recuperação e quantificação de rizóbios em sementes inoculadas também pode ser realizado utilizando o método de gotejamento (Brasil, 2010), conforme o item Método por Gotejamento.



Fotos: Eduara Ferreira

Figura 51. Etapas do ensaio de recuperação e quantificação de rizóbios em sementes inoculadas. Tabuleiro contendo 100 sementes de soja para o cálculo do peso médio (A), tomada de subamostras utilizando o peso médio de 100 sementes (B), transferência das subamostras “A”, “B” e “C” para Erlenmeyer contendo solução diluente estéril (C), agitador orbital e Erlenmeyers contendo sementes inoculadas (D), tomada de alíquota da diluição 10^0 (E), transferência da alíquota da diluição 10^0 para frasco com solução diluente estéril, obtendo-se a diluição 10^{-1} (F), transferência da alíquota da diluição 10^{-1} para frasco com solução diluente estéril, formando a diluição 10^{-2} (G), tomada de alíquota da diluição 10^{-2} para inoculação em meio de cultura (H), inoculação de 0,1 mL da alíquota da diluição 10^{-2} para placas de Petri com meio de cultura (I) e espalhamento do inóculo com alça plástica em formato T estéril, em placas de Petri contendo meio de cultura (J).

Análise de Identidade Genética

O uso de uma estirpe de microrganismo considerada como elite em algum processo microbiano, por exemplo, fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fosfato, entre outros, representa o resultado de um árduo trabalho de pesquisa e validação. Com o avanço em técnicas de biologia molecular, essas estirpes são identificadas facilmente em nível de gênero ou espécie por sequenciamento do DNA, com ênfase no genoma. Contudo, identificar inequivocadamente a estirpe é crítico tanto em estudos de taxonomia, filogenia, ecologia, diversidade, quanto na produção e no controle de qualidade de inoculantes.

A análise de regiões intergênicas repetitivas do DNA (Versalovic et al. 1991; de Bruijn, 1992; Versalovic et al., 1994), também conhecida por rep-PCR tem, por mais de três décadas, mostrado grande eficiência para a identificação de estirpes, sendo adotada como método oficial pela Instrução Normativa N° 30, de, 12 de novembro de 2010 (Brasil,

2010). Outros métodos moleculares, por exemplo, desenvolvimento de *primers* específicos, podem ser utilizados. Neste manual, porém, será descrito o método de rep-PCR com os *primers* BOX (BOX-PCR) e outros *primers* para amplificação de regiões repetitivas intergênicas, conforme consta da IN nº 30.

A identificação de estirpes por perfil de DNA compreende as seguintes etapas:

- ✓ Extração de DNA;
- ✓ Avaliação da concentração e da pureza do DNA;
- ✓ Reação de PCR (Reação em cadeia da polimerase);
- ✓ Eletroforese;
- ✓ Interpretação dos Resultados.

- ✓ Extração de DNA

Inocular cada estirpe de bactéria em 10 mL de meio de cultura específico e incubar por 1 a 10 dias, dependendo da taxa de crescimento da bactéria, que pode ser rápida, de 1 a 3 dias, a muito-lenta, aproximadamente 10 dias. Cultivar a bactéria com agitação orbital a, aproximadamente, 100 rpm em temperatura de 28 °C +/- 2 °C, ou na temperatura adequada para a estirpe. Aguardar o crescimento até que o meio de cultura apresente turbidez (Tabela 2).

Tabela 2. Microrganismos e meios de cultivo utilizados para o preparo das suspensões de células bacterianas.

Microrganismo	Meio de cultivo ⁽¹⁾	Tempo de incubação
<i>Bradyrhizobium</i> spp. ⁽²⁾	YM	3–5 dias
<i>Rhizobium</i> spp. ⁽³⁾	YM	2–3 dias
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TSB	1–3 dias
<i>Priestia/Bacillus</i> spp. ⁽⁴⁾	TSB	1 dia
<i>Azospirillum brasilense</i>	DYGS	2–3 dias

⁽¹⁾ YM (*Yeast-Manitol*, extrato de levedura-manitol); TSB (*Tryptic Soy Broth*); DYGS (*Dextrose, Yeast, Glucose, Sucrose*) (Composição no Anexo A).

⁽²⁾ Inclui as espécies *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Bradyrhizobium yuanningense*.

⁽³⁾ Inclui as espécies *Rhizobium freirei* e *Rhizobium tropici*.

⁽⁴⁾ Inclui as espécies *Priestia* (= *Bacillus*) *aryabhatai*, *Priestia* (= *Bacillus*) *megaterium* e *Bacillus subtilis* – CNPSo 2657 e *Bacillus subtilis* – CNPSo 4269.

Um procedimento clássico de extração do DNA foi descrito por Hungria et al. (2008) e adotado pela IN nº 30 do Mapa (Brasil, 2010). Contudo, em 2018, o Mapa autorizou, por meio da IN nº 14, de 13 de abril de 2018, o uso de kit de extração do DNA, o que facilita

a análise (Brasil, 2018). No caso de uso de kits de extração do DNA (Figura 53A), seguir o procedimento de acordo com as instruções do manual do fabricante.

Após a extração, a amostra poderá ser armazenada em refrigerador ou freezer para as etapas posteriores de análise.

A extração também pode ser feita a partir da cultura pura em placa de Petri (Figura 53A).

✓ Avaliação da concentração e da pureza do DNA extraído

Preparar o gel pesando 0,4 g de agarose ultrapura (agarose com finalidade de separação em aplicações de eletroforese, baseada em tamanho do ácido nucléico, com resolução de fragmentos de DNA de 500 pb a 12 kb) em Erlenmeyer de 100 mL (ou de acordo com o fabricante para o tamanho do genoma em estudo). Adicionar 50 mL de tampão TBE 1X (Anexo B) e fundir em forno micro-ondas até a completa dissolução. Deixar esfriar (35–38 °C) para não danificar a cuba de acrílico.

Em uma cuba de acrílico, com dimensões aproximadas de 10 x 11 cm, contendo o pente que formará as canaletas para posterior aplicação das amostras, verter a agarose fundida e esperar esfriar até polimerizar e solidificar. Em seguida, retirar o pente e cobrir o gel com tampão TBE 1X (Anexo B).

Utilizar uma alíquota de 2 µL da amostra de DNA extraída com 2 µL de tampão de amostra (Anexo B) e aplicar essa mistura de volume total de 4 µL no poço correspondente no gel.

Correr as amostras a 60 V por 30 minutos, ou tempo suficiente para que haja uma corrida de, aproximadamente, 5 cm. Após a corrida, retirar o gel da cuba e mergulhar o gel em solução de brometo de etídio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) 10mg/mL (Anexo B) por, aproximadamente, 10 a 15 minutos.

Descorar o gel em água deionizada por, no mínimo, 30 minutos e visualizar em um transluminador sob luz ultravioleta (luz UV-B com comprimento de onda na faixa de 302–312 nm). Fotografar para fins de registro.

A pureza do DNA pode ser verificada no gel, pela visualização de uma única banda de DNA, sem qualquer tipo de arraste. A concentração de DNA deverá ser padronizada utilizando marcador de massa molecular, como por exemplo, o marcador *Low DNA mass*[®], de acordo com as instruções do fabricante (Figura 52).

Foto: Renan A. Ribeiro

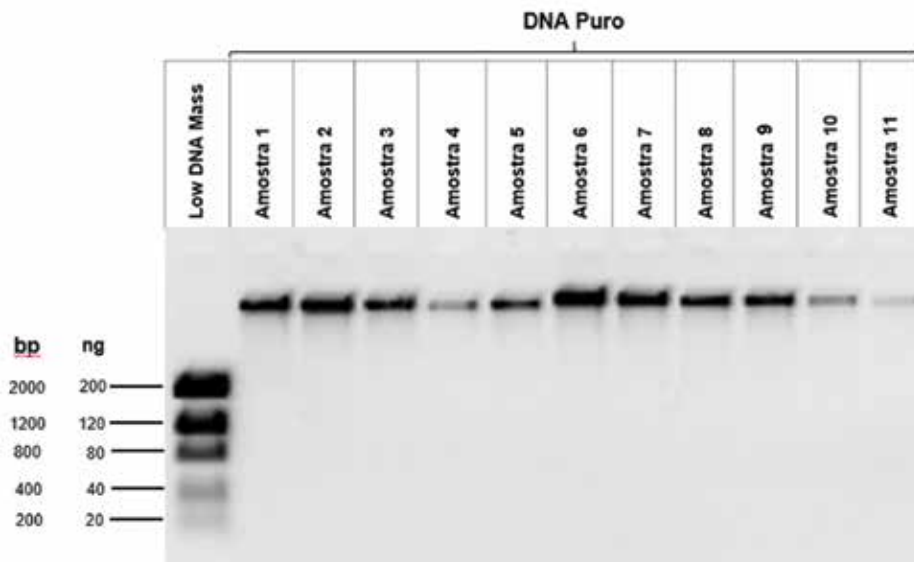


Figura 52. Gel de agarose 1% contendo marcador de peso molecular, *Low DNA mass*® (Invitrogen - Ref.10068013), na concentração de 20 a 200 ng μL^{-1} e amostras de DNA puro para padronização da concentração. Legenda: bp: pares de base; ng: nanograma

Para a padronização, comparar as bandas do marcador com a amostra, e a concentração do DNA da amostra deve estar entre 30–80 ng μL^{-1} . Caso necessário, utilizar água ultrapura como diluente, repetindo o procedimento até chegar na concentração desejada. Armazenar em freezer comum (abaixo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Nota: Água ultrapura: Água para PCR livre de DNase e RNase, filtrada em membrana de 0,1 μm . De acordo com a Norma Britânica, British Standard – BS EM ISO 3696: 1995, classifica-se como grau 1 (condutividade elétrica de até 0,01 mS m^{-1} a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$), água livre de substâncias iônicas e coloidais dissolvidas e contaminantes orgânicos, adequada para os mais rigorosos requisitos analíticos, produzida pelo tratamento adicional de água de grau 2, por sistemas, como, deionização ou por osmose reversa, seguida por filtração através de membrana com poro de tamanho máximo de 0,2 μm (British Standards Institution, 1995).

- ✓ Reação de PCR para amplificação de fragmentos genômicos, utilizando o *primer* BOX-A1R

A sequência de bases nitrogenadas do *primer* (oligonucleotídeo) BOX-A1R é a seguinte: 5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3'.

Antes de iniciar a manipulação das amostras, limpar cuidadosamente a superfície

da bancada de trabalho e as pipetas externamente com álcool etílico a 70%, e retirar os reagentes armazenados no freezer para descongelamento.

Preparar uma mistura (mix) na qual, para cada reação de PCR-BOX, serão adicionados os reagentes descritos na Tabela 3. Por cautela, sempre ao preparar o mix calcular três reações a mais, sendo que uma reação será para o controle positivo com DNA da estirpe padrão, como por exemplo, *B. japonicum* CNPSo 07 (=SEMIA 5079) e a outra para o controle negativo, isto é, o branco, sem DNA e, finalmente, a última como reação sobressalente.

Tabela 3. Quantidade e componentes para o preparo da mistura (mix) para uma reação de PCR-BOX.

Quantidade	Componentes
13,8 µL	água ultrapura esterilizada ⁽¹⁾
1,5 µL	solução de MgCl ₂ ⁽¹⁾ 50 mmol L ⁻¹
5,0 µL	solução de dNTPs ⁽¹⁾ (estoque com 1,5 mmol L ⁻¹ de cada base)
2,5 µL	tampão 10x para <i>Taq</i> polimerase ⁽¹⁾
1,0 µL	solução de primer BOX-A1R (50 pmol µL ⁻¹)
0,2 µL	<i>Taq</i> polimerase (5 U µL ⁻¹) ⁽¹⁾

Fonte: Brasil (2010). Nota: Os componentes constam no Anexo B.

⁽¹⁾ Disponíveis comercialmente.

Homogeneizar a mistura (por pipetagem) e transferir 24 µL para um tubo de PCR (microtubo de polipropileno, livre de DNase e RNase) de 0,2 mL. Adicionar, em cada tubo de PCR (Figura 53B), 1,5 µL de DNA molde (totalizando 25,5 µL), cuja concentração esteja ajustada entre 30 e 80 ng µL⁻¹. Colocar os tubos de PCR em um termociclador (Figura 53C) e programar os ciclos de acordo com a Tabela 4. Cabe salientar que, dependendo do equipamento utilizado, otimizações de temperatura podem melhorar os perfis de DNA, sendo necessária a validação das alterações.

Tabela 4. Descrição do ciclo, tempo, temperatura e número de repetições para a programação da reação em cadeia da polimerase em termociclador para o *primer* BOX-A1R.

Etapa	Descrição	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Repetição
1	Desnaturação inicial	7	95	1 vez
2	Desnaturação	1	94	
3	Anelamento	1	53	30–35 vezes
4	Extensão	8	65	
5	Extensão final	16	65	1 vez
6	Manutenção	-	4	1 vez

Fonte: Brasil (2010).

✓ Eletroforese

Preparar o gel de agarose ultrapura para a corrida da amostra pesando 3,75 g em um Erlenmeyer de 500 mL. Em seguida, adicionar 250 mL de TBE 1X (Anexo B) e fundir em forno micro-ondas até a agarose se dissolver por completo. Deixar esfriar e verter na bandeja da cuba com as dimensões 20 x 25 cm, ou dimensões aproximadas, já que são medidas que facilitam a separação e visualização de bandas, contendo o pente que formará as canaletas para posterior aplicação das amostras. Esperar até solidificar e, em seguida, retirar o pente. Transferir a bandeja com o gel para a cuba de eletroforese e cobrir o gel com tampão TBE 1X até a corrida da amostra.

Para a corrida, adicionar ao DNA amplificado 5 µL de tampão de amostra (Anexo B) (Figura 53D) aos 25,5 µL de cada reação e aplicar as amostras nas canaletas do gel (Figura 53E), com exceção da primeira, da central e da última canaletas, onde será aplicada a quantidade indicada no manual do fabricante de um padrão de peso molecular, por exemplo, o padrão *1 Kb plus DNA Ladder*TM (InvitrogenTM). Preparar o padrão de peso molecular conforme orientações do manual de instruções do fabricante.

Aplicar as amostras sequencialmente nas canaletas, incluindo entre elas a do tubo de controle negativo, isto é, sem DNA, e a do controle positivo, ou seja, com DNA da estirpe utilizada como padrão ou referência, como por exemplo, a estirpe CNPSo 07 de *B. japonicum*. Aplicar a voltagem de 120 V (aproximadamente 5 V cm⁻¹), por 5 a 6 horas, ou até que falem cerca de 4 cm antes do final do gel.

Terminada a corrida, retirar cuidadosamente o gel da cuba e mergulhar em solução de brometo de etídio (C₂₁H₂₀BrN₃) (Anexo B), entre 10 e 15 minutos. Atenção: é necessário utilizar luvas nitrílicas descartáveis ao manipular brometo de etídio. Após o tempo recomendado, deixar o gel descorando em água deionizada por, no mínimo, 40 minutos.

Há outros corantes disponíveis no mercado que podem ser utilizados. Verificar, pela comparação com a Figura 54, se a visualização com outros corantes é satisfatória.

A visualização deve ser realizada em um transluminador sob luz ultravioleta (Figura 53F). Fotografar para o registro. Na Figura 54 pode ser visualizado o resultado de uma análise de perfil de BOX-PCR. Outros perfis são exemplificados no Apêndice C, Figuras C1 a C5.

A amplificação com o primer BOX é a que mais facilmente discrimina estirpes, por resultar, na grande maioria das vezes, em perfis **únicos** requerendo um único primer. Contudo, caso não seja possível diferenciar estirpes por BOX-PCR, poderão ser usados outros primers rep-PCR, em diferentes combinações:

Fotos: Eduara Ferreira

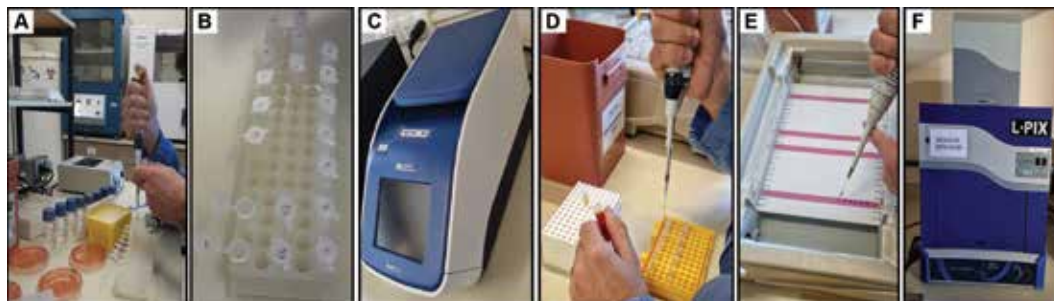


Figura 53. Etapas da análise de identificação de estirpes por perfil de BOX-PCR compreendendo: amostras para extração de DNA utilizando kit de extração de DNA (A), amostras em tubos de PCR para reação de PCR (B), termociclador para amplificação do DNA das amostras (C), DNA amplificado em tubos de PCR e adição de tampão de amostra (D), aplicação das amostras nas canaletas do gel de agarose ultrapura em cuba para eletroforese (E), transluminador para visualização do gel sob luz ultravioleta (F).

Foto: Renan A. Ribeiro

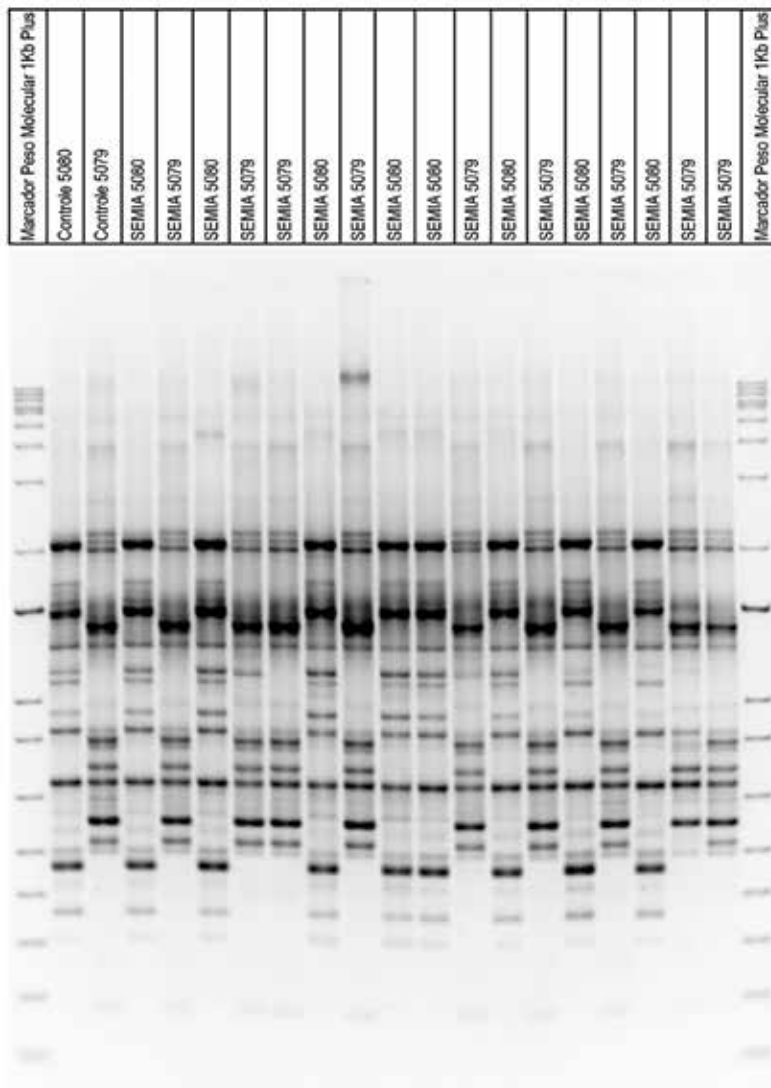


Figura 54. Perfis genéticos por BOX-PCR, peso molecular padrão (marcador 1 Kb plus DNA Ladder™), controle positivo com *Bradyrhizobium diazoefficiens* CNPSO 06 (=SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium japonicum* CNPSO 07 (=SEMIA 5079) e perfis de amostras contendo *Bradyrhizobium diazoefficiens* CNPSO 06 (=SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium japonicum* CNPSO 07 (=SEMIA 5079).

Os pares de primers (REP 1R e REP 2I; ERIC 1R e ERIC 2) apresentam as sequências descritas a seguir:

- ✓ REP 1R -5'-IIIIICGICGICATCIGGC- 3';
- ✓ REP 2I - 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3';
- ✓ ERIC 1R - 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3';
- ✓ ERIC 2 - 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3'.

Todas as etapas serão conforme descrito para a amplificação por BOX-PCR, apenas adicionando 1 µL de cada primer (50 pmol µL⁻¹), conseqüentemente, o volume final de 25 µL levará 1 µL a menos de água ultrapura esterilizada.

Realizar a reação de amplificação de acordo com a programação descrita nas Tabelas 5 e 6,

Como exemplo, para as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense*, uma melhor definição foi conseguida com os primers REP 1R-REP 2I, conforme pode ser verificado na Figura C5 – Apêndice C.

Tabela 5. Descrição do ciclo, tempo, temperatura e número de repetições para a programação da reação em cadeia da polimerase em termociclador para os primers REP 1R e REP 2I.

Etapa	Descrição	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Repetição
1	Desnaturação inicial	7	95	1 vez
2	Desnaturação	1	94	
3	Anelamento	1	53	30–35 vezes
4	Extensão	8	65	
5	Extensão final	16	65	1 vez
6	Manutenção	-	4	1 vez

Fonte: Brasil (2010).

Tabela 6. Descrição do ciclo, tempo, temperatura e número de repetições para a programação da reação em cadeia da polimerase em termociclador para os primers ERIC 1R e ERIC 2.

Ciclo	Descrição	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Repetição
1	Desnaturação inicial	7	95	1 vez
2	Desnaturação	1	94	
3	Anelamento	1	52	30–35 vezes
4	Extensão	8	65	
5	Extensão final	16	68	1 vez
6	Manutenção	-	4	1 vez

Fonte: Brasil (2010).

✓ Interpretação dos Resultados

Recomenda-se que bandas das amostras, comparadas com padrão de peso molecular padrão, por exemplo, *1 Kb plus DNA Ladder*[™] (Invitrogen[™]), iguais ou superiores a 12.000 pares de bases e inferiores a 300 pares de base não sejam consideradas, pois apresentam maior variabilidade.

Em geral, a identidade é facilmente visualizada. Contudo, se necessário, para análise de similaridade de bandas, utilizar software específico para esse fim. Uma plataforma utilizada pelo laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja é o software de bioinformática que gerencia dados microbiológicos chamado “*Bionumerics*” (Bionumerics, 2022), mas o fornecedor está desativando a plataforma para novas aquisições. No entanto, para qualquer software, é possível definir parâmetros para aceitação dos resultados, por exemplo, utilizar, no mínimo, cinco bandas intensas e bem definidas e valor de similaridade genética de 100%, além de adotar o coeficiente de Jaccard com tolerância de 5% para confirmação da identidade de um determinado microrganismo.

No Apêndice C encontram-se, nas Figuras C1 a C5, exemplos de perfis genéticos de BOX-PCR e REP-PCR, resultantes das análises de controle de qualidade realizadas em estirpes depositadas na “Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Soja: Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas”.

Esgotamento

Na rotina de um laboratório de microbiologia, muitas técnicas básicas são necessárias no dia a dia. Sendo assim, embora não conste na legislação brasileira para análise de qualidade de inoculantes microbianos, a técnica de esgotamento é apresentada neste manual para ilustrar o aspecto típico das colônias dos isolados de microrganismos selecionados para esse estudo. A padronização desse procedimento também é importante para a visualização da morfologia das colônias, que representa um primeiro passo para a diferenciação entre estirpes de interesse e contaminantes.

Nesta técnica, uma alça de inoculação estéril (alça de platina) é usada para tomar uma amostra da cultura do microrganismo de interesse, a qual é semeada em estrias na superfície de um meio de cultura específico para o microrganismo em questão. Ao longo da estria, as células são depositadas quando a alça entra em contato com o meio. As últimas células depositadas ao longo da estria são afastadas o suficiente para crescer em colônias isoladas (Tortora et al., 2012).

Para que a inoculação seja bem-sucedida, flambar o fio de platina antes e depois de qualquer operação de semeadura ou inoculação de microrganismos. Aquecer ao rubro o fio de platina e passar a parte inferior do cabo na chama duas a três vezes (Figura 55).

Foto: Eduara Ferreira



Figura 55. Flambagem da alça de platina em bico de Bunsen, levando ao aquecimento do fio de platina ao rubro.

Antes de alçar o material para realizar a semeadura, esfriar previamente a alça próxima à chama ou encostando-a no meio de cultura ainda não estriado, próximo à borda da placa.

Todo o material contendo meio de cultura deve ser aberto perto do bico de Bunsen. Quando o material de estudo for retirado do recipiente de origem, flambar a borda passando-a pela chama do bico de Bunsen, antes e depois da retirada do material.

Procedimento:

Em câmara de fluxo laminar, com uma alça de platina previamente flambada em bico de Bunsen, coletar uma pequena quantidade de cultura da placa/tubo e estriar na superfície do meio de cultura em uma placa. Estriar primeiramente em linhas paralelas, iniciando no alto da placa até, aproximadamente, um quarto da superfície do meio de cultura. Em seguida, flambar a alça de platina novamente em bico de Bunsen e continuar o estriamento de modo perpendicular (girar a placa 90°) ao estriamento anterior, até a mesma altura, repetindo-se o procedimento até quatro a sete séries de estrias. Estriar novamente do mesmo modo. Por fim, estriar a área central da placa com estrias mais espaçadas (Figura 56). Incubar as placas de Petri recém-estriadas em estufa de crescimento, verificar temperatura e tempo de crescimento de acordo com o microrganismo em questão.



Figura 56. *Bradyrhizobium diazoefficiens*, estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) estriada em placas de Petri com meio de cultura YMA (Anexo A).

Coloração de Gram

A técnica de coloração de Gram é um dos métodos mais simples para a caracterização de bactérias, permitindo sua diferenciação em dois grandes grupos, as Gram-positivas e as Gram-negativas. Essa diferenciação se deve às diferenças estruturais entre as paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O grupo das Gram-positivas possui a maior parte da sua parede celular composta por peptidoglicano, um polissacarídeo que confere rigidez a essa estrutura, enquanto que no grupo das Gram-negativas apenas uma pequena parte da parede celular é composta por peptidoglicano. As diferenças estruturais de composição celular resultam em diferentes comportamentos quando expostas a uma sequência de solventes e corantes no procedimento de coloração de Gram (Madigan et al., 2016).

O grupo das Gram-positivas retém o corante cristal violeta após tratar com uma solução de iodo e lavar com solução de álcool etílico e água, ou álcool etílico e acetona, permanecendo com coloração violeta escura. Exemplo desse grupo são as bactérias do gênero *Bacillus*. Por sua vez, as bactérias Gram-negativas perdem a coloração violeta após a lavagem com solução de álcool etílico, o que permite destacar o contra-corante, que pode ser a safranina ou a fucsina. Como exemplo, as bactérias do gênero *Pseudomonas* (Somasegaran et al., 1994) e todas as espécies de rizóbios são Gram-negativas (Hungria e Araujo, 1994).

Procedimento

Preparar uma lâmina apropriada para microscopia óptica, transferindo-se duas ou três colônias para a lâmina com auxílio de uma alça de platina contendo uma gota de solução fisiológica 0,85% (NaCl 0,85%) (Figura 57A). Homogeneizar as colônias com a solução fisiológica 0,85%, com movimentos circulares e delicados sobre a lâmina, com auxílio da alça de platina, de modo a produzir um esfregaço.

Em seguida, deixar secar ao ar e, para fixar melhor as células na lâmina, expor apenas brevemente ao calor da chama do bico de Bunsen, pois o calor excessivo pode danificar as estruturas celulares e prejudicar a visualização ao microscópio (Figura 57B).

O preparo da lâmina para posterior visualização ao microscópio pode ser feito também a partir de uma suspensão de células bacterianas em meio de cultura líquido, transferindo-se para a lâmina aproximadamente 50 µL de suspensão e 50 µL de solução fisiológica 0,85%. Homogeneizar da mesma forma que as colônias e deixar secar ao ar.

Após a secagem e fixação das células, proceder com a coloração propriamente, adicionando-se as soluções na ordem descrita a seguir.

Primeiramente, adicionar a solução de cristal violeta (corante primário) e deixar agir por 1 minutos (Figura 57C).

Em seguida, escorrer o corante da lâmina e adicionar o lugol (solução mordente) e deixar por 1 minutos (Figura 57D).

Lavar levemente a lâmina com água deionizada com auxílio de uma pisseta, deixar escorrer e retirar o excesso de água da parte de trás da lâmina.

Aplicar a solução de descoloração (álcool/água ou álcool/acetona) e lavar até sair todo o corante. De acordo com Somasegaran e Hoben (1994), é indicado lavar por 15–30 segundos, no caso de um esfregaço fino, e 60 segundos, se o esfregaço for espesso.

Logo em seguida, lavar a lâmina com água deionizada e retirar o excesso de água com papel macio absorvente.

Aplicar a solução corante de fucsina ou safranina (contra-corante) por 30 segundos (Figura 57E).

Após 30 s, lavar a lâmina com água deionizada com auxílio de uma pisseta, retirar o excesso de água e deixar a lâmina secar.

Visualizar a lâmina em microscópio óptico em objetiva de 100× com óleo de imersão. O resultado será de acordo com a parede celular bacteriana, ou seja, com base nas diferenças da estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e como elas retêm os corantes.

Fotos: Eduara Ferreira

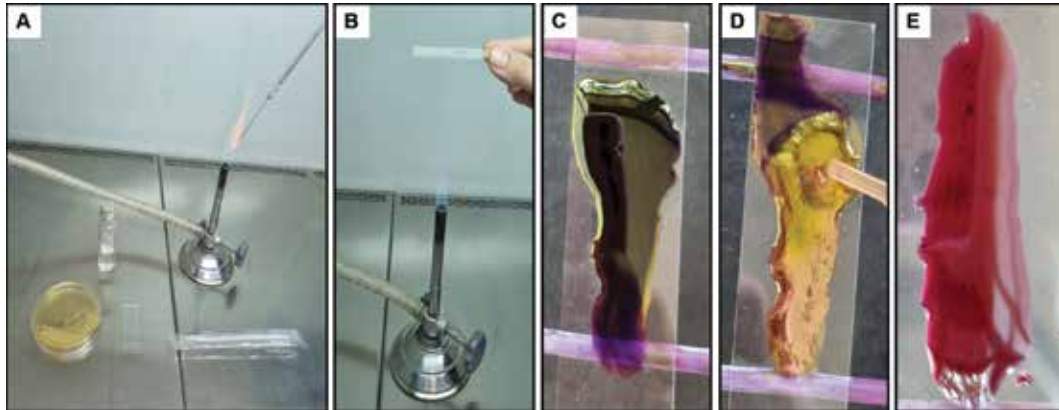


Figura 57. Material e técnica de preparo de lâmina para a coloração de Gram. Placa de Petri com a cultura do microrganismo em meio de cultivo sólido, frasco com solução fisiológica 0,85%, bico de Bunsen, alça de platina, pipeta plástica esterilizada e lâmina para microscopia (A), secagem da lâmina com esfregação de bactérias em bico de Bunsen (B), lâmina com esfregação de bactérias em reagente cristal violeta (C), lâmina com esfregação de bactérias em reagente lugol (D) e lâmina com esfregação de bactérias em reagente fucsina (E).

No Apêndice D encontram-se, nas Figuras D1 a D3, exemplos de coloração de bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.

Embora as soluções possam ser preparadas em laboratório, existem kits disponíveis no mercado contendo todos os reagentes e soluções para a coloração de Gram.

Monitoramento e Verificações dos Equipamentos

Todo e qualquer equipamento, incluindo os instrumentos de medição, reagentes ou aparelhos auxiliares, devem ser constantemente monitorados no laboratório, a fim de garantir a correta utilização e a confiabilidade dos resultados das análises. Dessa forma, verificar se os equipamentos estão em conformidade com sua especificação é primordial para a obtenção de um resultado válido e confiável. Quando aplicável, o equipamento deve ser calibrado, com rastreabilidade metrológica por um laboratório competente para esse fim (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017).

Com o intuito de fornecer um resultado assertivo para as análises de concentração e pureza de inoculantes, equipamentos como balanças e pipetas devem ser calibrados periodicamente. Além disso, as checagens intermediárias nos equipamentos considerados críticos são de extrema importância para garantir a segurança no desempenho e o resultado das análises. São também considerados críticos e que necessitam de verificações periódicas, equipamentos como as câmaras de fluxo laminar e as autoclaves, por exemplo.

No caso das autoclaves, é possível realizar o monitoramento periódico no próprio laboratório, utilizando bioindicadores para a verificação da eficiência do ciclo de autoclavagem. O uso de bactérias esporulantes pode ser uma ferramenta utilizada para o controle de qualidade do processo de esterilização. No mercado estão disponíveis indicadores biológicos compostos pela bactéria *Geobacillus stearothermophilus*, um microrganismo com capacidade de formar esporos resistentes ao calor (Huesca-Espitia et al., 2016). Desta forma, periodicamente incluir, juntamente com a carga a ser esterilizada, indicadores biológicos para checar se a esterilização foi adequada, indicando o funcionamento adequado da autoclave (Figura 58). Outros indicadores que podem ser utilizados como auxiliares na garantia da esterilização do material são os indicadores físicos, como as fitas termossensíveis, que são coladas na superfície do material a ser esterilizado.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 58. Bioindicador para uso em autoclave à base de *Geobacillus stearothermophilus*. Legenda: frasco com cor amarela: esterilização ineficiente; frasco com cor roxa: esterilização eficiente

Para as câmaras de fluxo laminar, a verificação periódica do seu funcionamento pode ser realizada pela exposição de placas de Petri com os meios de cultura com composição adequada para o crescimento de fungos (Ágar Sabouraud Dextrose Agar®) e bactérias (Tryptic Soy Agar®). As placas contendo os meios de cultura são expostas abertas por tempo determinado na câmara em funcionamento (Figura 59) e, a seguir, são incubadas em estufa de crescimento, em temperatura na faixa de 26 a 30 °C, por no mínimo 24 horas, para verificação do possível crescimento de contaminantes. Caso ocorra crescimento microbiano em algum dos meios de cultura, ações corretivas devem ser tomadas, como por exemplo, a troca de filtros que compõem o sistema de filtragem do ar da câmara.

Foto: Eduara Ferreira



Figura 59. Placas de Petri com meio de cultivo Tryptic Soy Agar® (TSA) expostas no interior da câmara de fluxo laminar para monitoramento periódico do equipamento.

Uma análise crítica e detalhada deve ser realizada para cada equipamento periodicamente, estabelecendo limites de aceitação para o uso, sua calibração, tempo de calibração de cada equipamento conforme o uso, e checagens periódicas no próprio laboratório. Medidas de bloqueio para evitar o uso de equipamentos fora da especificação devem ser tomadas. Todo o pessoal técnico deve ser treinado para a operação correta dos equipamentos, minimizando chances de mau uso dos mesmos. A adoção de programas de melhoria contínua, de calibração com análise crítica dos resultados da calibração e de manutenções preventivas é de grande importância, assim como o estabelecimento de procedimentos contemplando ações corretivas e preventivas de trabalhos não conformes, como parte do sistema de gestão de riscos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 63-94.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO/IEC 17025**: requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. Rio de Janeiro, 2017.
- BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **BS EN ISO 3696: 1995**: Water for analytical laboratory use: Specification and test methods. [S. l.], 1995.
- BERGERSEN, F. J. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Chichester: John Wiley & Sons, 1980. 712 p.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M. **Controle de qualidade e conformidade de produtos e fermentados à base de *Bacillus* spp.**: proposta metodológica. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2022. (Embrapa Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 59). ISSN 1516-8638.
- BIONUMERICS. **Bionumerics**: one universal platform to store and analyze biological data. Sint-Martens-Latem, 2022. Disponível em:
<https://www.applied-maths.com/bionumerics..> Acesso em: 12 nov. 2022.
- BRASIL. Lei nº 6894, de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas, destinados à agricultura, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 17 dez. 1980. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacoes>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- BRASIL. Lei nº 6934, de 13 de julho de 1981 Altera a Lei 6894 de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes, destinados a agricultura, e da outras providências. **Diário Oficial da União**, seção 1, 15 jul. 1981. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacoes>. Acesso em: 11 jul. 2022.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análises de Sementes**. Brasília: MAPA, 2009. 399 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza. **Diário Oficial da União**, seção 1, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 13, de 24 de março de 2011. Aprova as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial União**, seção 1, p. 3-7, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 14, de 13 de abril de 2018. Altera os arts. 4º, 21, 35 e o Anexo da Instrução Normativa SDA nº 30, de 12 de novembro de 2010. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, edição 72, seção 1, p. 3, 2018.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Programa nacional de bioinsumos e o conselho estratégico do programa nacional de bioinsumos. **Diário Oficial da União**, edição 100, seção 1, p. 105, 2020.

BRASIL. Secretaria Especial de Assuntos Estratégicos. **Plano nacional de fertilizantes 2050 (PNF 2050)**. Brasília, 2021. v. 1, p. 195.

BRASIL. Portaria MAPA Nº 471, de 10 de agosto de 2022. Plano setorial para adaptação à mudança do clima e baixa emissão de carbono na agropecuária – abc+ para o período de 2020-2030. **Diário Oficial da União**, edição 152, seção 1, p. 10, 2022.

BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J. Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. **Biochemical Journal**, v. 125, n. 4, p. 1075-1080, 1971.

CASSÁN, F.; PENNA, C.; CREUS, C.; RADOVANCICH, D.; MONTELEONE, E.; SALAMONE, I. G.; DI SALVO, L.; MENTEL, I.; GARCÍA, J.; PASARELLO, M. C. M.; LETT, L.; PUENTE, M.; CORREA, O.; VALERIO, K. P.; MASSA, R.; CATAFESTA, M.; ROSSI, A.; DÍAZ, M.; RIGHES, S.; CARLETTI, S.; CÁCERES, E. R. **Protocolo para el control de calidad de inoculantes que contienen *Azospirillum* sp.** Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2010. 13 p. (Documento de Procedimientos de la REDCAI - Red de Control de Calidad de inoculantes, n. 2).

CHENG, S. F.; HUANG, C. Y.; TU, Y. T. Remediation of soils contaminated with chromium using citric and hydrochloric acids: the role of chromium fractionation in chromium leaching. **Environmental Technology**, v. 32, n. 8, p. 879-889, 2011.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SHLEIFER, K. (ed.). **The Prokaryotes**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 2236-2253.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D. **Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 38 p. (Embrapa-CNPA. Documentos, 110). (ISSN 0104-6187).

FUKAMI, J.; ABRANTES, J. L. F.; DEL CERRO, P.; NOGUEIRA, M. A.; MEGÍAS, M.; OLLERO, F. J.; HUNGRIA, M. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 47-56, 2018.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Baltimore: USA: Williams & Wilkins, 1993. 787 p.

HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (ed.). **Working with rhizobia**. Canberra: Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016. 312 p.

HUESCA-ESPITIA, L. C.; SUVIRA, M.; ROSENBECK, K.; KORZA, G.; SETLOW, B.; LI, W.; SETLOW, P. Effects of steam autoclave treatment on *Geobacillus stearothermophilus* spores. **Journal of Applied Microbiology**, v. 12, p. 1300-1311, 2016.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 542 p.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008. 12 p. (Embrapa Soja. Comunicado Técnico, 79).

HUNGRIA, M.; O'HARA, G. W.; ZILLI, J. E.; ARAUJO, R. S.; DEAKER, R.; HOWIESON, J. G. Isolation and growth of rhizobia. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (ed.). **Working with rhizobia**. Canberra: Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016. p. 39-60.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016. 987 p.

O'HARA, G. W.; HUNGRIA, M.; WOOPER, P.; HOWIESON, J. G. Counting rhizobia. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (ed.). **Working with rhizobia**. Canberra: Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 2016. p. 109-124.

OKON, Y.; ALBRECHT, S. L.; BURRIS, R. H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 85-88, 1977.

RELARE (Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), 13., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212 p. (Embrapa Soja. Documentos, 290). Organizado por Rubens José Campo, Mariângela Hungria.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: methods in legume *Rhizobium* technology**. New York: Springer-Verlag, 1994.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 912 p.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequence in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F. J.; LUPSKY, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (International Biological Programme. Handbook, nº 15).

APÊNDICES

APÊNDICE A

Ilustrações do Crescimento Típico das Estirpes em Meio de Cultura

Fotos: Antonio Neto

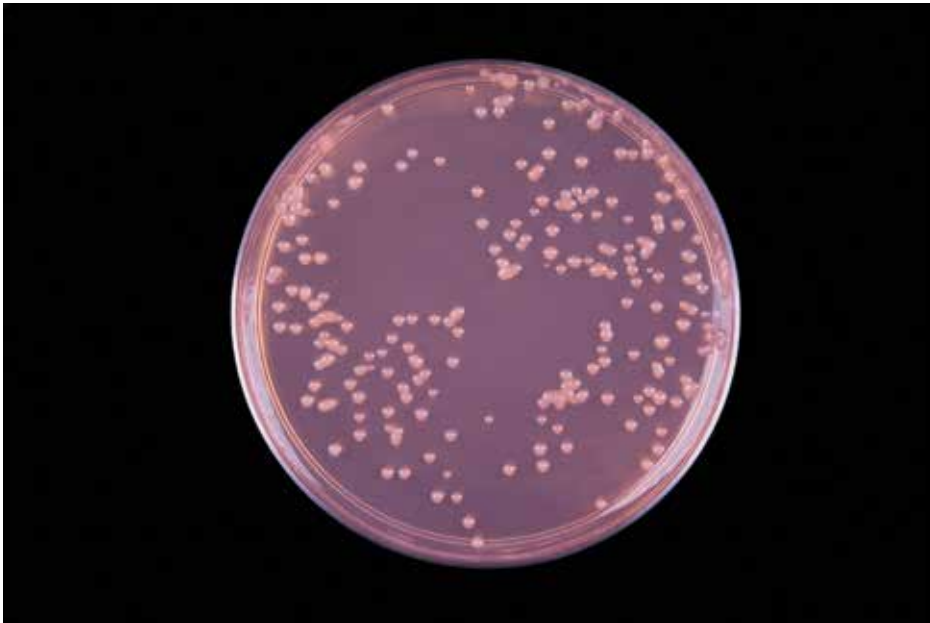


Figura A1. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPS06 (=SEMIA 5080) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

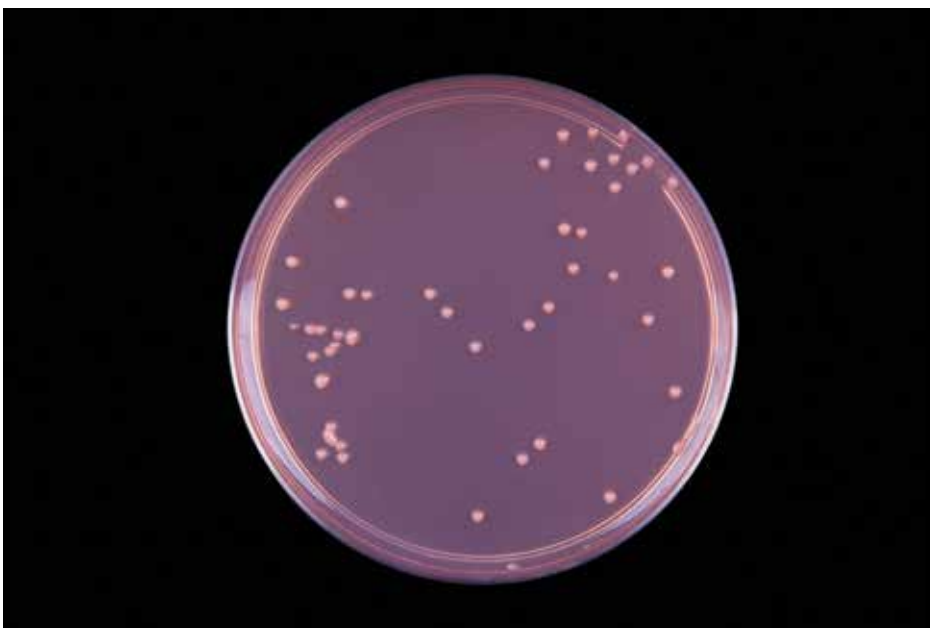


Figura A2. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPS06 (=SEMIA 5080) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A3. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

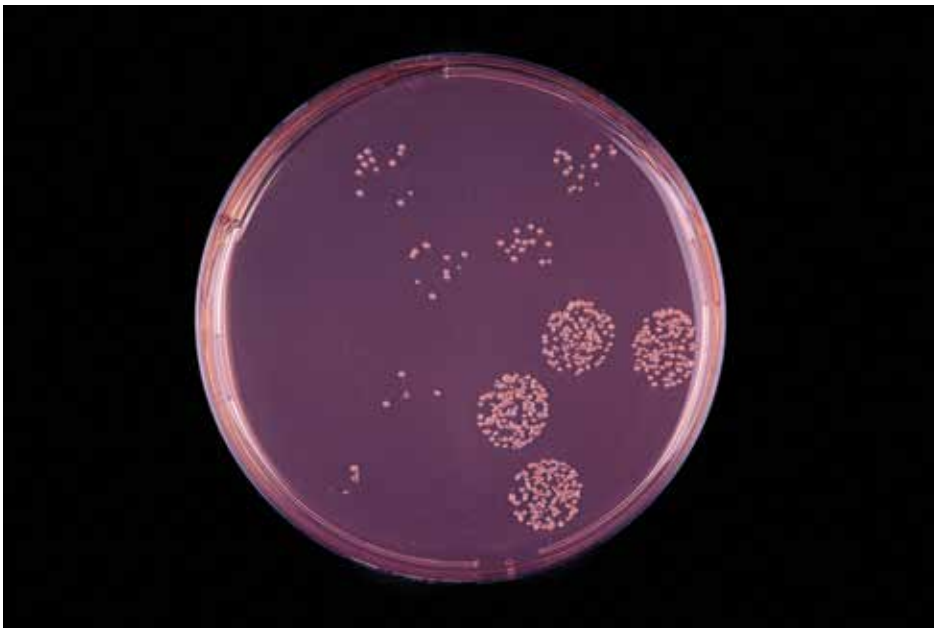


Figura A4. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (duas gotas de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}). Sem crescimento em um setor.

Fotos: Antonio Neto

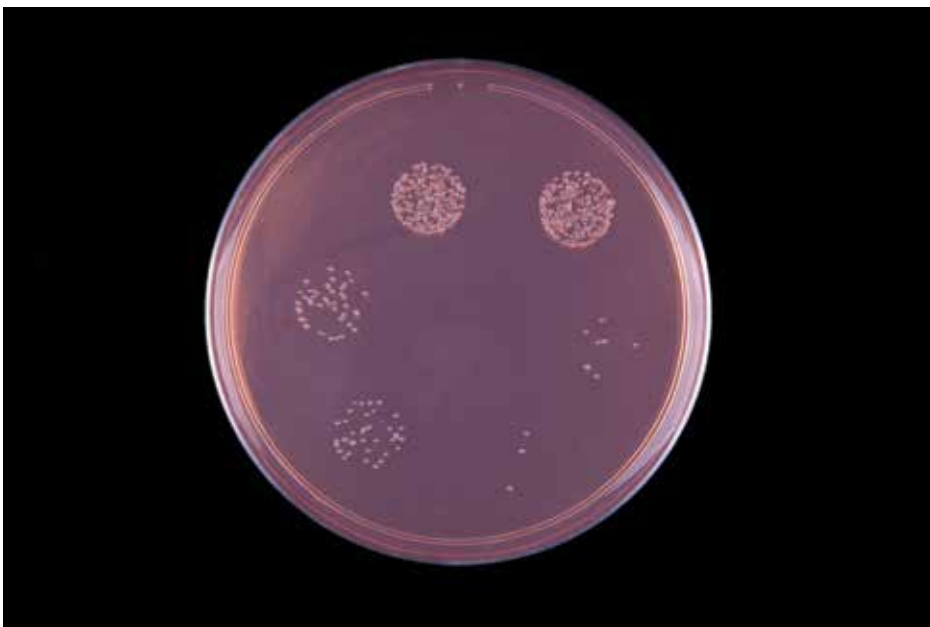


Figura A5. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

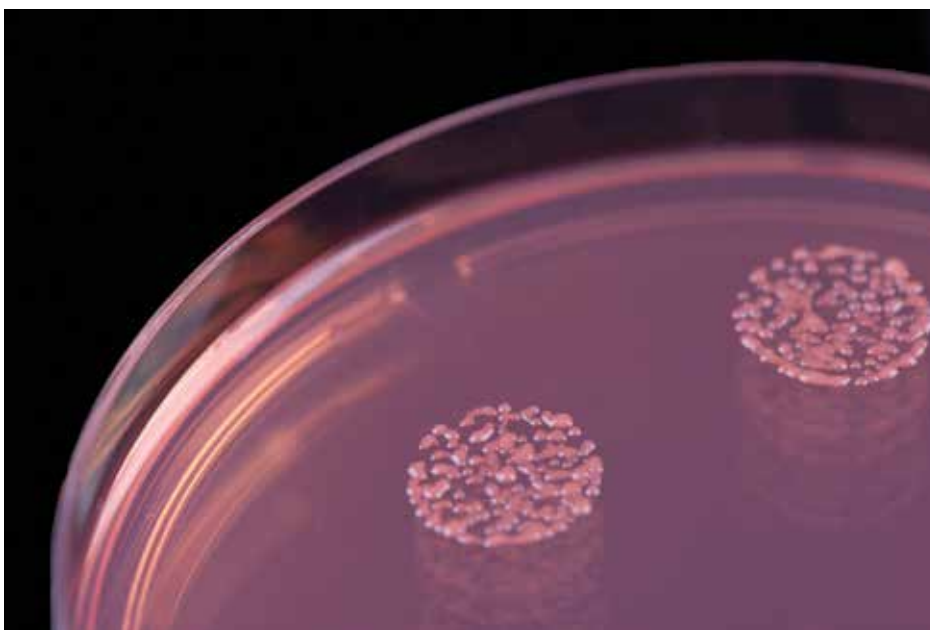


Figura A6. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor).

Fotos: Antonio Neto



Figura A7. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

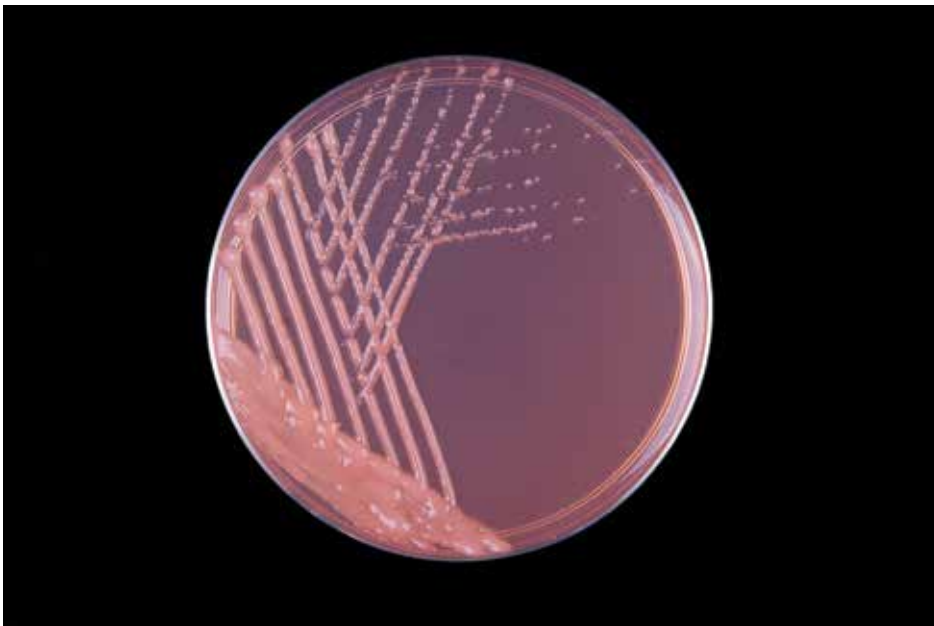


Figura A8. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A9. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

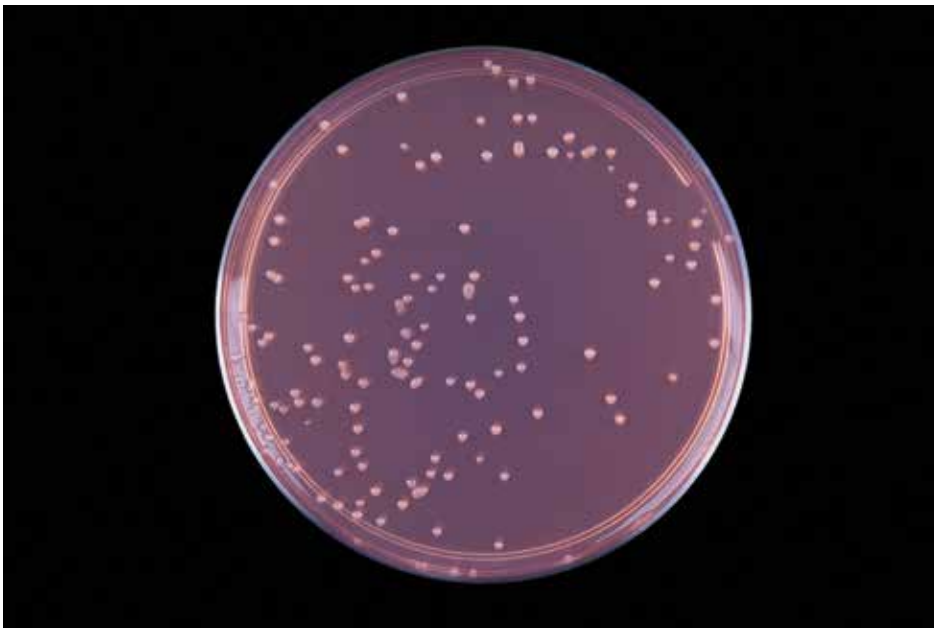


Figura A10. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

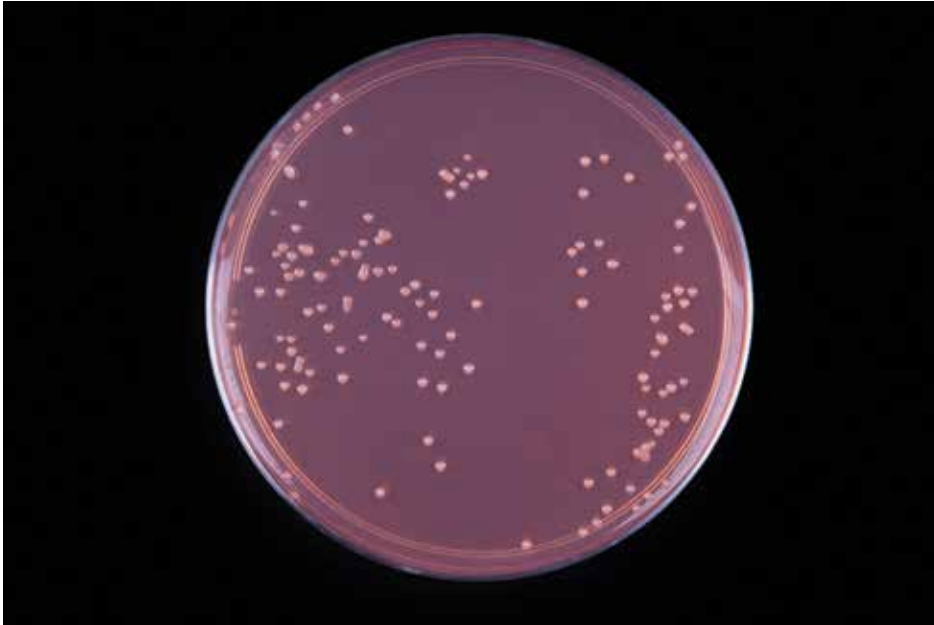


Figura A11. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A12. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

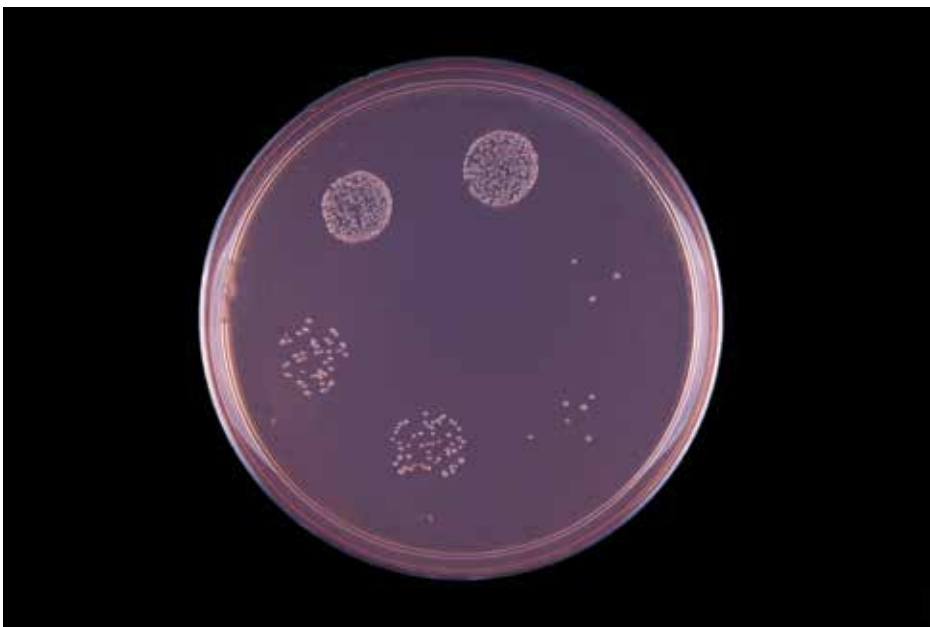


Figura A13. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

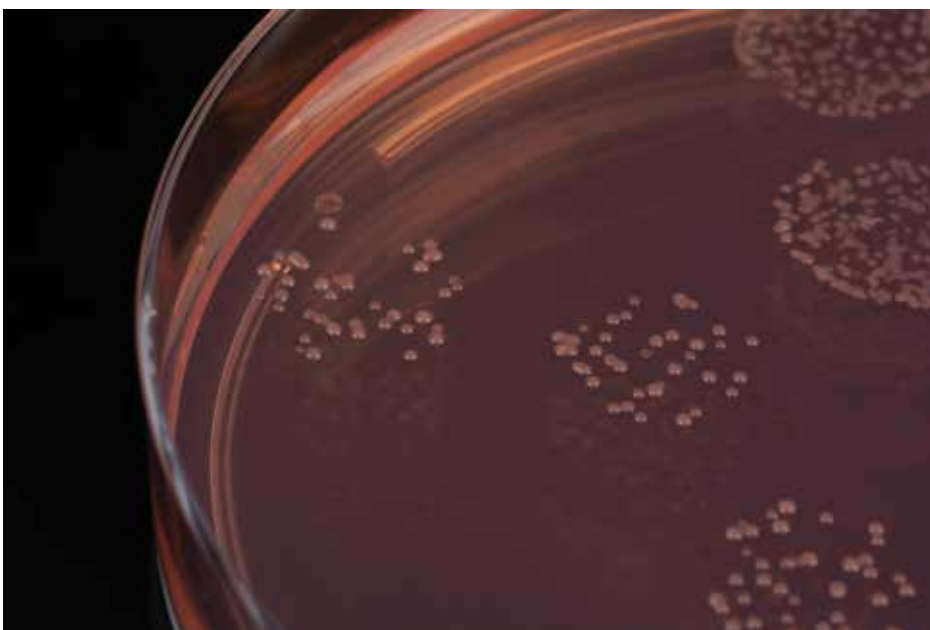


Figura A14. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (duas gotas de 30 μ L por setor).

Fotos: Antonio Neto

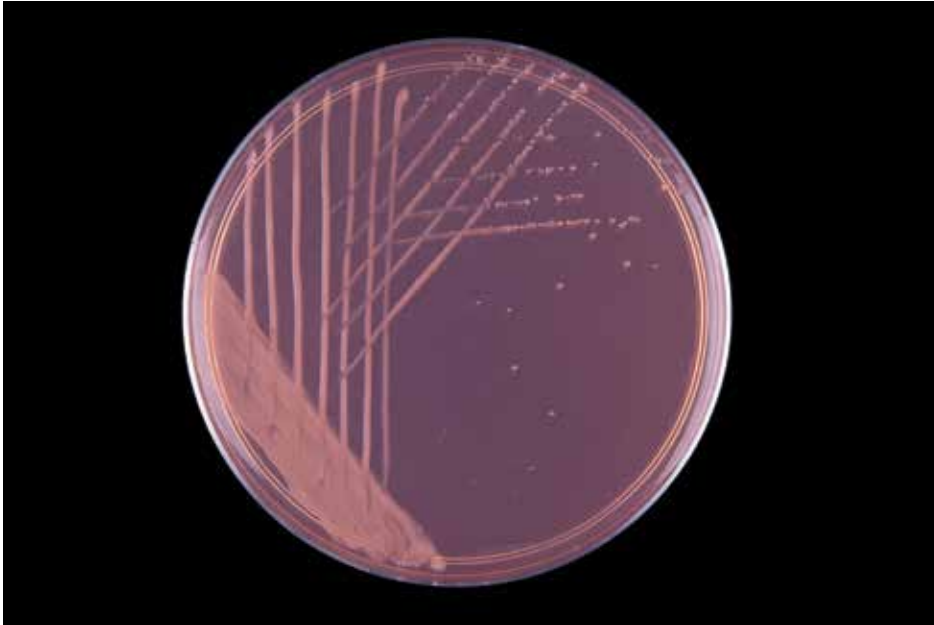


Figura A15. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A16. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto

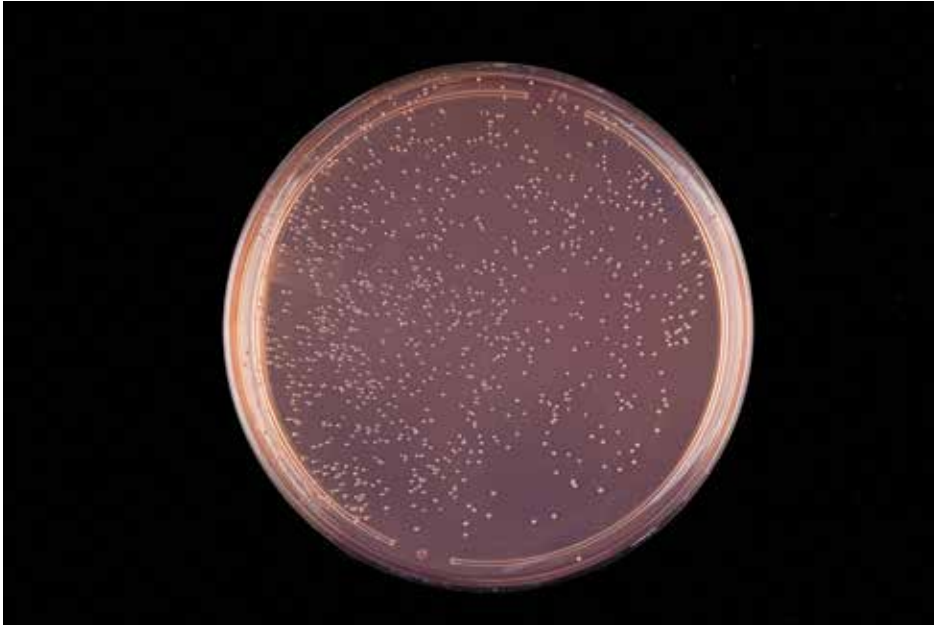


Figura A17. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

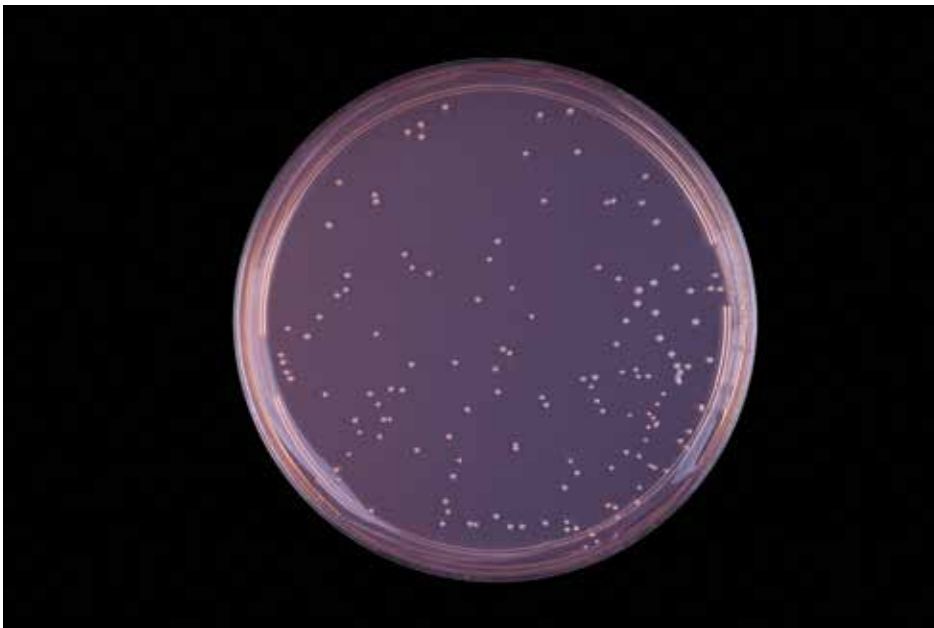


Figura A18. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A19. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

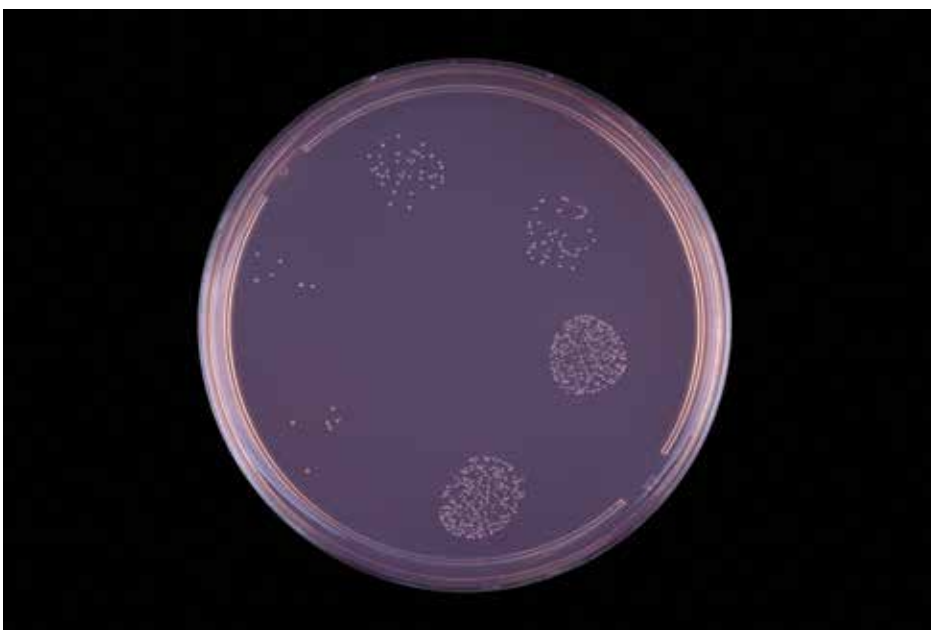


Figura A20. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

Fotos: Antonio Neto

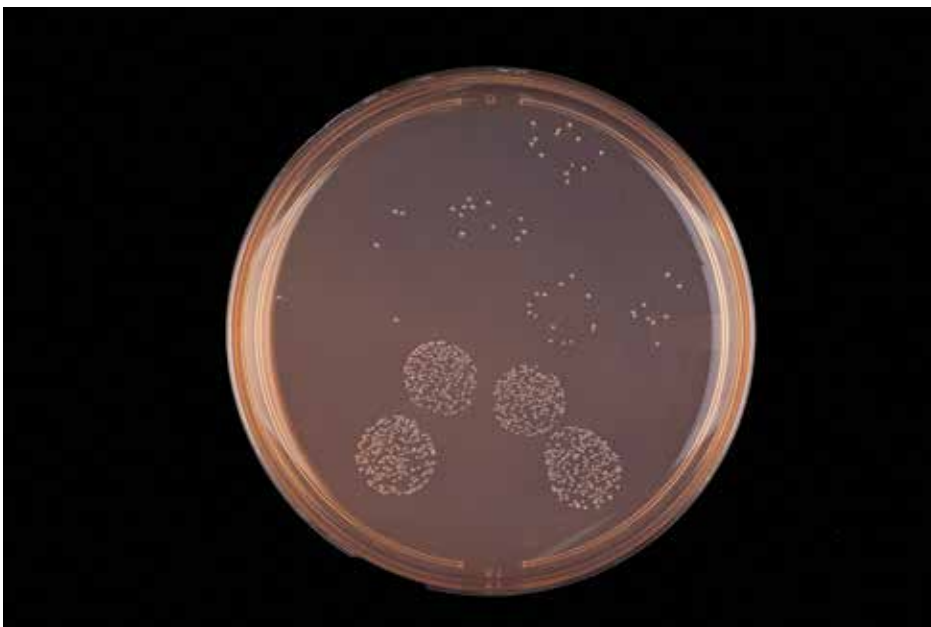


Figura A21. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (duas gotas de 30 μ L por setor de dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).



Figura A22. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor).

Fotos: Antonio Neto



Figura A23. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A24. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (=SEMIA 5019) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto

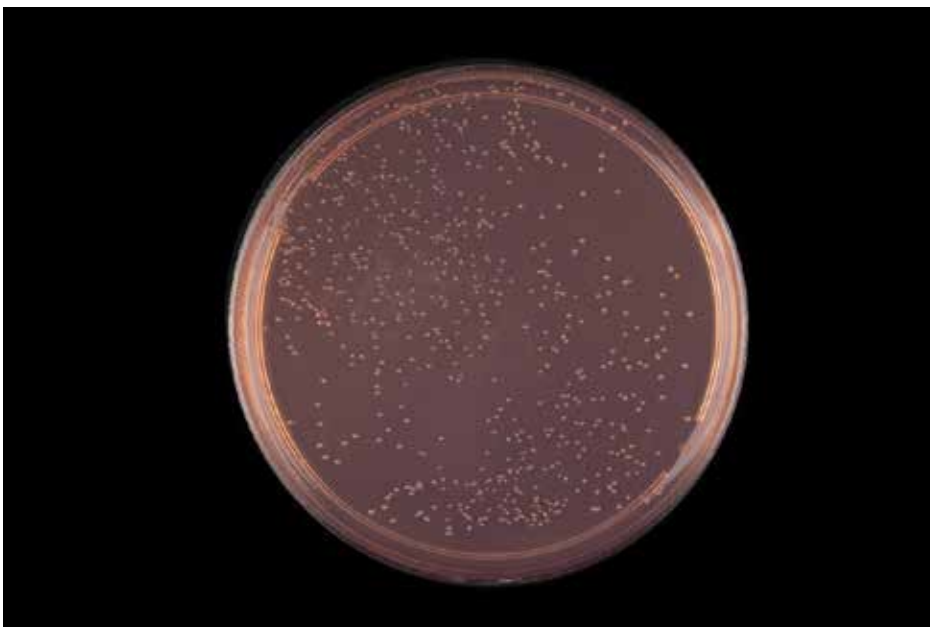


Figura A25. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A26. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

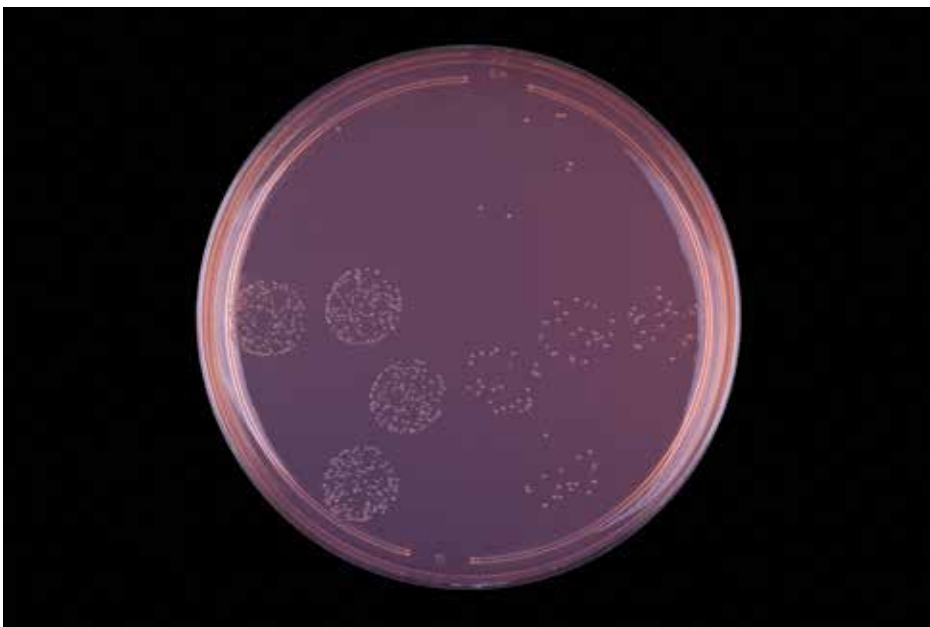


Figura A27. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (duas gotas de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).



Figura A28. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (duas gotas de 30 μ L por setor).

Fotos: Antonio Neto



Figura A29. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A30. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto

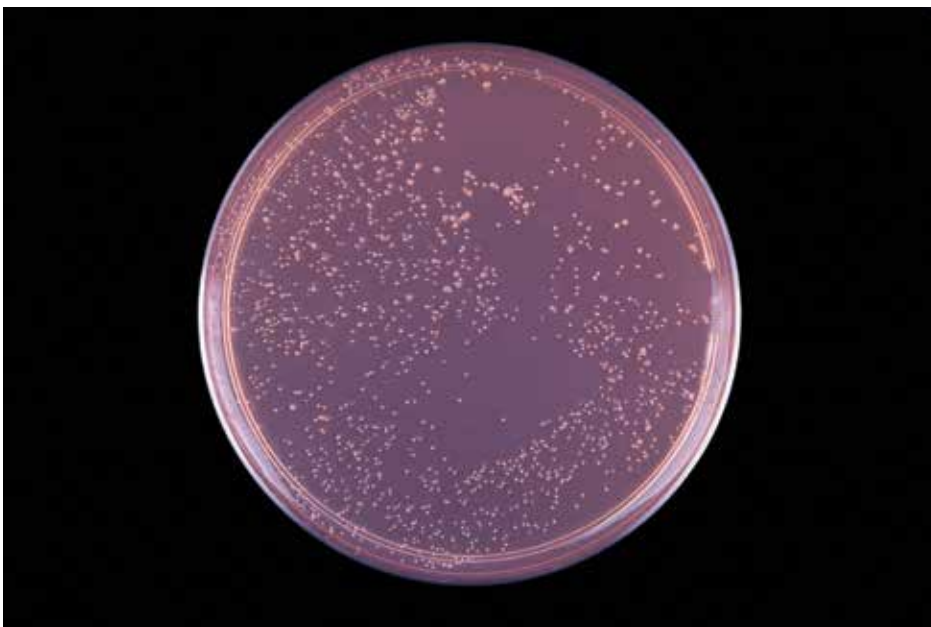


Figura A31. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2256 (=SEMIA 6461) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

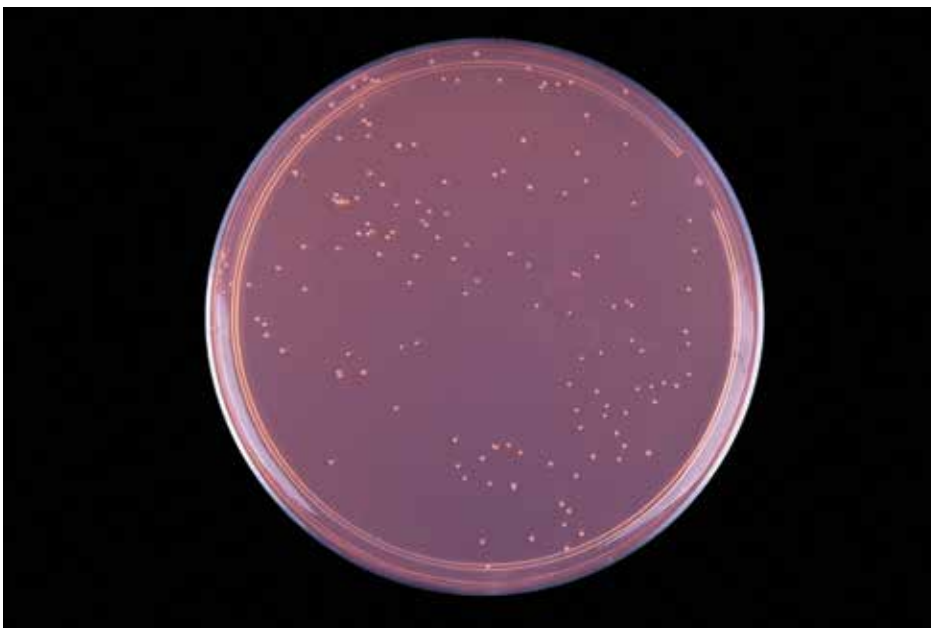


Figura A32. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2256 (=SEMIA 6461) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A33. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSO 2256 (=SEMIA 6461) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

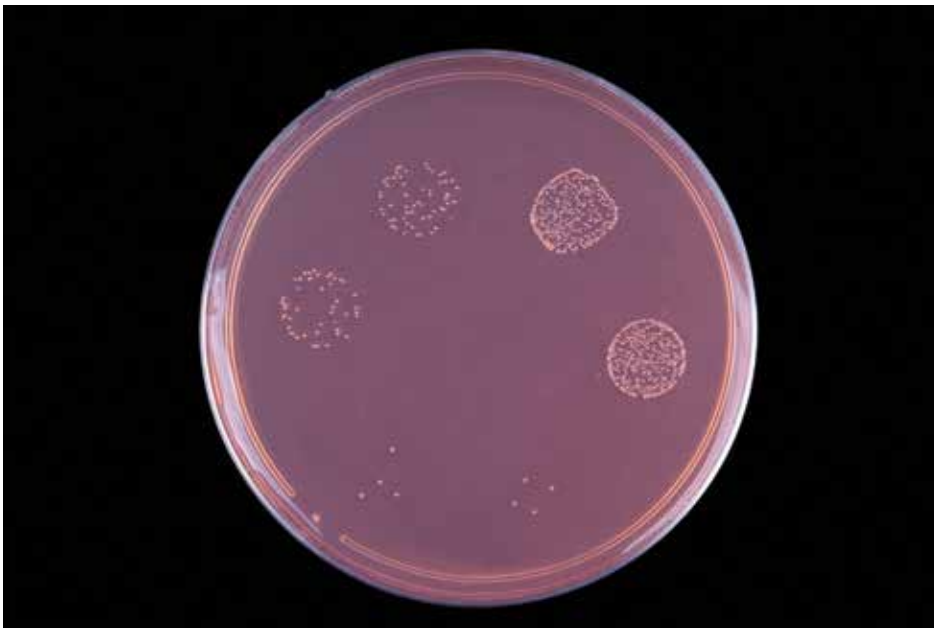


Figura A34. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSO 2256 (=SEMIA 6461) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores por diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

Fotos: Antonio Neto



Figura A35. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSO 2256 (=SEMIA 6461) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor).

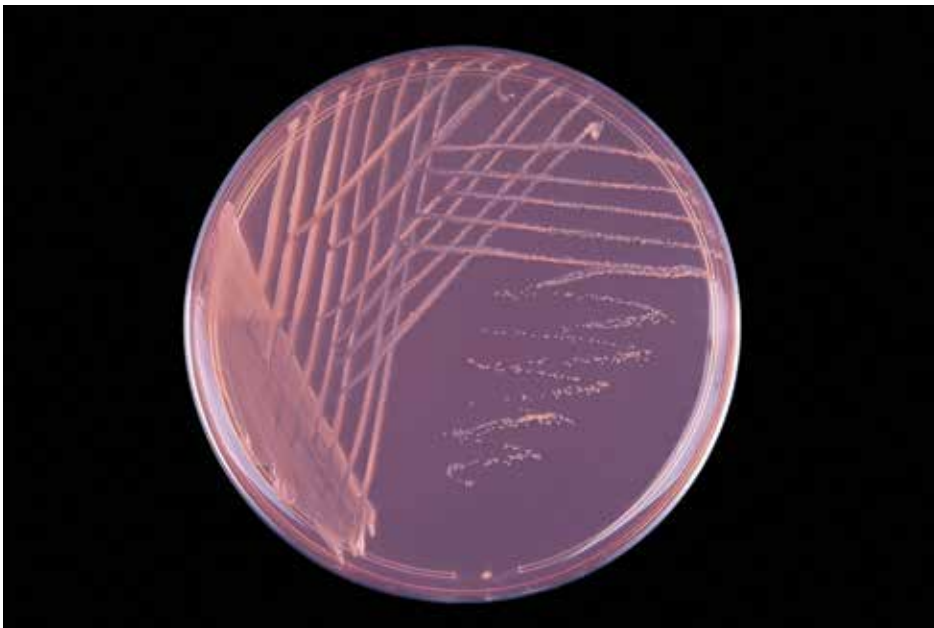


Figura A36. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSO 2256 (=SEMIA 6461) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A37. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2256 (=SEMIA 6461) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A38. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

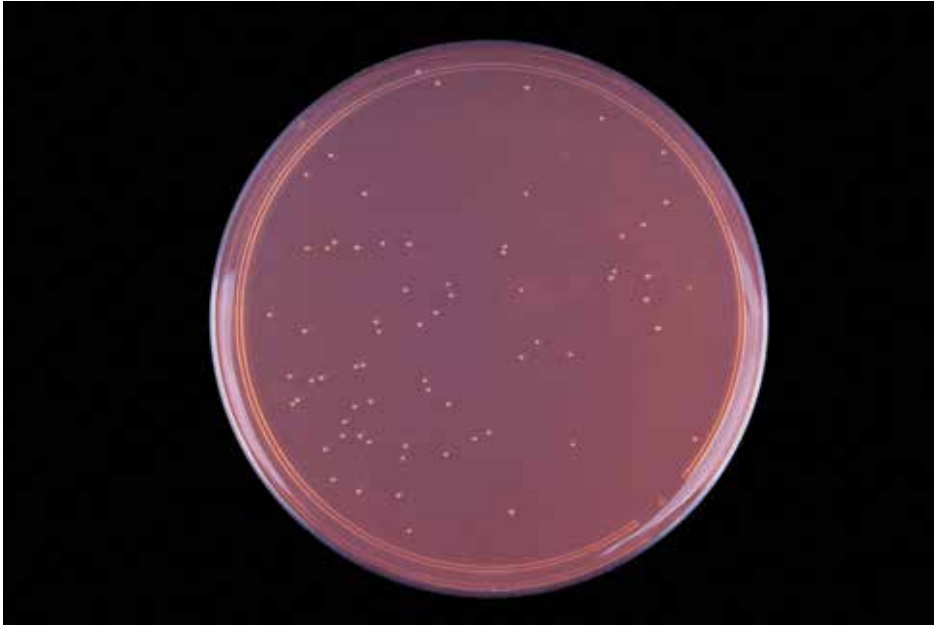


Figura A39. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A40. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

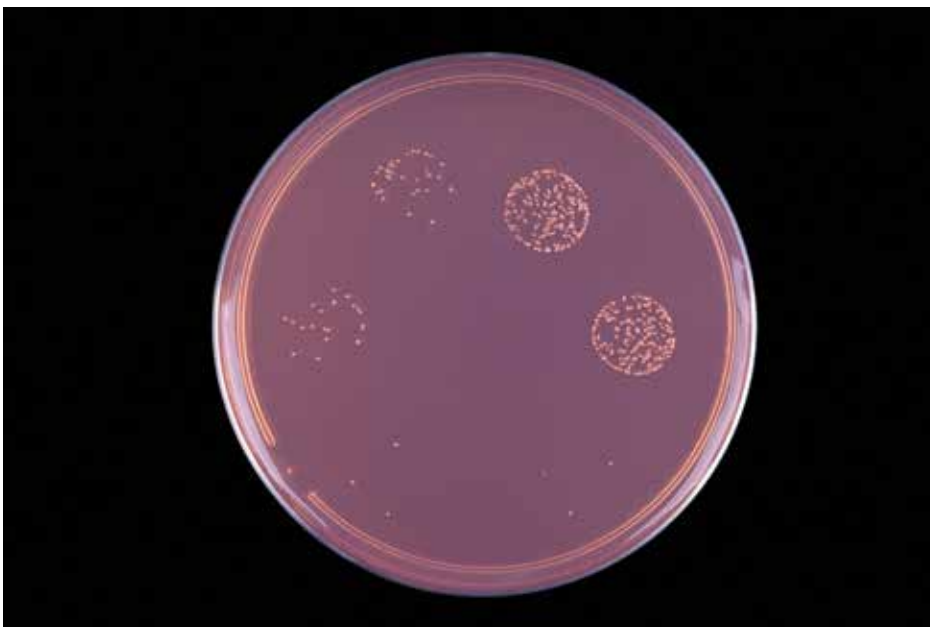


Figura A41. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μL por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

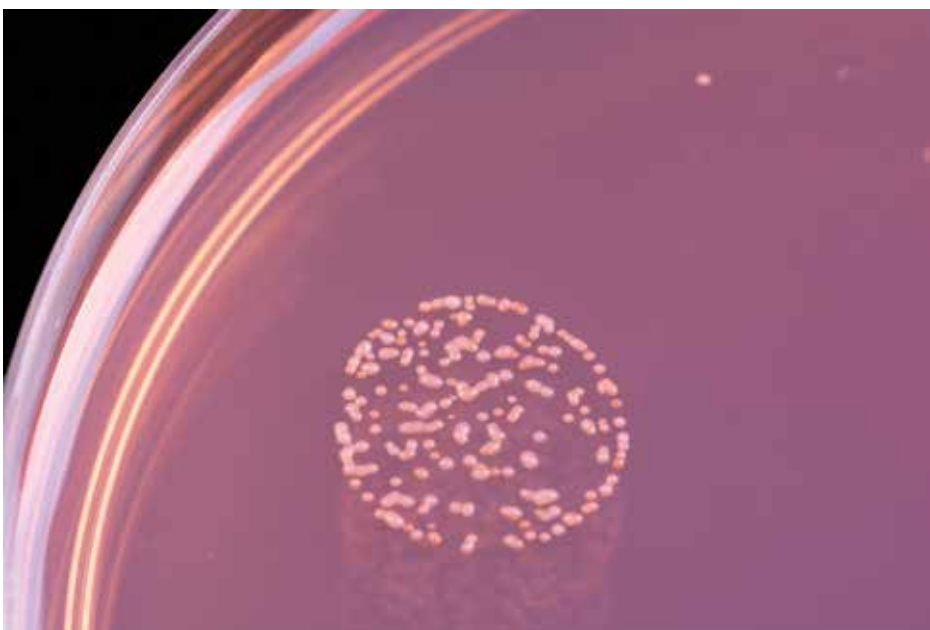


Figura A42. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μL por setor).

Fotos: Antonio Neto



Figura A43. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

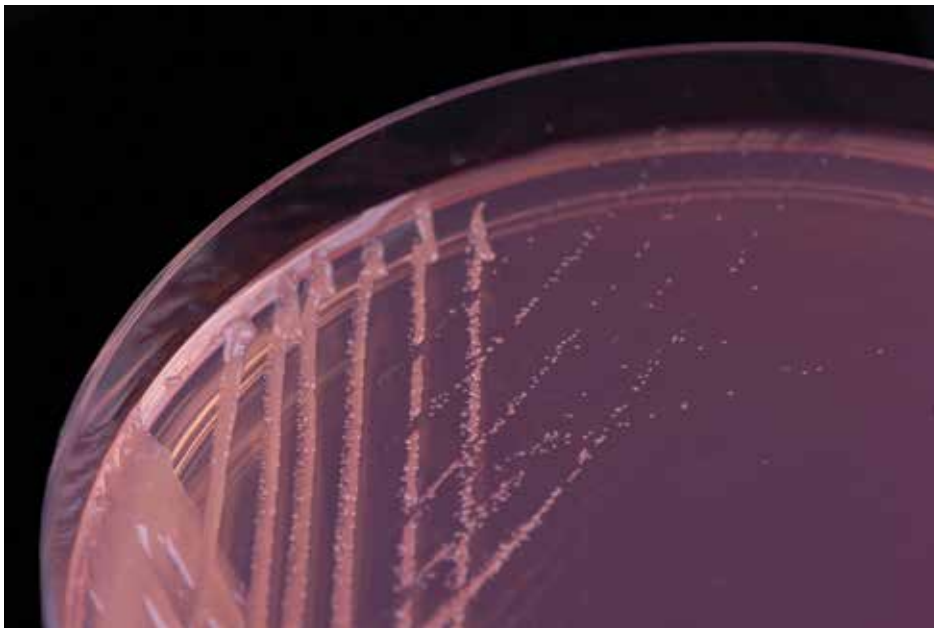


Figura A44. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium yuanmingense* estirpe CNPSo 3084 (=SEMIA 6462) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A45. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2975 (=SEMIA 6463) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

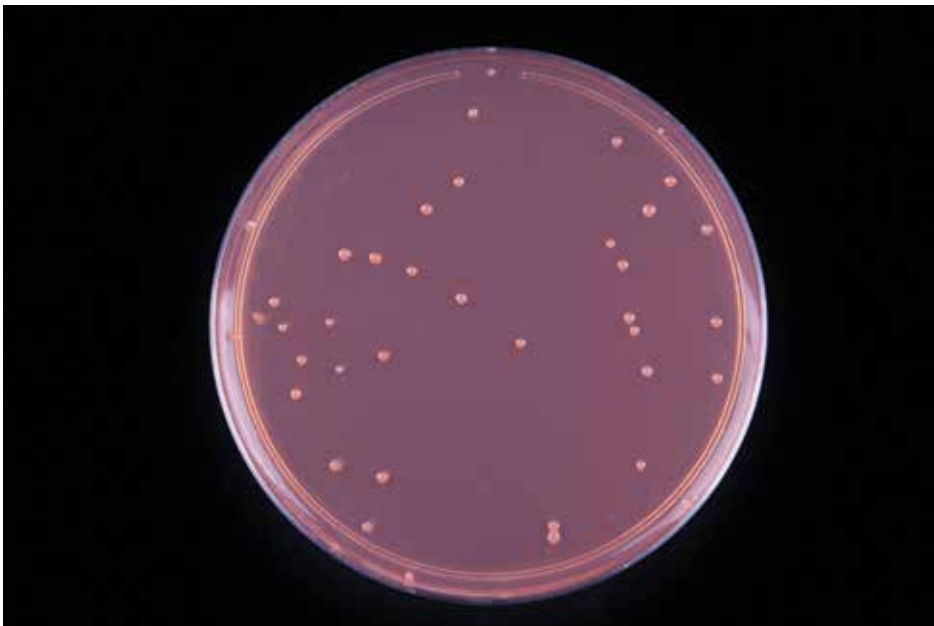


Figura A46. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2975 (=SEMIA 6463) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A47. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2975 (=SEMIA 6463) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

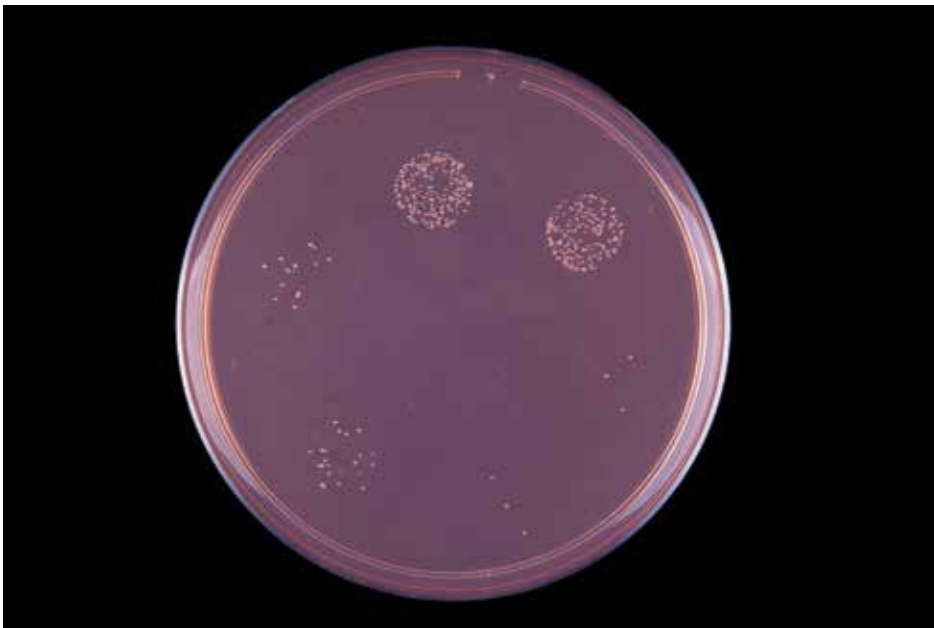


Figura A48. Aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2975 (=SEMIA 6463) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

Fotos: Antonio Neto

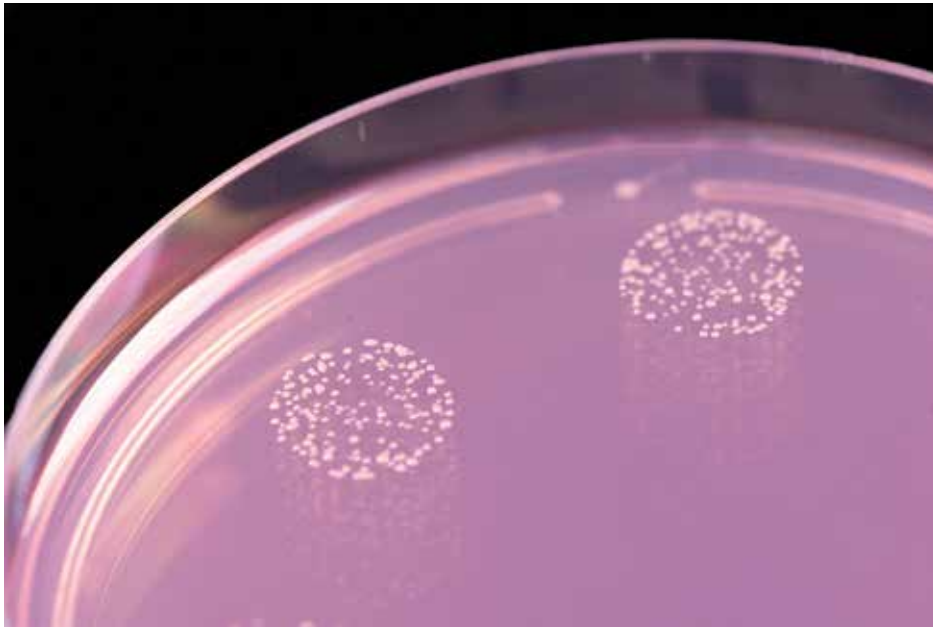


Figura A49. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSO 2975 (=SEMIA 6463) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 µL por setor).

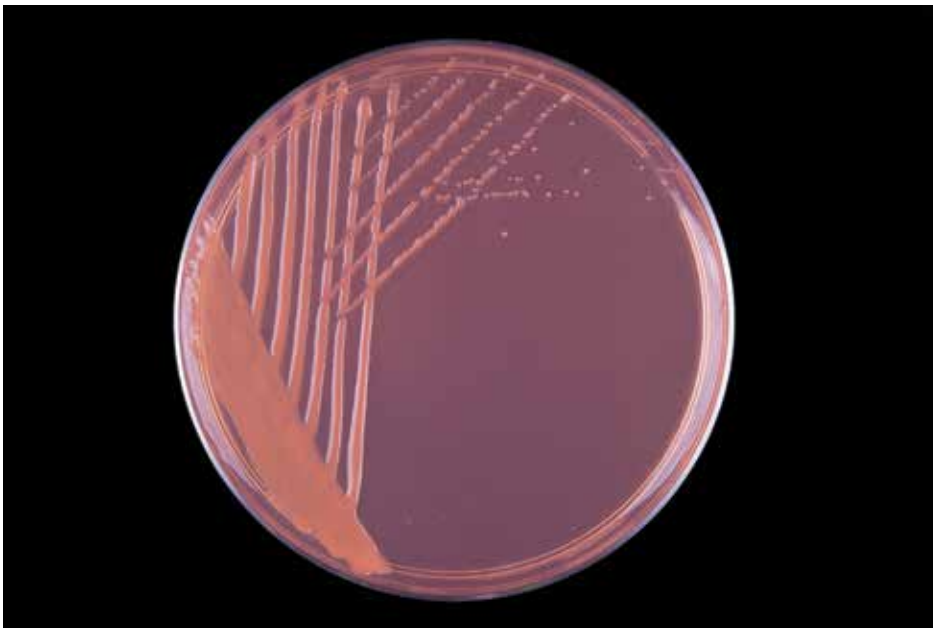


Figura A50. Aspecto do crescimento de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSO 2975 (=SEMIA 6463) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto

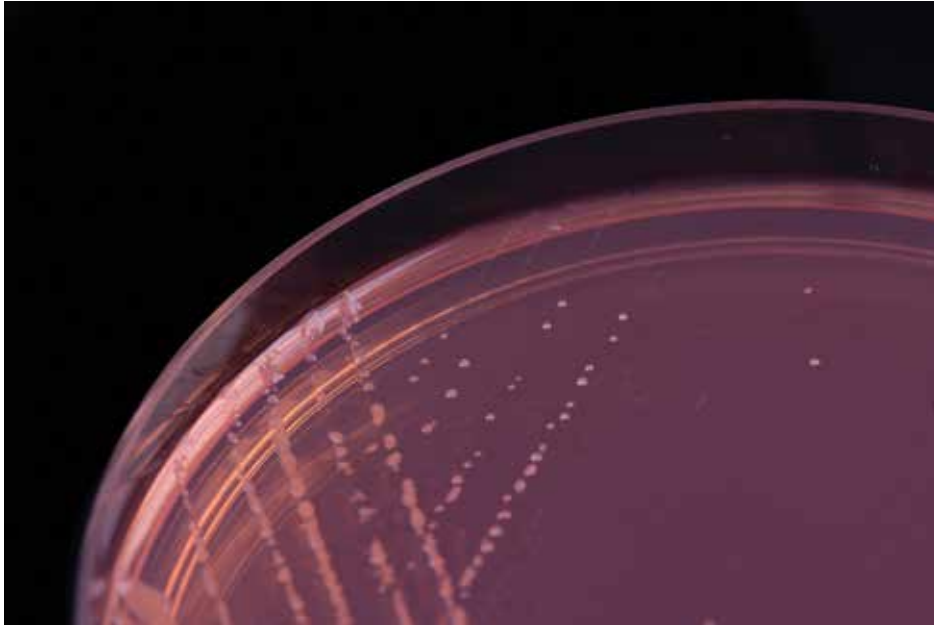


Figura A51. Detalhe do crescimento de *Bradyrhizobium* sp. estirpe CNPSo 2975 (=SEMIA 6463) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

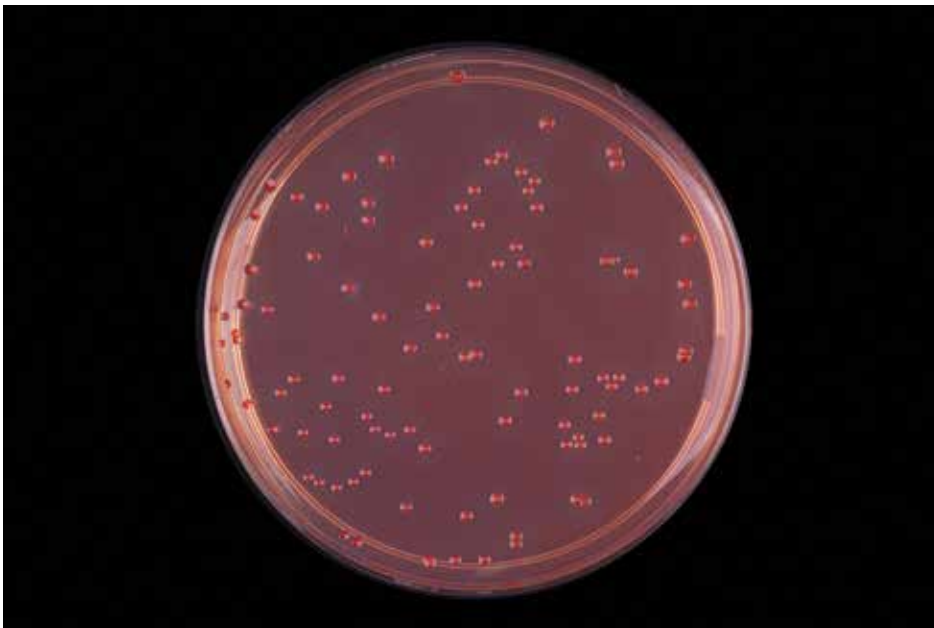


Figura A52. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2083 (=Ab-V5) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

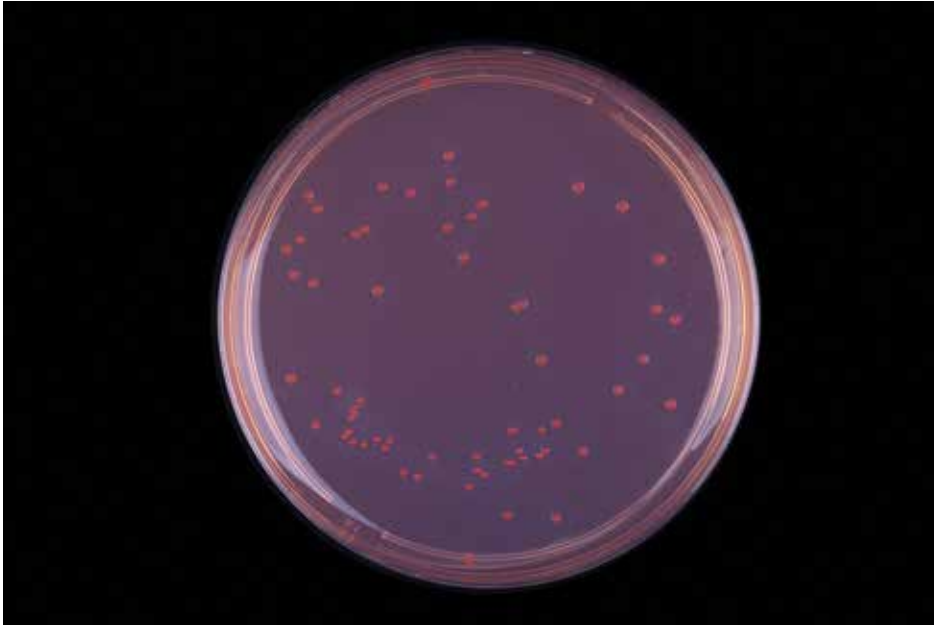


Figura A53. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSO 2083 (=Ab-V5) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

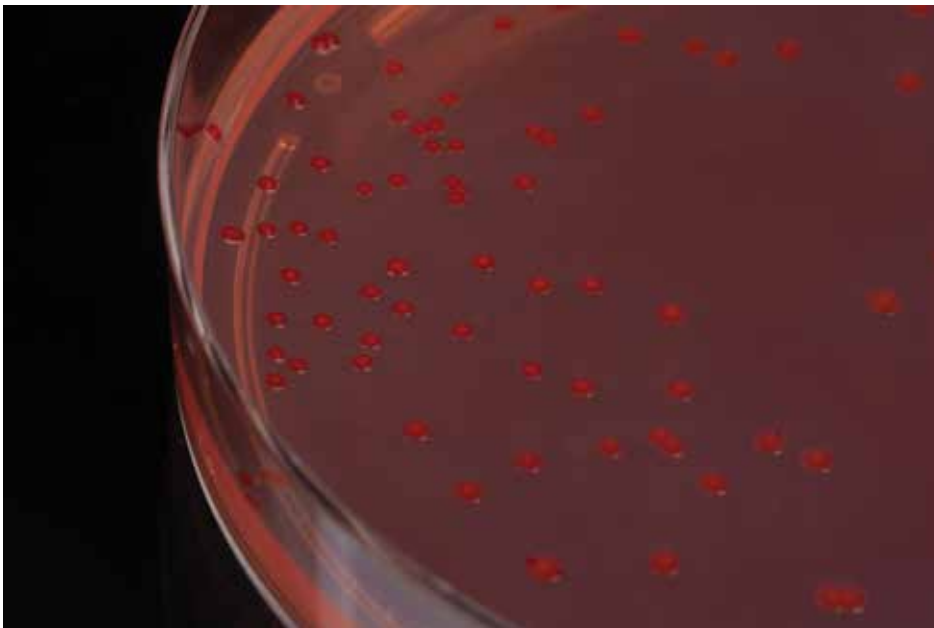


Figura A54. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSO 2083 (=Ab-V5) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A55. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2083 (=Ab-V5) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

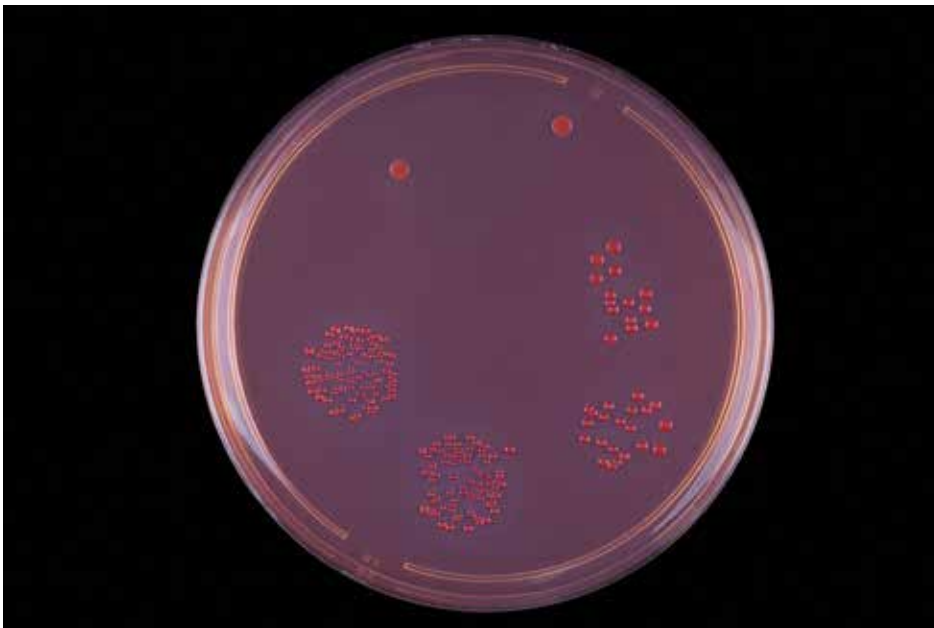


Figura A56. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2083 (=Ab-V5) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

Fotos: Antonio Neto

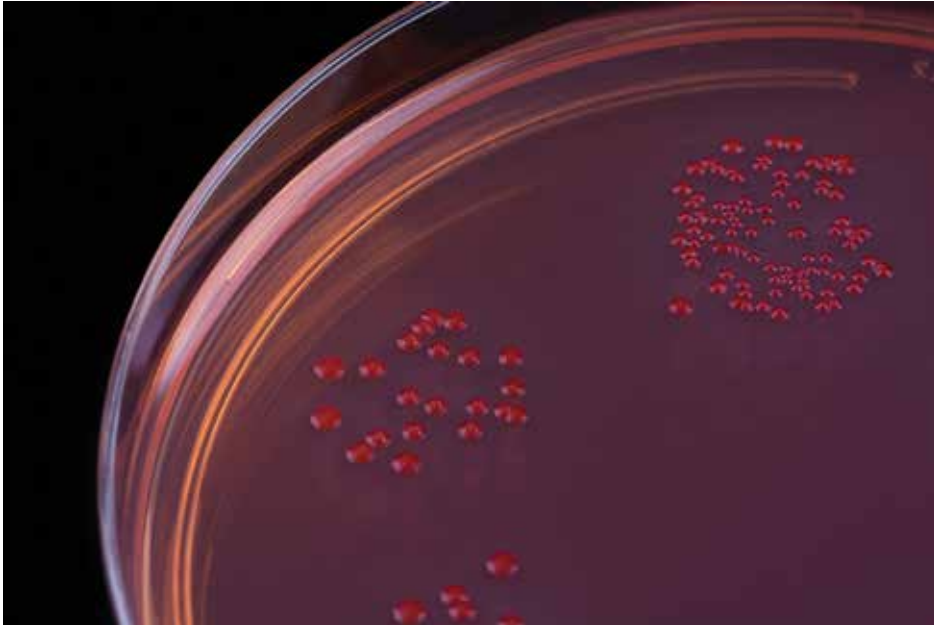


Figura A57. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2083 (=Ab-V5) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor).

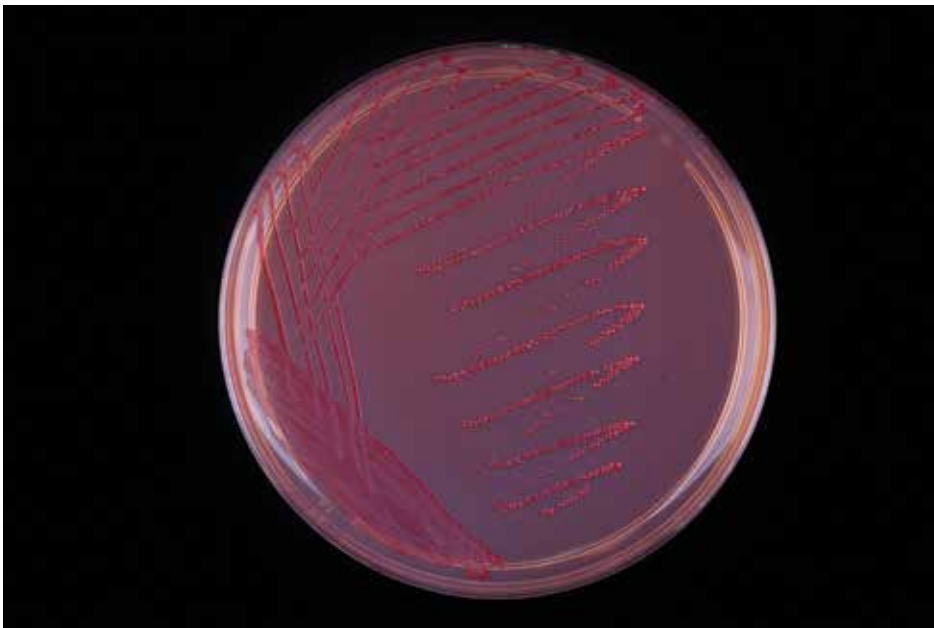


Figura A58. Aspecto do crescimento de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2083 (=Ab-V5) estriada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto

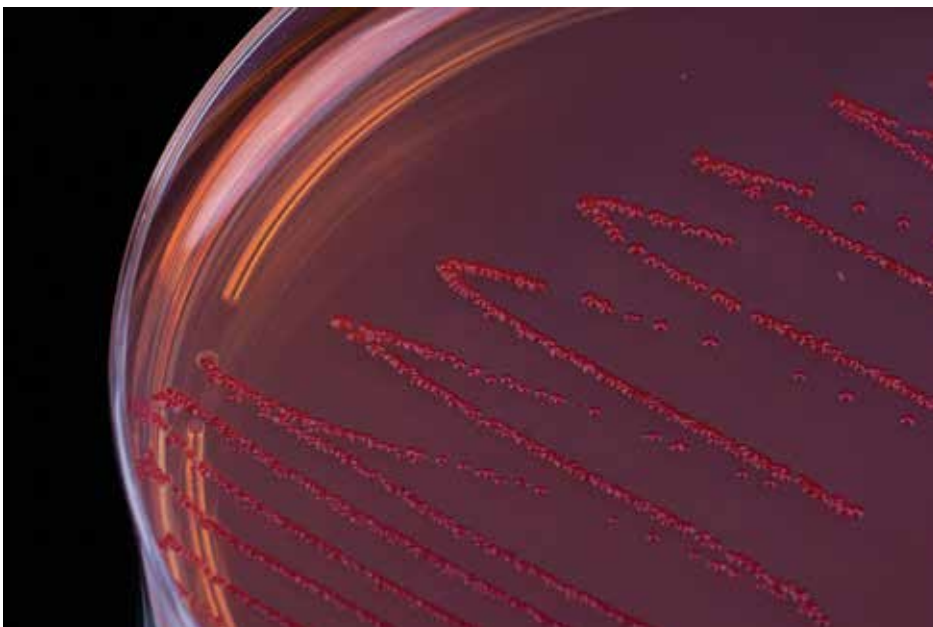


Figura A59. Detalhe do crescimento de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2083 (=Ab-V5) estriada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

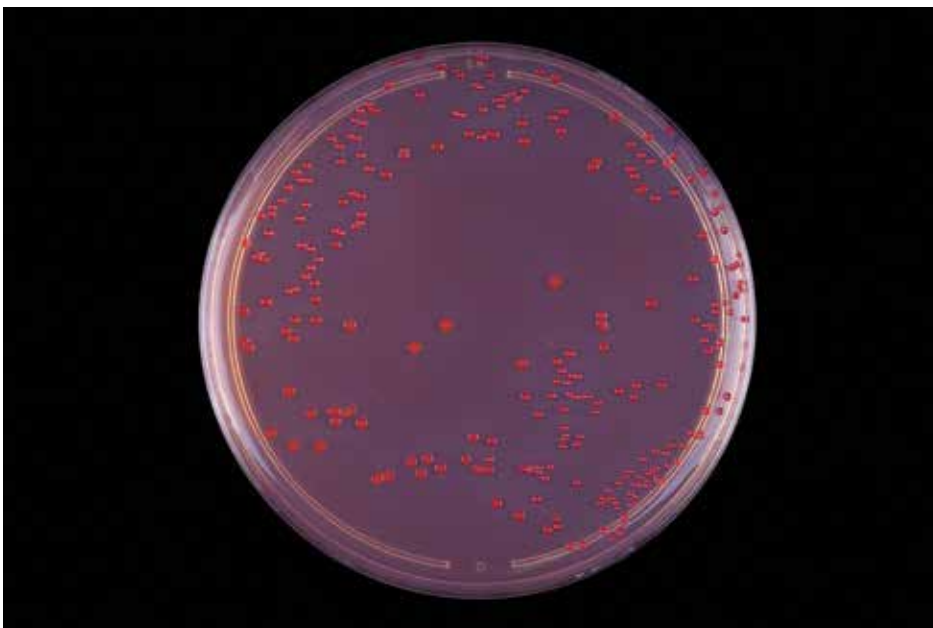


Figura A60. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

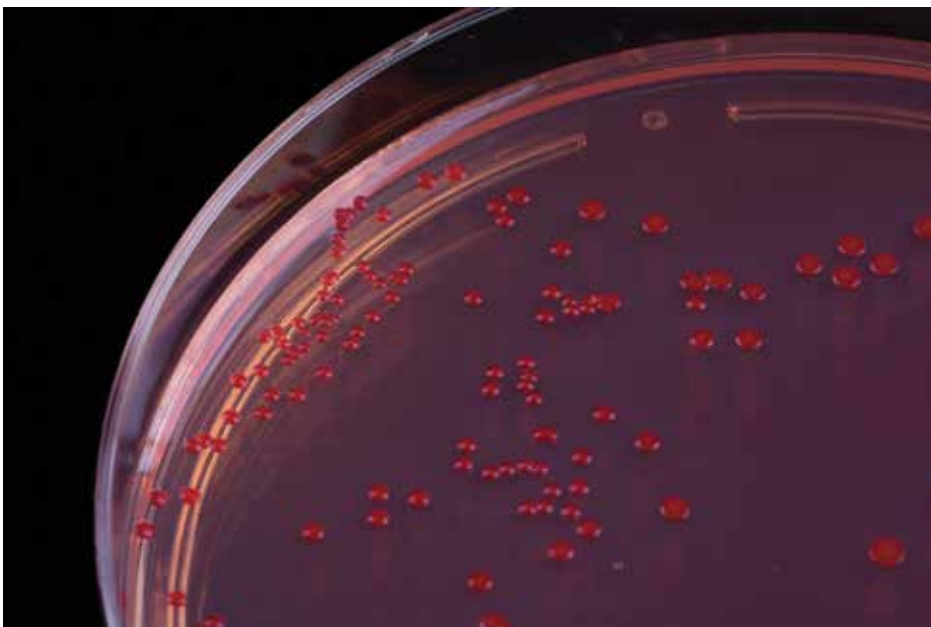


Figura A61. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSO 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

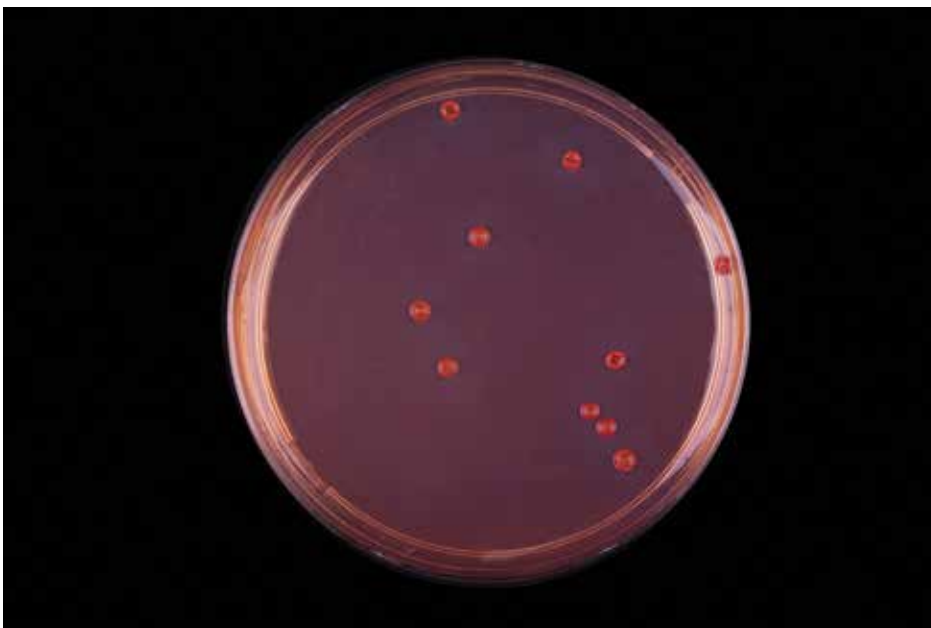


Figura A62. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSO 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento. Colônias com mais tempo de incubação (oito dias).

Fotos: Antonio Neto

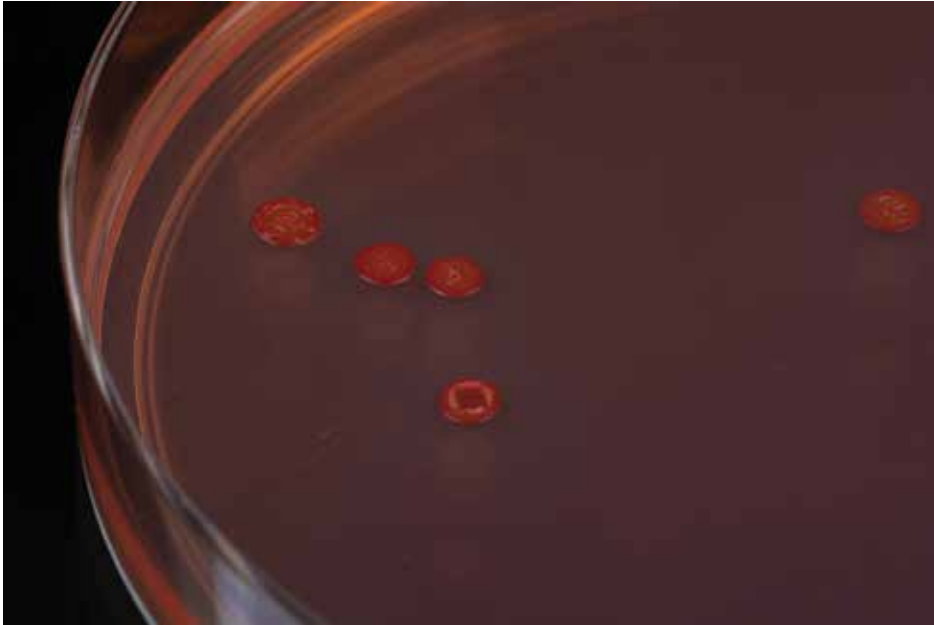


Figura A63. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* — estirpe CNPSo 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de espalhamento. Colônias com mais tempo de incubação (oito dias).

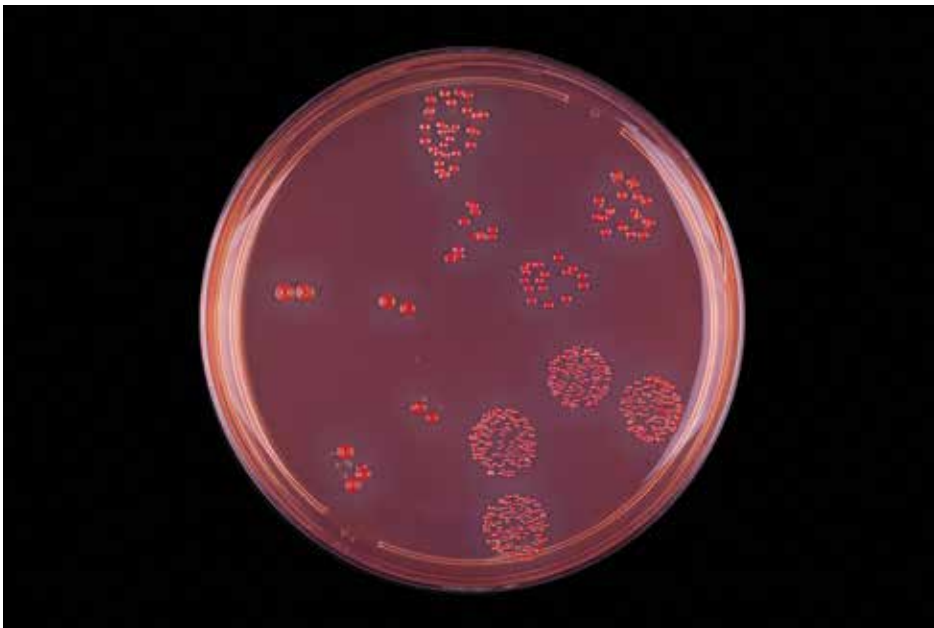


Figura A64. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de gotejamento (duas gotas de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

Fotos: Antonio Neto

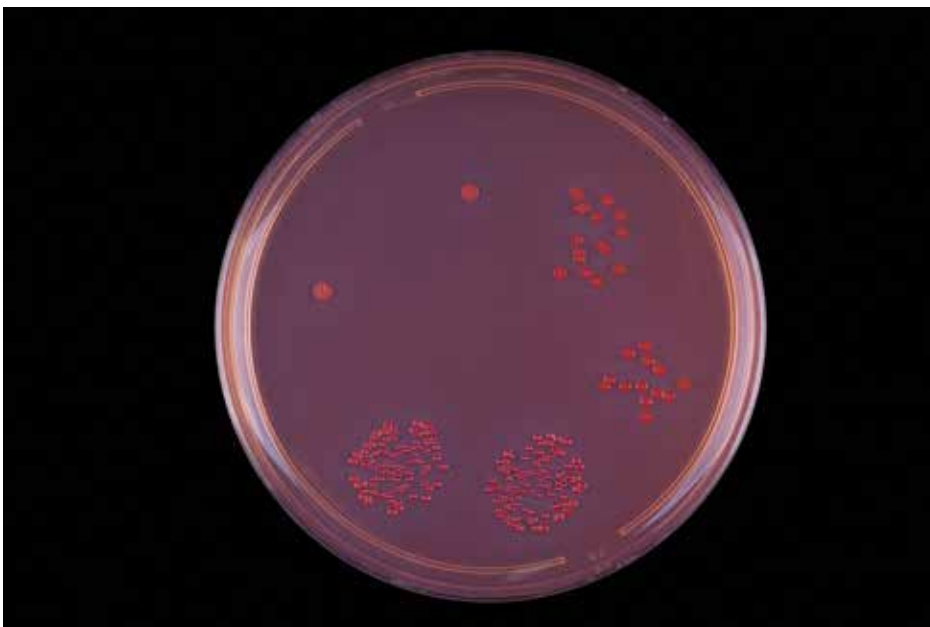


Figura A65. Aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSO 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor e dois setores para cada diluição 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}).

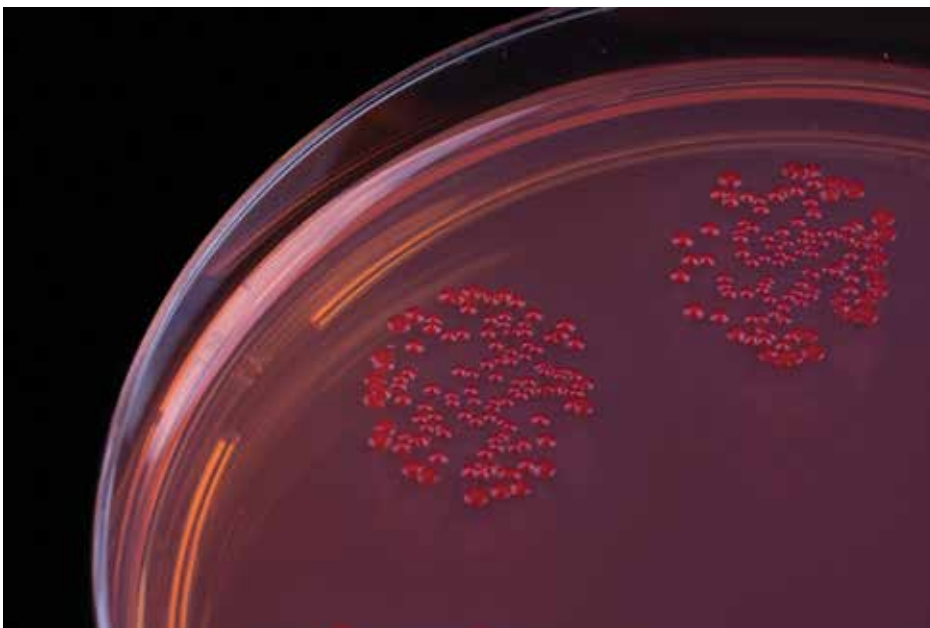


Figura A66. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSO 2084 (=Ab-V6) semeada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica de gotejamento (uma gota de 30 μ L por setor).

Fotos: Antonio Neto

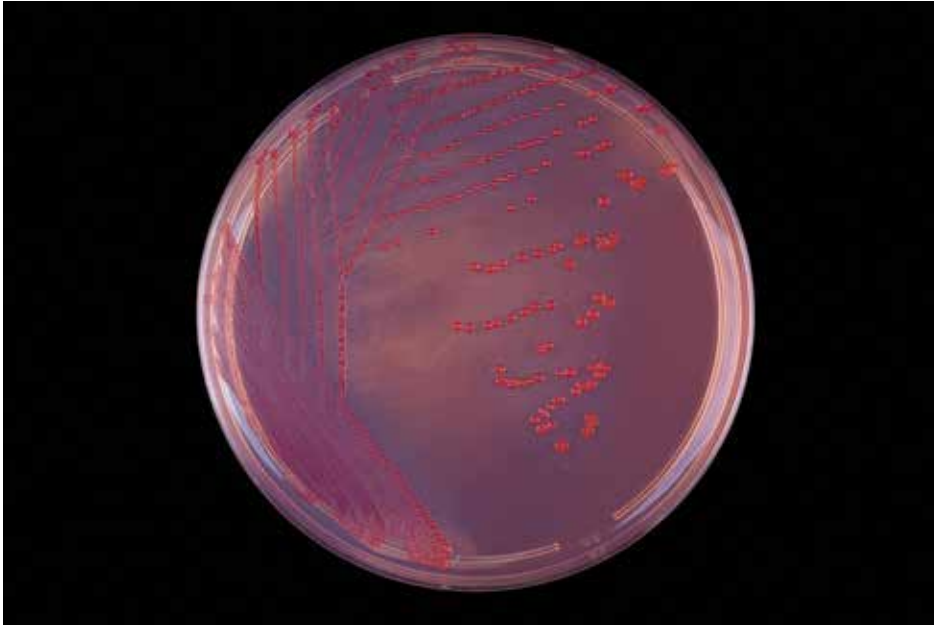


Figura A67. Aspecto do crescimento de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2084 (Ab-V6) estriada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

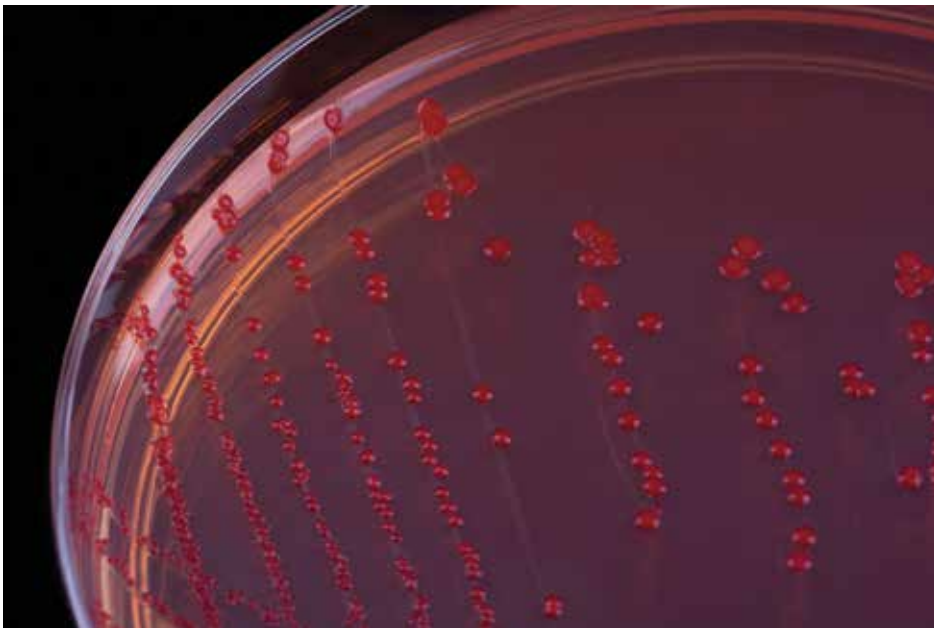


Figura A68. Detalhe do crescimento de *Azospirillum brasilense* estirpe CNPSo 2084 (=Ab-V6) estriada em meio de cultura RC (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A69. Aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium freirei* estirpe CNPSo 2217 (=SEMIA 4080, =PRF 81) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

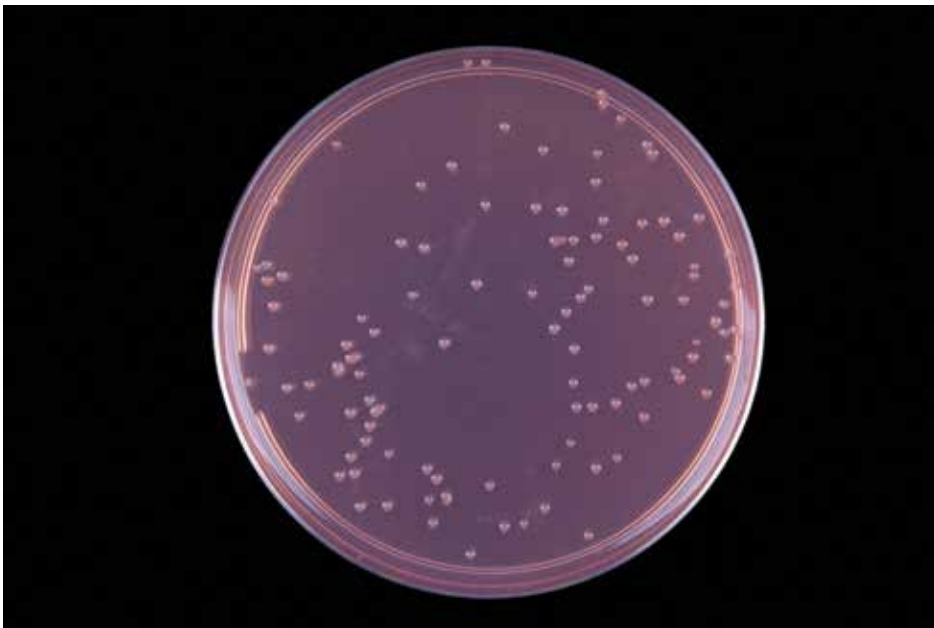


Figura A70. Aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium freirei* estirpe CNPSo 2217 (=SEMIA 4080, =PRF 81) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A71. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium freirei* estirpe CNPSO 2217 (=SEMIA 4080, =PRF 81) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A72. Aspecto do crescimento de *Rhizobium freirei* estirpe CNPSO 2217 (=SEMIA 4080, =PRF 81) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A73. Detalhe do crescimento de *Rhizobium freirei* estirpe CNPSo 2217 (=SEMIA 4080, =PRF 81) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

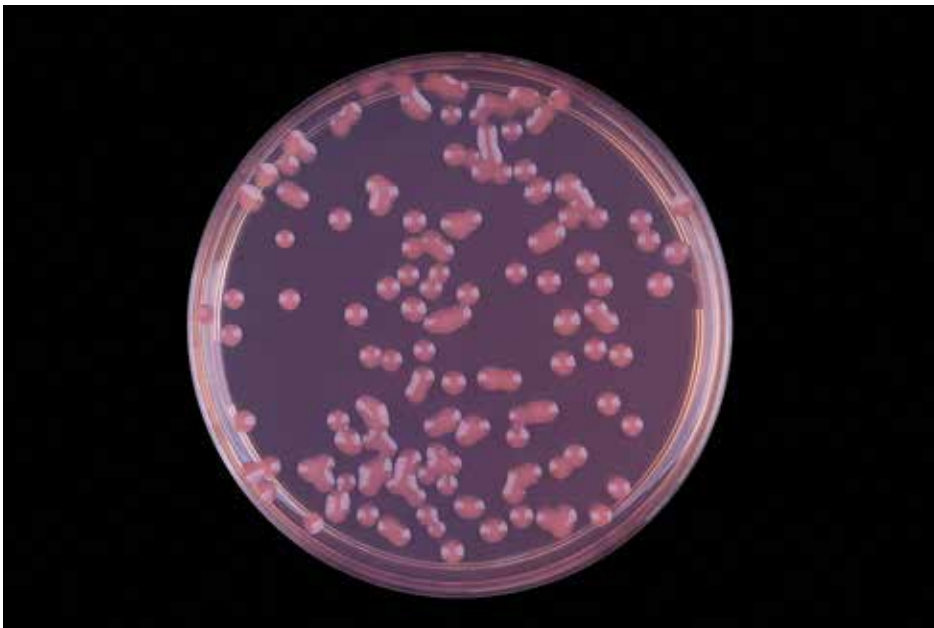


Figura A74. Aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

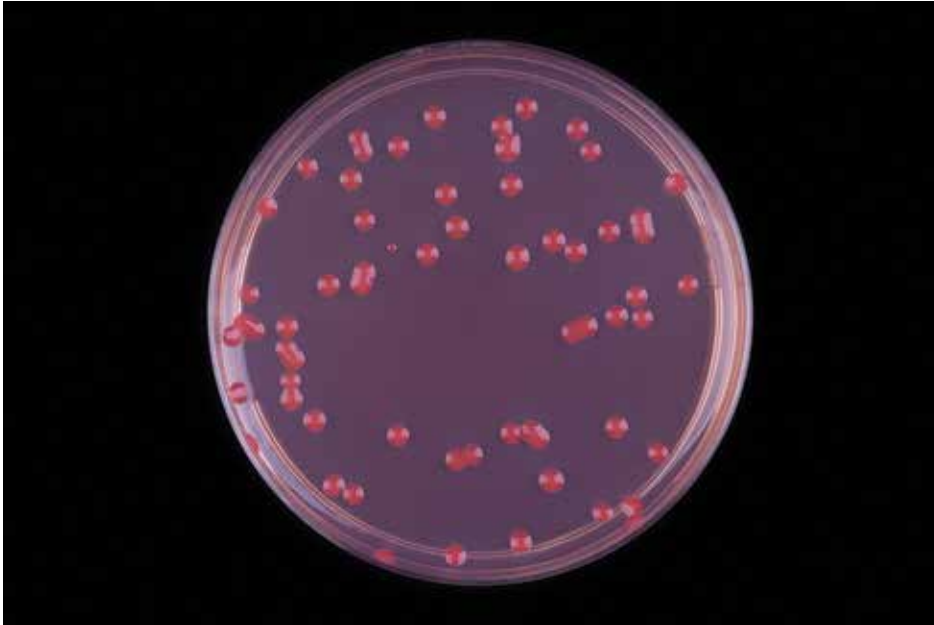


Figura A75. Aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Nota: Após o tempo de incubação, a placa foi armazenada por dois dias em refrigerador, indicando que, no armazenamento, as colônias podem adquirir coloração rósea ou vermelha.



Figura A76. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

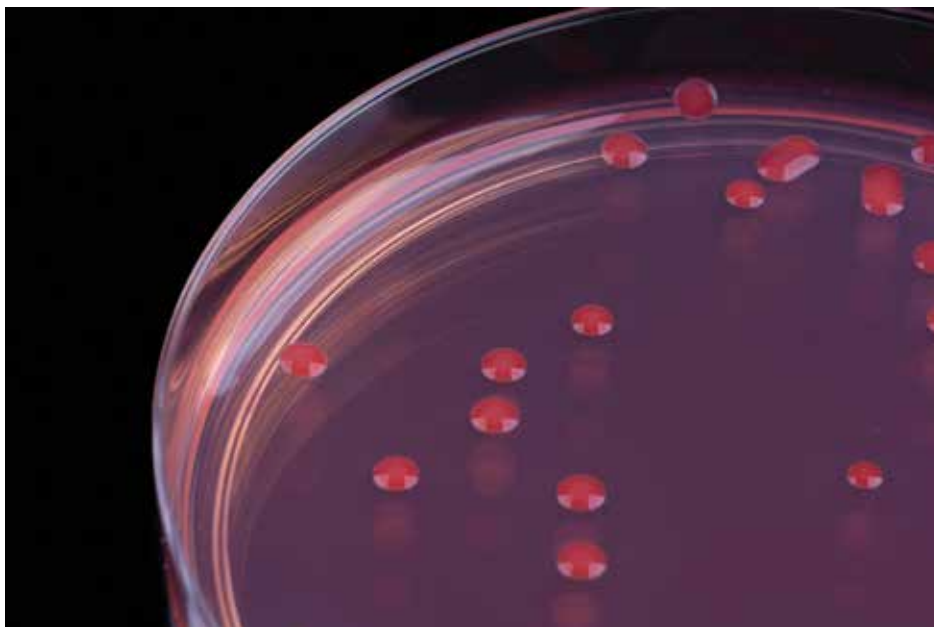


Figura A77. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) semeada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Nota: Após o tempo de incubação, a placa foi armazenada por dois dias em refrigerador, indicando que, no armazenamento, as colônias podem adquirir coloração rósea ou vermelha.

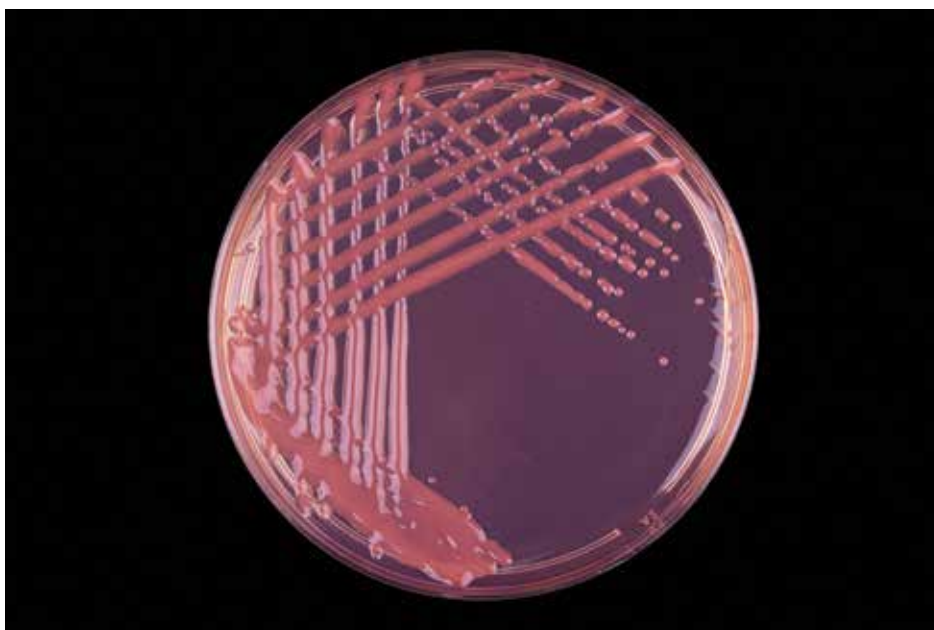


Figura A78. Aspecto do crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A79. Aspecto do crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Nota: Após o tempo de incubação, a placa foi armazenada por dois dias em refrigerador, indicando que, no armazenamento, as colônias podem adquirir coloração rósea ou vermelha.



Figura A80. Detalhe do crescimento de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) estriada em meio de cultura YMA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Nota: Após o tempo de incubação, a placa foi armazenada por dois dias em refrigerador, indicando que, no armazenamento, as colônias podem adquirir coloração rósea ou vermelha.

Fotos: Antonio Neto



Figura A81. Aspecto morfológico de colônias de *Priestia* (= *Bacillus*) *aryabhatai* estirpe CNPSo 2603 (=IM 02) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A82. Aspecto morfológico de colônias de *Priestia* (= *Bacillus*) *aryabhatai* estirpe CNPSo 2603 (=IM 02) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A83. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Priestia* (= *Bacillus*) *aryabhatai* estirpe CNPSo 2603 (=IM 02) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A84. Aspecto do crescimento de *Priestia* (= *Bacillus*) *aryabhatai* estirpe CNPSo 2603 (=IM02) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A85. Detalhe do crescimento de *Priestia* (= *Bacillus*) *aryabhatai* estirpe CNPSo 2603 (=IM02) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A86. Aspecto morfológico de colônias de *Priestia* (= *Bacillus*) *megaterium* estirpe CNPSo 4268 (=CNPMS B119) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A87. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Priestia* (= *Bacillus*) *megaterium* estirpe CNPSo 4268 (=CNPMS B119) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A88. Aspecto de crescimento de *Priestia* (= *Bacillus*) *megaterium* estirpe CNPSo 4268 (=CNPMS B119) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A89. Detalhe do crescimento de *Priestia* (= *Bacillus*) *megaterium* estirpe CNPSo 4268 (=CNPMS B119) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A90. Aspecto morfológico de colônias de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto

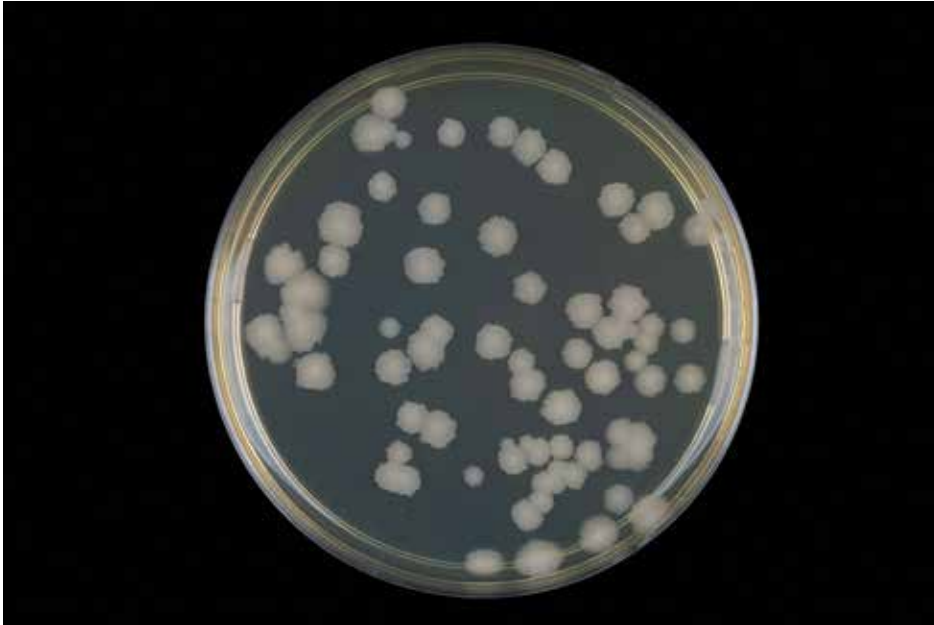


Figura A91. Aspecto morfológico de colônias de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A92. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A93. Aspecto do crescimento de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A94. Detalhe do crescimento de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A95. Aspecto morfológico de colônias de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 4269 (=CNPMS B2084) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A96. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 4269 (=CNPMS B2084) semeada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A97. Aspecto do crescimento de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 4269 (=CNPMS B2084) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.



Figura A98. Detalhe do crescimento de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 4269 (=CNPMS B2084) estriada em meio de cultura TSA (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto

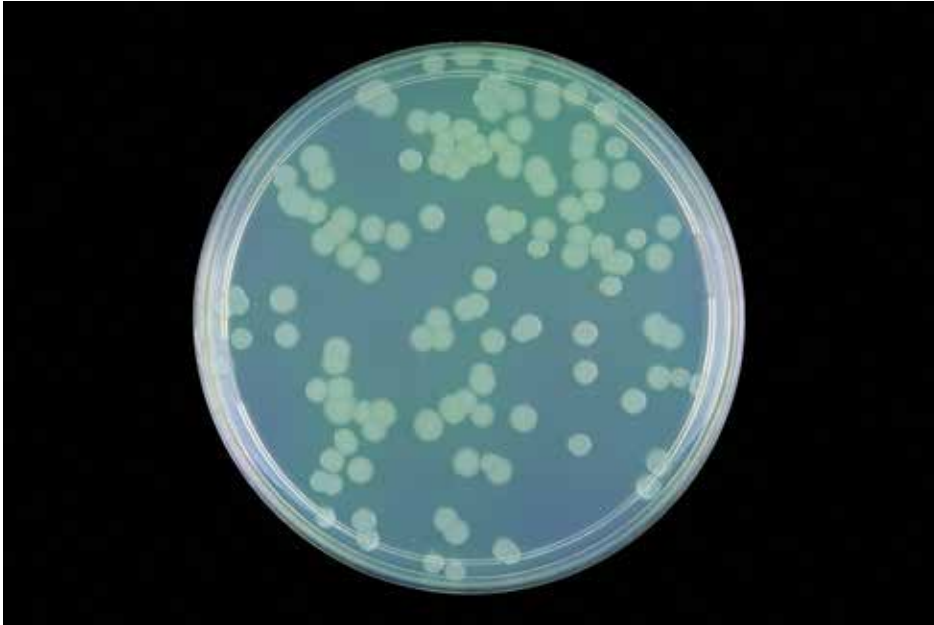


Figura A99. Aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2719 (=CCTB 03) semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A100. Aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2719 (=CCTB 03) semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A101. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSO 2719 (=CCTB 03) semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A102. Aspecto do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSO 2719 (=CCTB 03) estriada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A103. Detalhe do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2719 (=CCTB 03) estriada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

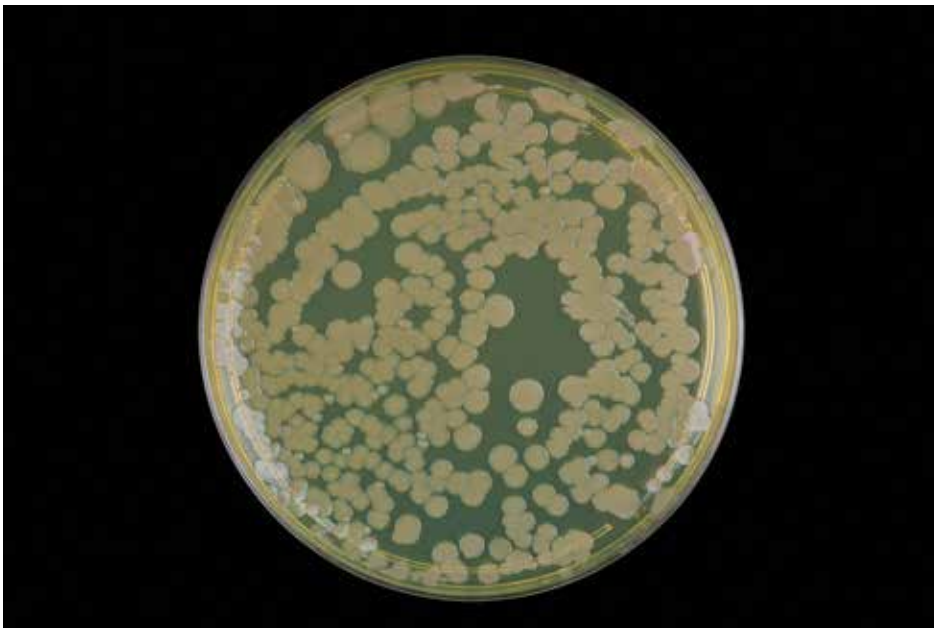


Figura A104. Aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A), pela técnica de espalhamento.

Fotos: Antonio Neto



Figura A105. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSO 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.



Figura A106. Aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSO 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Nota: Presença de duas morfologias de colônias: aspecto morfológico com superfície lisa e aspecto morfológico com superfície rugosa. Algumas estirpes podem apresentar mudança na morfologia de colônias. Para sanar a dúvida sobre se é a mesma estirpe com alteração morfológica, ou se é um contaminante, pode-se obter o perfil de rep-PCR dos dois tipos de colônia. Como exemplo, verificar um caso na Figura C4 do Apêndice C. No caso desta figura, foi confirmado se tratar da mesma estirpe.

Foto: Antonio Neto



Figura A107. Aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Nota: Presença de duas morfologias de colônias: aspecto morfológico com superfície lisa e aspecto morfológico com superfície rugosa. Algumas estirpes podem apresentar mudança na morfologia das colônias. Para sanar a dúvida sobre se é a mesma estirpe com alteração morfológica, ou se é um contaminante, pode-se obter o perfil de rep-PCR dos dois tipos de colônia. Como exemplo, verificar um caso na Figura C4 do Apêndice C. No caso desta figura, foi confirmado se tratar da mesma estirpe.

Foto: Antonio Neto



Figura A108. Aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Nota: A morfologia das colônias desta estirpe apresenta menor ou maior grau de rugosidade, dependendo do meio de cultura e do seu estado de conservação e/ou armazenamento. Nas Figuras A104 e A105, as colônias provenientes de isolados criopreservados a -80 °C apresentam-se com superfície lisa. As Figuras A106, A107 e A108 apresentam colônias com superfícies lisas e superfícies rugosas. Neste caso, as colônias foram provenientes de isolados conservados em meio de cultivo líquido em temperatura de refrigeração a 8 °C. Para confirmação da identidade destes isolados foi realizada análise de identidade genética por perfil de BOX-PCR, conforme pode ser verificado na Figura C4 do Apêndice C.

Foto: Antonio Neto



Figura A109. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica do espalhamento.

Nota: Presença de duas morfologias de colônias: aspecto morfológico com superfície lisa e aspecto morfológico com superfície rugosa. Algumas estirpes podem apresentar mudança na morfologia de colônias. Para sanar a dúvida sobre se é a mesma estirpe com alteração morfológica, ou se é um contaminante, pode-se obter o perfil de rep-PCR dos dois tipos de colônia. Como exemplo, verificar um caso na Figura C4 do Apêndice C. No caso desta figura, foi confirmado se tratar da mesma estirpe.

Foto: Antonio Neto



Figura A110. Detalhe do aspecto morfológico de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 semeada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica de espalhamento.

Nota: Presença de duas morfologias de colônias: aspecto morfológico com superfície lisa e aspecto morfológico com superfície rugosa. Algumas estirpes podem apresentar mudança na morfologia de colônias. Para sanar a dúvida sobre se é a mesma estirpe com alteração morfológica, ou se é um contaminante, pode-se obter o perfil de rep-PCR dos dois tipos de colônia. Como exemplo, verificar um caso na Figura C4 do Apêndice C. No caso desta figura, foi confirmado se tratar da mesma estirpe.

Foto: Antonio Neto

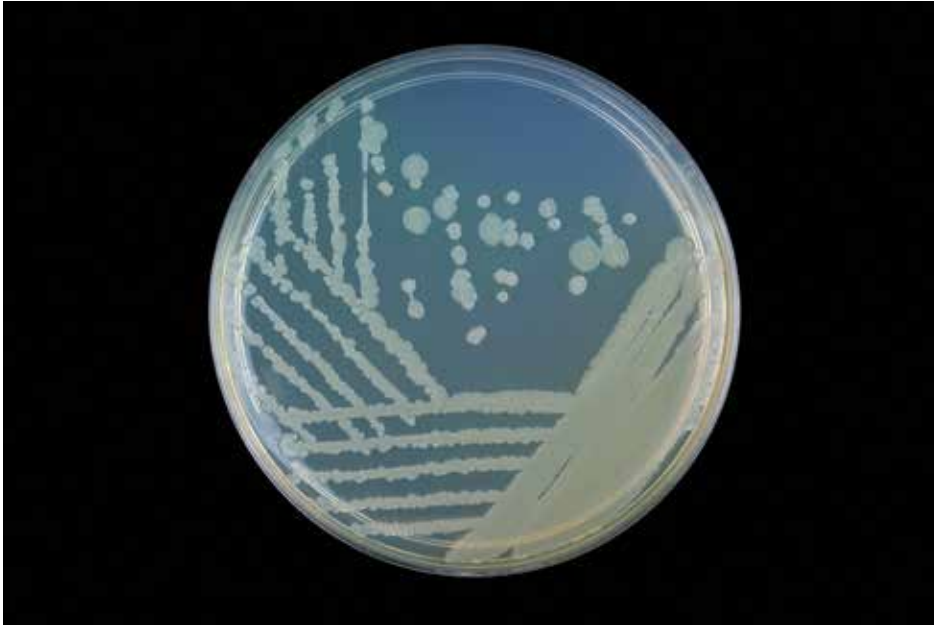


Figura A111. Aspecto do crescimento de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 estriada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Nota: Presença de duas morfologias de colônias: aspecto morfológico com superfície lisa e aspecto morfológico com superfície rugosa. Algumas estirpes podem apresentar mudança na morfologia de colônias. Para sanar a dúvida sobre se é a mesma estirpe com alteração morfológica, ou se é um contaminante, pode-se obter o perfil de rep-PCR dos dois tipos de colônia. Como exemplo, verificar um caso na Figura C4 do Apêndice C. No caso desta figura, foi confirmado se tratar da mesma estirpe.

Foto: Antonio Neto



Figura A112. Detalhe do crescimento de colônias de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 estriada em meio de cultura King B (Anexo A) pela técnica do esgotamento.

Nota: Presença de duas morfologias de colônias: aspecto morfológico com superfície lisa e aspecto morfológico com superfície rugosa. Algumas estirpes podem apresentar mudança na morfologia de colônias. Para sanar a dúvida sobre se é a mesma estirpe com alteração morfológica, ou se é um contaminante, pode-se obter o perfil de rep-PCR dos dois tipos de colônia. Como exemplo, verificar um caso na Figura C4 do Apêndice C. No caso desta figura, foi confirmado se tratar da mesma estirpe.

APÊNDICE B

Exemplos de Cálculos de NMP

A) Exemplo de cálculo de NMP para rizóbios nodulantes em plantas.

Supondo que o ensaio seja realizado de acordo com o método descrito na seção Método do Número Mais Provável (NMP) – Infecção em Plantas, com inoculação nas plantas teste de três repetições para cada diluição, e considerando que as plantas teste foram inoculadas com 1 mL das diluições 10^{-2} a 10^{-6} , em triplicata, após 30 dias em casa de vegetação, o resultado obtido foi conforme apresentado na Tabela B1.

As três repetições de plantas inoculadas com as diluições 10^{-2} e 10^{-3} apresentaram resultado positivo, ou seja, presença de nódulos; duas plantas inoculadas com a diluição 10^{-4} apresentaram resultado positivo; já as plantas inoculadas com as diluições 10^{-5} e 10^{-6} apresentaram resultado negativo para nodulação. A presença de pelo menos um nódulo no sistema radicular da unidade teste inoculada com cada repetição da diluição correspondente confere resultado positivo e, para realizar o cálculo, é necessário adotar três diluições, sendo que as diluições subsequentes à última não deverão apresentar nenhuma unidade teste positiva. Dessa forma, para o exemplo citado, as diluições adotadas deverão ser 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , sendo a combinação “3-3-2” a ser verificada na Tabela C1 (Anexo C). Para essa combinação, o valor do fator NMP correspondente é 109,849. O cálculo do número de rizóbios por grama ou mililitro de amostra deve ser realizado com a seguinte fórmula:

$$\text{Número de rizóbios/g ou rizóbios/mL} = f \times d$$

$$f = \text{fator NMP da Tabela C1 (Anexo C)} = 109,849.$$

$$d = \text{menor diluição da série empregada} = 10^2.$$

$$\text{Resultado} = 109,849 \times 10^2 = 1,10 \times 10^4 \text{ rizóbios/g ou rizóbios/mL}$$

O intervalo de confiança para o NMP é determinado multiplicando-se a menor diluição adotada pelos valores correspondentes do intervalo de confiança mínimo e máximo (Brasil, 2010). No exemplo, avaliando essa combinação isolada, e com 95% de certeza, o valor real do número de células viáveis de rizóbios estaria compreendido entre $3,82 \times 10^3$ e $4,79 \times 10^4$ rizóbios/g ou mL de amostra, com $1,10 \times 10^4$ rizóbios/g ou rizóbios/mL sendo o número mais provável (Andrade; Hamakawa, 1994).

Tabelas para ensaios conduzidos com quatro e cinco repetições também são apresentadas nas Tabela C2 e C3.

Tabela B1. Resultados da análise de concentração de rizóbios pelo método do NMP, repetições, diluições e resultado.

Repetição	Diluição 10 ⁻²	Diluição 10 ⁻³	Diluição 10 ⁻⁴	Diluição 10 ⁻⁵	Diluição 10 ⁻⁶	Resultado (rizóbios/g)
1	+	+	+	-	-	(3-3-2) :
2	+	+	-	-	-	1,10 × 10 ⁴
3	+	+	+	-	-	

Legenda: +: presença de nódulo, - : ausência de nódulo, elipse vermelha: menor diluição (d)

B) Exemplo de cálculo de NMP para bactérias diazotróficas, associativas ou endofíticas, em meio semissólido.

Supondo que o ensaio seja realizado de acordo com o método descrito no item Método do Número Mais Provável *in vitro* para bactérias diazotróficas associativas ou endofíticas, com inoculação de três repetições para cada diluição em frascos contendo meio semissólido, e considerando que foram inoculadas alíquotas de 0,1 mL das diluições 10⁻² a 10⁻⁸, após cinco dias de incubação a 28 °C, o resultado obtido foi o descrito a seguir (Tabela B2).

Os três frascos inoculados com as diluições 10⁻² e 10⁻³ apresentaram resultado positivo, ou seja, apresentaram presença de película; um frasco inoculado com a diluição 10⁻⁴ apresentou resultado positivo; já os frascos inoculados com as diluições 10⁻⁵ a 10⁻⁸, apresentaram resultado negativo, isto é, ausência de película em todas as repetições.

Para fins de cálculo é necessário adotar uma série de três diluições, sendo que as diluições subsequentes à última devem ser todas negativas quanto à formação de película. Dessa forma, para o exemplo, as diluições adotadas deverão ser 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴, sendo a combinação “3-3-1” a ser verificada na Tabela C4 (Anexo C). Para essa combinação, o valor do fator NMP correspondente é 45. O cálculo do número de bactérias diazotróficas por grama ou mililitro de amostra, é obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{Número de bactérias/g ou bactérias/mL} = fd \times f \times d$$

Em que: fd = fator de diluição 10 (inoculação de 0,1 mL de alíquota)

f = fator NMP da Tabela C4 (Anexo C) = 45

d = menor diluição da série empregada = 10²

$$\text{Resultado} = 10 \times 45 \times 10^2 = 4,5 \times 10^4 \text{ bactérias diazotróficas/g ou} \\ \text{bactérias diazotróficas/mL}$$

Tabela B2. Resultados da análise de concentração de bactérias diazotróficas associativas ou endofíticas pelo método do NMP, repetições, diluições e resultado.

Diluição Repetição	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	Resultado
1	+	+	+	-	-	-	-	(3-3-1):
2	+	+	-	-	-	-	-	4,5 10 ⁴
3	+	+	-	-	-	-	-	Bactérias/g

Legenda: + : presença de película, - : ausência de película, elipse vermelha: menor diluição (d)

Para ensaios com cinco repetições, consultar a Tabela C5.

APÊNDICE C

Ilustrações de Perfis Genéticos (*Fingerprinting*)

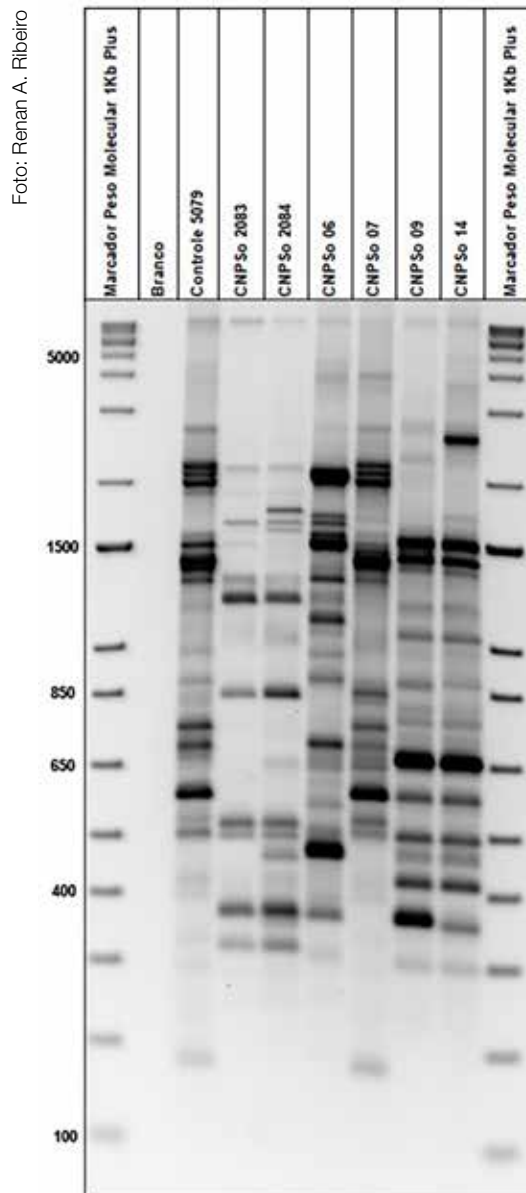


Figura C1. Perfis genéticos de BOX-PCR com peso molecular padrão nas canaletas externas (marcador *1 Kb plus DNA Ladder*TM), controle negativo (branco), controle positivo, *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 (=CNPSo 2083) e Ab-V6 (=CNPSo 2084), *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe CNPSo 06 (=SEMIA 5080), *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079), *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 09 (SEMIA 5019) e *Bradyrhizobium elkanii* estirpe CNPSo 14 (=SEMIA 587). Nota: Controle positivo: Estirpe SEMIA 5079 utilizada como referência.

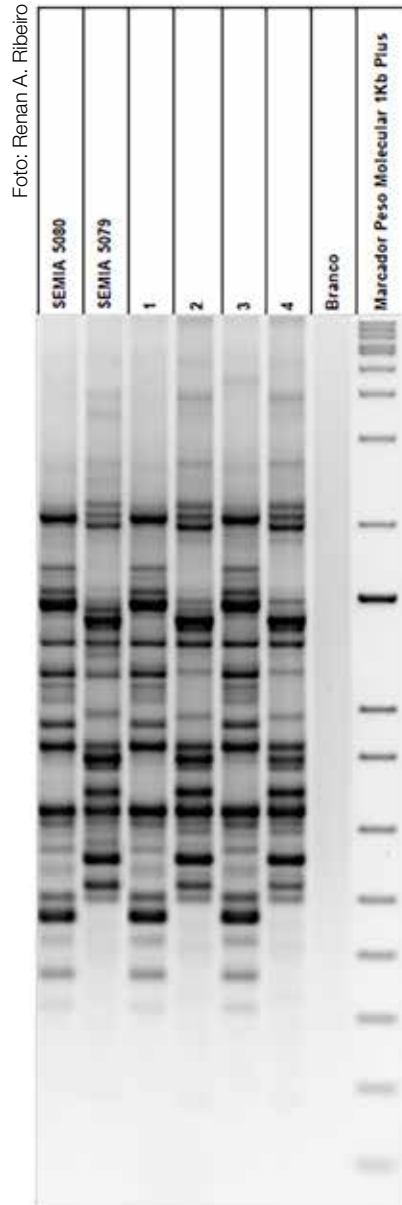


Figura C2. Perfis genéticos de BOX-PCR com controles positivos [*Bradyrhizobium diazoefficiens* CNPSo 06 (=SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium japonicum* CNPSo 07 (=SEMIA 5079)], amostras 1 e 3 (CNPSo 06), 2 e 4 (CNPSo 07), controle negativo (branco) e peso molecular padrão (marcador *1 Kb plus DNA Ladder™*). Nota: Controle positivo: Estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 utilizadas como referência.

Foto: Renan A. Ribeiro

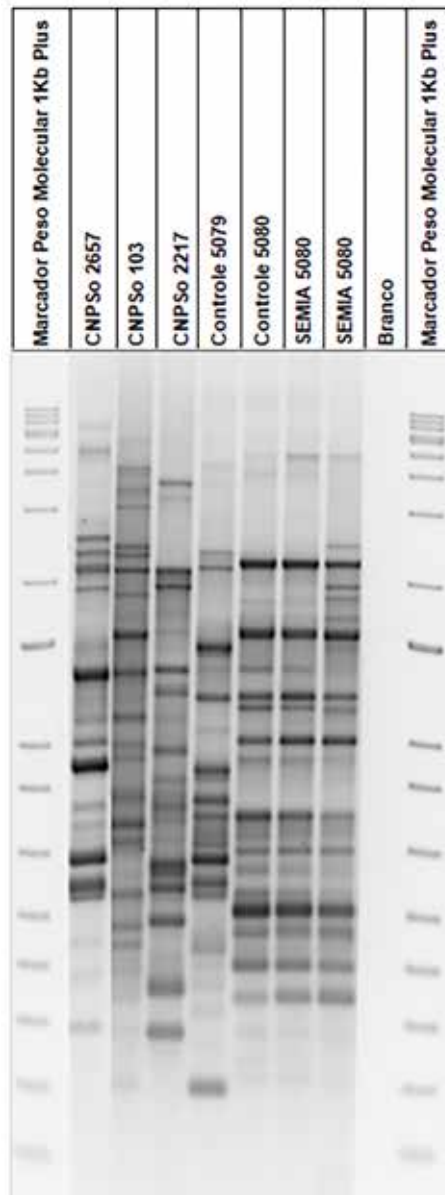


Figura C3. Perfis genéticos de BOX-PCR com peso molecular padrão nas canaletas externas (marcador *1 Kb plus DNA Ladder*TM), perfis de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1), *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077), e *Rhizobium freirei* CNPSo 2217 (=SEMIA 4080), controle positivo com *Bradyrhizobium japonicum* CNPSo 07 (=SEMIA 5079) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* CNPSo 06 (=SEMIA 5080), perfis de *Bradyrhizobium japonicum* CNPSo 06 (SEMIA 5080) e controle negativo (branco). *Nota:* Controle positivo: Estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 utilizadas como referência.

Foto: Renan A. Ribeiro

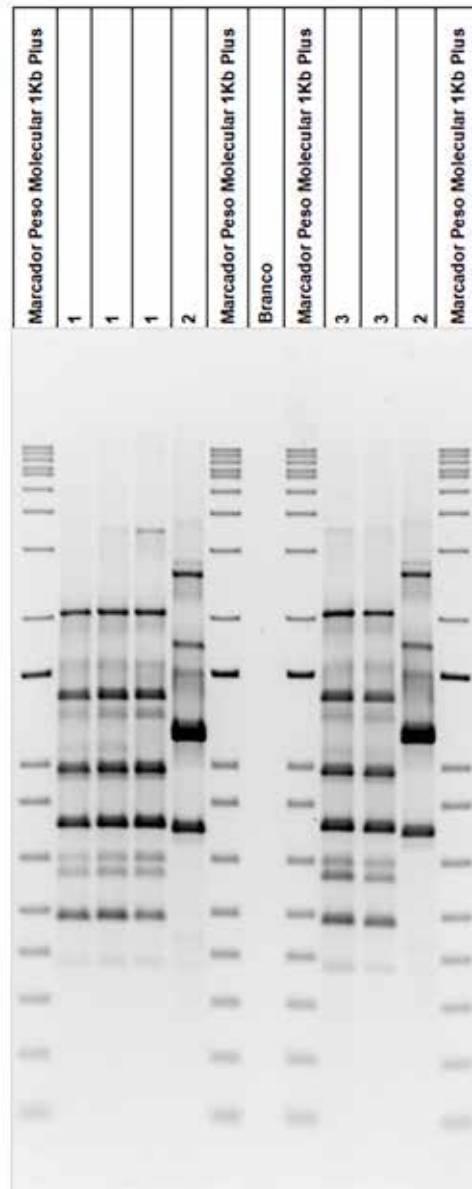


Figura C4. Perfis genéticos de BOX-PCR de *Pseudomonas fluorescens* estirpes CNPSO 2799 e CNPSO 2719 (=CCTB 03), controle negativo e peso molecular padrão (marcador 1 Kb plus DNA Ladder™). Legenda: Perfis 1: Estirpe CNPSO 2799, colônias com aspecto morfológico de superfície lisa, Perfis 2: Estirpe CNPSO 2719; Perfis 3: Estirpe CNPSO 2799, colônias com aspecto morfológico de superfície rugosa, Branco: controle negativo sem DNA. Confirma-se que a estirpe CNPSO 2799 apresenta polimorfismo, mas que se trata da mesma estirpe.

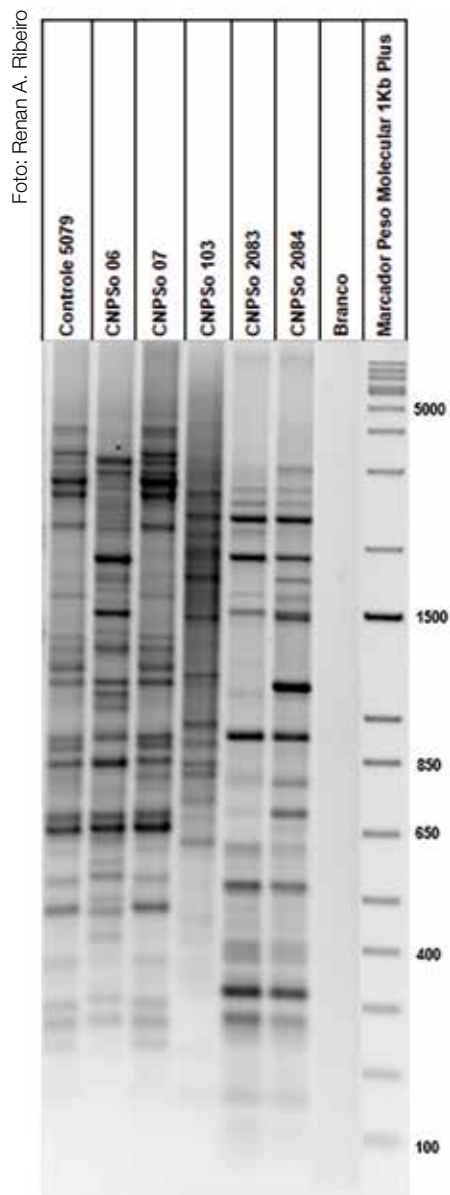


Figura C5. Perfis genéticos de REP1R e REP2I com controle positivo com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079) e os respectivos perfis de *Bradyrhizobium diazoefficiens* CNPSo 06 (=SEMIA 5080), *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CNPSo 07 (=SEMIA 5079), *Rhizobium tropici* CNPSo 103 (=SEMIA 4077), *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (=CNPSo 2083) e *Azospirillum brasilense* Ab-V6 (=CNPSo 2084), controle negativo (branco) e peso molecular padrão 1 Kb plus DNA Ladder™. Nota: Controle positivo: Estirpe SEMIA 5079 utilizada como referência.

APÊNDICE D

Ilustrações de Coloração de Gram

Fotos: Eduara Ferreira

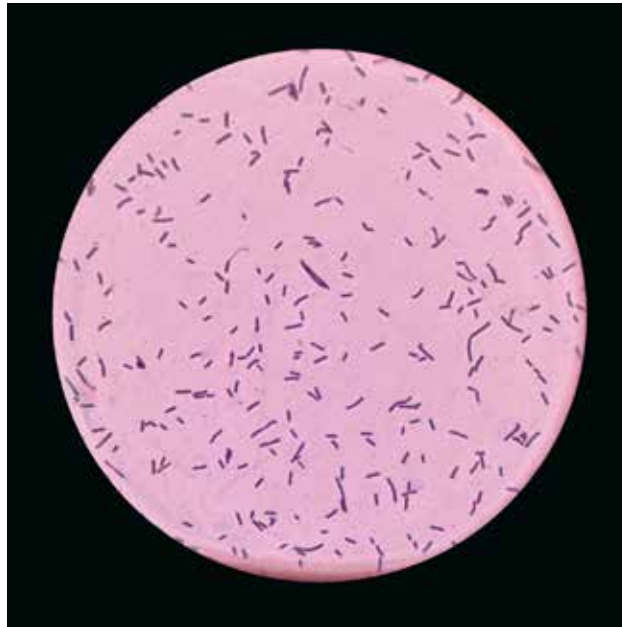


Figura D1. Aspecto de coloração Gram-positiva de *Bacillus subtilis* estirpe CNPSo 2657 (=PRBS-1) no aumento de 1000 × com óleo de imersão em microscópio óptico.

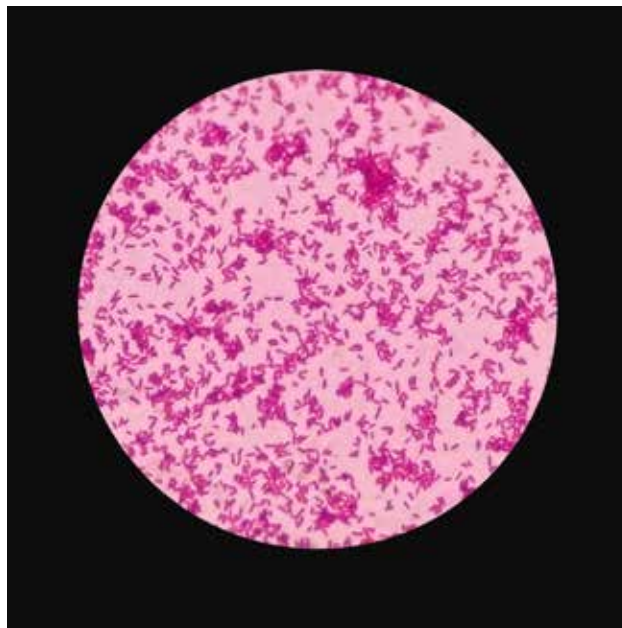


Figura D2. Aspecto de coloração Gram-negativa de *Pseudomonas fluorescens* estirpe CNPSo 2799 no aumento de 1000 × com óleo de imersão em microscópio óptico.

Foto: Eduara Ferreira

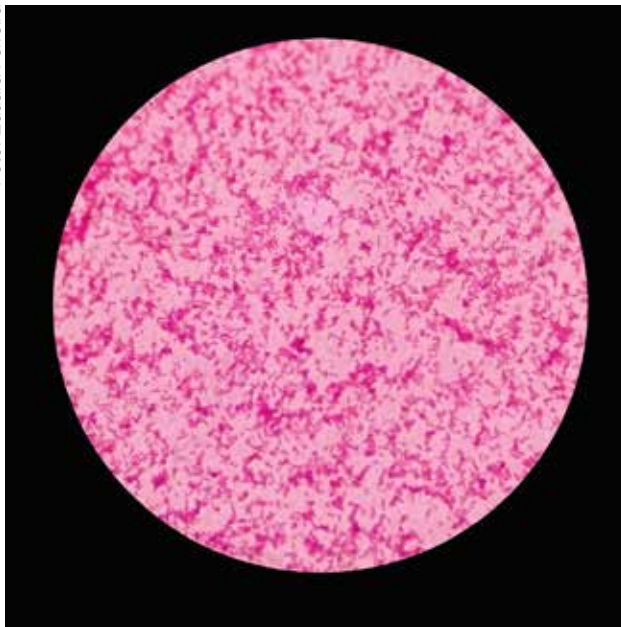


Figura D3. Aspecto de Gram-negativa de *Rhizobium tropici* estirpe CNPSo 103 (=SEMIA 4077, =CIAT 899) no aumento de 1000 × com óleo de imersão em microscópio óptico.



ANEXOS

ANEXO A

Composição e Modo de Preparo dos Meios de Cultura

- ✓ Composição

YM (Yeast Mannitol, extrato de levedura-manitol, também conhecido como meio 79) e YMA (YM acrescido de ágar, modificado do meio de Vincent (1970), segundo Hungria et al., 2016).

K ₂ HPO ₄ (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,2 g L ⁻¹
NaCl (Cloreto de Sódio)	0,1 g L ⁻¹
Manitol	5,0 g L ⁻¹
Extrato de Levedura	0,4 g L ⁻¹
Solução Vermelho Congo 0,25%	10 mL
Água deionizada q.s.p. (quantidade suficiente para)	1000 mL
pH	6,8 – 7,0

A solução de Vermelho Congo 0,25% encontra-se no Anexo B.
Para meio sólido, adicionar ágar, 12 a 15 g L⁻¹.

TSB (Tryptic Soy Broth, caldo de digeridos enzimáticos de caseína e soja) (Relare, 2007).

TSB ¹	30,0 g L ⁻¹
Água deionizada	1000 mL
pH	7,1 - 7,5

¹ Meio de cultura comercial, em conformidade com USP (*United States Pharmacopeia*), EP (*European Pharmacopoeia*), JP (*Japanese Pharmacopoeia*) e FDA/BAM (*Food and Drug Administration/ Bacteriological Analytical Guide*).

DYGS (Dextrose, Yeast, Glucose, Sucrose) (Fukami et al., 2018).

Glicose	2,0 g L ⁻¹
Ácido Málico	2,0 g L ⁻¹
Peptona Bacteriológica	1,5 g L ⁻¹
Extrato de Levedura	2,0 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,5 g L ⁻¹
Ácido Glutâmico	1,5 g L ⁻¹
Água deionizada	1000 mL
pH	6,7 – 6,9

RC (Rojo Congo) (Cassán et al., 2010).

Ácido Málico	5,0 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,2 g L ⁻¹
NaCl (Cloreto de Sódio)	0,1 g L ⁻¹
Extrato de Levedura	0,5 g L ⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O (Cloreto Férrico hexahidratado)	0,015 g L ⁻¹
KOH (Hidróxido de Potássio)	4,8 g L ⁻¹
Solução Vermelho Congo 0,25%	15 mL
Ágar	20 g L ⁻¹
Água deionizada q.s.p.	1000 mL
pH	6,9-7,1

A solução de Vermelho Congo 0,25% encontra-se no Anexo B.

TSA (Tryptic Soy Agar) (Relare, 2007).

TSB ¹	30,0 g L ⁻¹
Ágar	15 g L ⁻¹
Água deionizada	1000 mL
pH	7,1-7,5

¹ Meio de cultura comercial, em conformidade com USP (*United States Pharmacopeia*), EP (*European Pharmacopoeia*), JP (*Japanese Pharmacopoeia*) e FDA/BAM (*Food and Drug Administration/ Bacteriological Analytical Guide*).

KING B (King et al., 1954).

Peptona Bacteriológica	20,0 g L ⁻¹
Glicerol	10 mL L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de Potássio dibásico)	1,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	1,5 g L ⁻¹
Ágar	12 g L ⁻¹
Água deionizada	1000 mL
pH	7,2

NFb semissólido (*Nitrogen Free bromothymol blue*) (Döbereiner, 1991).

Ácido Málico	5,0 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,1 g L ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Cloreto de Cálcio dihidratado)	0,02 g L ⁻¹
Solução de Micronutrientes	2 mL
Solução de Azul de Bromotimol 0,5%	2 mL
EDTA férrico 1,64%	4 mL
KOH (Hidróxido de Potássio)	4,0 g L ⁻¹
Ágar	1,7 g L ⁻¹
Água deionizada q.s.p.	1000 mL
pH	6,8

Nota: As soluções de micronutrientes, azul de bromotimol 0,5%, EDTA férrico 1,64%, encontram-se no Anexo B.

✓ Modo de Preparo

Para o preparo dos meios de cultura sólidos, acrescentar o ágar em frasco autoclavável (Figura AA1), solubilizar os componentes do meio de cultura em um béquer e, após correção do pH, com o auxílio de um potenciômetro, transferir a solução para os frascos contendo ágar. Para a correção do pH podem ser utilizadas as soluções de HCl 3 mol L⁻¹ (Ácido clorídrico 3 mol L⁻¹) ou NaOH 3 mol L⁻¹ (Hidróxido de sódio 3 mol L⁻¹) (Anexo B), conforme a necessidade.



Figura AA1. Frascos contendo meio de cultura YMA (*Yeast Mannitol Agar*) e frascos contendo ágar, antes da autoclavagem.

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

Após autoclavar, em câmara de fluxo laminar, distribuir o meio de cultura em placas de Petri em quantidade suficiente para cobrir o fundo da placa (Figura AA2) e incubar por no mínimo 24 horas para verificar se há crescimento de contaminantes. Descartar as placas com meio de cultura que apresentarem o crescimento de microrganismos contaminantes. As placas com meio distribuído podem ser armazenadas em refrigerador ou câmara fria.

Para o método de recuperação e quantificação de rizóbios em sementes inoculadas, visando controlar contaminações provenientes das sementes, adicionar a cada 300 mL de meio de cultura esterilizado, na temperatura de 45-50 °C, 200 µL da solução de actidione (ciclohexamida) (Anexo B) e 100 µL da solução de vancomicina (cloridrato de vancomicina) (Anexo B), ou quantidades proporcionais ao volume do meio. A adição das

soluções de antibióticos no meio de cultura deve ser realizada em câmara de fluxo laminar. A quantidade dos agentes antimicrobianos adicionada ao meio de cultura foi validada no Laboratório de Biotecnologia do Solo.



Figura AA2. Distribuição do meio de cultura YMA (*Yeast Mannitol Agar*) em placas de Petri em câmara de fluxo laminar.

✓ **Prazo de Validade**

O tempo de armazenamento dos meios de cultura dependerá das condições de cada laboratório, mas, em geral, os meios de cultura apresentados nesse manual podem ser armazenados em refrigerador, em frascos de vidro, pelo prazo de seis meses, de acordo com as validações realizadas no laboratório de Biotecnologia do Solo.

ANEXO B

Composição e Modo de Preparo das Soluções

Solução Vermelho Congo 0,25%

Vermelho Congo	0,25 g
Água deionizada	100 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 1 ano, em frasco âmbar em temperatura ambiente.

Solução de Azul de Bromotimol 0,5%

Azul de bromotimol	0,5 g
Solução de KOH 0,2 mol L ⁻¹	100 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 6 meses em temperatura ambiente.

Solução de KOH 0,2 mol L⁻¹ (Hidróxido de Potássio)

KOH (Hidróxido de potássio)	11,2 g
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 6 meses em temperatura ambiente.

Solução de EDTA de Ferro 1,64%

C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₈ FeNa.3H ₂ O (EDTA de ferro)	1,64 g
Água deionizada	100 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 6 meses em temperatura ambiente.

Solução de Micronutrientes

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (Molibdato de sódio dihidratado)	0,2 g
MnSO ₄ .H ₂ O (Sulfato de manganês hidratado)	0,235 g
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de cobre pentahidratado)	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de zinco heptahidratado)	0,024 g
Água deionizada	200 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por 6 seis meses em temperatura ambiente.

Solução Fisiológica 0,85%

NaCl (Cloreto de sódio)	8,5 g
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 6 meses em refrigerador ou câmara fria (2 a 12 °C).

Hipoclorito de Sódio 0,4–0,6%

NaClO (Hipoclorito de sódio) 4–6%	100 mL
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

Nota: Sugere-se preparar diariamente antes do uso.

Solução Nutritiva (utilizada nos sacos de polipropileno) (Broughton; Dilworth, 1971)

Solução estoque 1: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L ⁻¹	0,5 mL
Solução estoque 2: KH_2PO_4 0,5 mol L ⁻¹	0,5 mL
Solução estoque 3: Fe, Mg, S e Mn	0,5 mL
Solução estoque 4: Micronutrientes	0,5 mL
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se preparar diariamente antes do uso.

Solução estoque 1: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mol L⁻¹ (Cloreto de Cálcio Dihidratado)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,1 g
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 1 ano, em frasco vidro âmbar, em refrigerador (2 a 8 °C).

Solução estoque 2: KH_2PO_4 0,5 mol L⁻¹ (Fosfato de Potássio Monobásico)

KH_2PO_4	68,1 g
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 1 ano, em frasco vidro âmbar em refrigerador (2 a 8 °C).

Solução estoque 3: Fe, Mg, S e Mn (Ferro, Magnésio, Enxofre e Manganês)

Fe – EDTA (EDTA Férrico)	3,67 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de magnésio heptahidratado)	61,65 g
K_2SO_4 (Sulfato de potássio Anidro)	43,5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Manganês hidratado)	0,169 g
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 1 ano, em frasco vidro âmbar em refrigerador (2 a 8 °C).

Solução estoque 4: Micronutrientes

Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O (Molibdato de sódio dihidratado)	0,0553 g
CoSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de cobalto heptahidratado)	0,028 g
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	0,124 g
CuSO ₄ .5H ₂ O (Sulfato de cobre pentahidratado)	0,05 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Sulfato de zinco heptahidratado)	0,144 g
Água deionizada	1000 mL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 1 ano, em frasco vidro âmbar, em refrigerador (2 a 8 °C).

Solução estoque de Tween 80 (Polioxietilenorbitano Monolaurato) 2,5% p/v

Tween 80	2,5 g
Água deionizada	100 mL

Nota: Sugere-se preparar diariamente antes do uso.

Solução estoque de Vancomicina (Cloridrato de Vancomicina)

Cloridrato de vancomicina	0,009 g
Água deionizada	3,0 mL

Nota: Em câmara de fluxo laminar, filtrar a solução em membrana filtrante esterilizante de 0,2 µm em frasco de vidro esterilizado. Sugere-se armazenamento por até um ano em refrigerador (2 a 8 °C).

Solução estoque de Actidione (Cicloheximida)

Cicloheximida	4,2 g
Álcool etílico	50 mL

Nota: Em câmara de fluxo laminar, filtrar a solução em membrana filtrante esterilizante de 0,2 µm em frasco de vidro esterilizado. Sugere-se armazenamento por até um ano, em refrigerador (2 a 8 °C). Utilizar luvas para manipular essa substância.

Solução Tampão TBE 1X

Solução estoque TBE 10X	100 mL
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

Solução Estoque TBE 10X

C ₄ H ₁₁ NO ₃ (Tris ultrapuro)	108 g
H ₃ BO ₃ (Ácido bórico)	55 g
EDTA dissódico 0,5 mol L ⁻¹ pH 8,0	40 mL
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

Nota 1: Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

Nota 2: Sugere-se armazenamento por até 1 ano em temperatura ambiente.

Solução de EDTA de Sódio 0,5 mol L⁻¹ pH 8,0

C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O (EDTA dissódico)	186,12 g
Água deionizada	1000 mL
NaOH (Hidróxido de sódio) pastilhas	Para ajuste de pH
NaOH 3 mol L ⁻¹	Para ajuste de pH
HCl 3 mol L ⁻¹	Para ajuste de pH

Nota 1: Para ajustar o pH da solução, em agitador magnético, adicionar pastilhas de NaOH até a solução apresentar-se límpida. Em seguida, inserir o eletrodo de um potenciômetro na solução e fazer o ajuste final com solução de HCl ou NaOH, conforme necessário.

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

Nota 2: Sugere-se armazenamento por até 2 anos em temperatura ambiente.

Solução de HCl 3 mol L⁻¹ (Ácido Clorídrico)

HCl (Ácido clorídrico)	250 mL
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

Nota 1: Em capela de exaustão, adicionar cerca de 500 mL de água purificada em balão volumétrico de 1000 mL; adicionar o ácido clorídrico (HCl) na água no balão volumétrico com auxílio de funil de vidro e completar o volume para 1000 mL com água deionizada.

Nota 2: Sugere-se armazenamento por até 6 meses em temperatura ambiente.

Solução de NaOH 3 mol L⁻¹ (Hidróxido de Sódio)

NaOH (Hidróxido de sódio)	120 g
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

Nota 1: Em capela de exaustão, colocar cerca de 500 mL de água purificada em um béquer; adicionar o NaOH no béquer, após dissolver, transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água deionizada.

Nota 2: Sugere-se armazenamento por até 6 meses em temperatura ambiente.

Solução Tampão de Amostra

Azul de bromofenol (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S)	0,25 g
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	40 g
Álcool etílico 70%	10 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

Nota 1: Dissolver o azul de bromofenol em álcool etílico 70% e a sacarose em água deionizada. Em balão volumétrico de 100 mL, misturar as duas soluções e completar o volume com água deionizada.

Nota 2: Sugere-se armazenamento por 2 anos, em refrigerador (2 a 8 °C).

Solução de Brometo de Etídio ($C_{21}H_{20}BrN_3$)

Brometo de etídio 10 mg mL ⁻¹ ($C_{21}H_{20}BrN_3$) ¹	40 µL
Água deionizada	800 mL

¹ solução comercial

Nota: Sugere-se armazenamento por 5 a 10 dias, protegido da luz.

Solução de $MgCl_2$ 50 m mol L⁻¹ (Cloreto de Magnésio)

$MgCl_2$ (Cloreto de magnésio)	0,475 g
Água deionizada esterilizada	100 mL

Nota 1: Essa solução pode ser adquirida comercialmente.

Nota 2: Sugere-se armazenamento por até 1 ano em freezer (abaixo de -10 °C).

Solução de dNTPS 1,5 m mol L⁻¹

dATP 100 mmol	6 µL
dGTP 100 mmol	6 µL
dTTP 100 mmol	6 µL
dCTP 100 mmol	6 µL
Água ultrapura esterilizada q.s.p.	400 µL

Nota: Sugere-se armazenamento por até 1 ano em freezer (abaixo de -10 °C).

Solução Tampão 10x para Taq polimerase

Solução Tris 500 mmol L ⁻¹ pH 8,4	400 µL
Solução de KCl 1000 mmol L ⁻¹	500 µL
Água ultrapura esterilizada q.s.p.	1000 µL

Nota 1: Essa solução pode ser adquirida comercialmente

Nota 2: Sugere-se armazenamento por até 1 ano em freezer (abaixo de -10 °C).

Solução Tris 500 mmol L⁻¹ pH 8,4

$C_4H_{11}NO_3$ (Tris ultrapuro)	6,105 g
Água deionizada	100 mL

Nota: Ajustar o pH para 8,4 utilizando HCl 3 mol L⁻¹ ou NaOH 3 mol L⁻¹, conforme necessário, filtrar a solução em filtro de 0,22 µm e armazenar por até 1 ano em freezer (abaixo de -10 °C).

Solução KCl (Cloreto de Potássio) 1000 mmol L⁻¹

KCl (Cloreto de potássio)	7,45 g
Água deionizada	100 mL

Nota: Filtrar a solução em filtro de 0,22 µm e armazenar por até 1 ano em freezer (abaixo de -10 °C).

Solução estoque de *primer* BOX-A1R a 100 pmol μL^{-1}

Primer liofilizado 48,7 nmoles	-
Água ultrapura esterilizada	487 μL

Nota 1: Cálculo para a reconstituição do primer a uma concentração de 100 μmolar (equivalente a 100 pmol/ μL):

Quantidade do primer liofilizado \times 1000/concentração desejável em μmolar = a quantidade de água ultrapura em μL que deve ser adicionada ao primer liofilizado.

1000 = conversão de nanomoles para picomoles

Então: $48,7 \times 1000 / 100 = 487 \mu\text{L}$

Nota 2: Deixar em banho de gelo durante uma hora, homogeneizando de 20 em 20 minutos.

Nota 3: Sugere-se armazenar por até 3 anos em freezer (abaixo de $-10 \text{ }^\circ\text{C}$).

Solução *primer* BOX-A1R a 50 pmol μL^{-1}

Solução estoque de primer BOX-A1R a 100 pmol μL^{-1}	50 μL
Água ultrapura esterilizada	50 μL

Nota 1: Quantidade suficiente para um volume final de 100 μL de solução final (100 reações).

Nota 2: Sugere-se armazenar por até 1 ano em freezer (abaixo de $-10 \text{ }^\circ\text{C}$).

ANEXO C

Tabelas

Tabela C1. Números mais prováveis para diluições decimais com três réplicas, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança (IC).

Diluição			Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
D1	D2	D3			Mínimo	Máximo
0	0	1	0,300	0,332	0,073	1,675
0	0	2	0,601	0,001	0,186	2,176
0	0	3	0,904	0,000	0,329	2,645
0	1	0	0,305	3,365	0,074	1,698
0	1	1	0,611	0,045	0,189	2,208
0	1	2	0,917	0,000	0,334	2,684
0	1	3	1,224	0,000	0,498	3,140
0	2	0	0,620	0,156	0,192	2,239
0	2	1	0,930	0,004	0,338	2,722
0	2	2	1,242	0,000	0,505	3,185
0	2	3	1,555	0,000	0,686	3,636
0	3	0	0,944	0,004	0,343	2,762
0	3	1	1,261	0,000	0,512	3,233
0	3	2	1,579	0,000	0,695	3,693
0	3	3	1,898	0,000	0,890	4,141
1	0	0	0,357	39,203	0,087	2,058
1	0	1	0,723	0,624	0,225	2,711
1	0	2	1,098	0,006	0,399	3,336
1	0	3	1,482	0,000	0,601	3,948
1	1	0	0,736	6,445	0,228	2,762
1	1	1	1,118	0,179	0,407	3,401
1	1	2	1,510	0,002	0,612	4,026
1	1	3	1,911	0,000	0,838	4,644
1	2	0	1,138	0,627	0,414	3,468
1	2	1	1,538	0,025	0,623	4,108
1	2	2	1,950	0,000	0,854	4,740
1	2	3	2,370	0,000	1,104	5,356
1	3	0	1,568	0,030	0,635	4,194
1	3	1	1,988	0,002	0,871	4,842
1	3	2	2,418	0,000	1,126	5,486
1	3	3	2,860	0,000	1,397	6,126
2	0	0	0,917	31,927	0,288	3,773

Continua...

Tabela C1. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
2	0	1	1,432	1,120	0,522	4,791
2	0	2	1,990	0,019	0,802	5,832
2	0	3	2,600	0,000	1,123	6,887
2	1	0	1,469	11,963	0,535	4,951
2	1	1	2,046	0,632	0,823	6,037
2	1	2	2,680	0,015	1,156	7,143
2	1	3	3,359	0,000	1,529	8,261
2	2	0	2,106	2,318	0,847	6,261
2	2	1	2,763	0,170	1,191	7,420
2	2	2	3,478	0,005	1,579	8,598
2	2	3	4,240	0,000	2,009	9,782
2	3	0	2,855	0,216	1,229	7,726
2	3	1	3,602	0,021	1,632	8,966
2	3	2	4,408	0,001	2,082	10,217
2	3	3	5,254	0,000	2,574	11,478
3	0	0	2,312	34,098	0,871	12,822
3	0	1	3,850	3,099	1,511	17,662
3	0	2	6,348	0,158	2,434	22,749
3	0	3	9,538	0,004	3,706	27,927
3	1	0	4,272	37,433	1,664	21,327
3	1	1	7,488	6,579	2,777	28,088
3	1	2	11,520	0,649	4,380	35,159
3	1	3	15,878	0,032	6,485	42,502
3	2	0	9,324	32,817	3,331	38,555
3	2	1	14,938	12,507	5,569	50,581
3	2	2	21,470	2,470	8,652	64,067
3	2	3	29,170	0,235	12,543	79,220
3	3	0	23,970	36,594	9,128	139,550
3	3	1	46,208	42,767	17,836	240,763
3	3	2	109,849	44,442	38,227	478,767

Fonte: Adaptado de Andrade e Hamakawa (1994).

Tabela C2. Número mais prováveis para uso com diluições decimais e quatro réplicas, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança (IC).

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
1	0	0	0,255	37,449	0,062	1,445
2	0	0	0,598	28,252	0,186	2,283
3	0	0	1,126	24,382	0,410	3,802
4	0	0	2,311	23,822	0,941	10,213
0	1	0	0,227	3,352	0,055	1,268
1	1	0	0,519	5,788	0,161	1,916
2	1	0	0,926	8,865	0,337	2,877
3	1	0	1,597	14,093	0,644	4,796
4	1	0	3,614	31,830	1,526	15,319
0	2	0	0,460	0,172	0,142	1,665
1	2	0	0,794	0,584	0,288	2,375
2	2	0	1,278	1,540	0,517	3,490
3	2	0	2,137	4,307	0,926	5,913
4	2	0	6,215	28,693	2,505	23,367
0	3	0	0,700	0,006	0,254	2,045
1	3	0	1,081	0,038	0,438	2,834
2	3	0	1,655	0,161	0,723	4,133
3	3	0	2,770	0,793	1,261	7,172
4	3	0	11,450	25,514	4,428	38,923
0	4	0	0,943	0,000	0,383	2,419
1	4	0	1,380	0,001	0,606	3,299
2	4	0	2,059	0,008	0,955	4,810
3	4	0	3,517	0,072	1,661	8,588
4	4	0	23,978	26,174	9,816	110,708
0	0	1	0,226	0,331	0,054	1,255
1	0	1	0,513	0,565	0,159	1,892
2	0	1	0,912	0,850	0,332	2,829
3	0	1	1,562	1,311	0,630	4,663
4	0	1	3,387	2,705	1,435	13,518
0	1	1	0,455	0,045	0,141	1,648
1	1	1	0,784	0,150	0,285	2,344
2	1	1	1,258	0,387	0,509	3,428
3	1	1	2,085	1,042	0,904	5,726
4	1	1	5,498	5,802	2,271	19,610
0	2	1	0,691	0,003	0,251	2,024
1	2	1	1,068	0,021	0,432	2,796
2	2	1	1,627	0,089	0,711	4,055
3	2	1	2,693	0,419	1,229	6,921
4	2	1	9,398	9,199	3,731	29,251

Continua...

Tabela C2. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
0	3	1	0,933	0,000	0,379	2,393
1	3	1	1,362	0,001	0,598	3,254
2	3	1	2,024	0,011	0,938	4,715
3	3	1	3,406	0,099	1,613	8,255
4	3	1	16,268	15,031	6,640	49,168
0	4	1	1,181	0,000	0,520	2,760
1	4	1	1,668	0,000	0,779	3,721
2	4	1	2,450	0,000	1,192	5,408
3	4	1	4,245	0,011	2,068	9,754
4	4	1	38,499	36,950	16,169	170,485
0	0	2	0,450	0,001	0,139	1,630
1	0	2	0,774	0,005	0,281	2,314
2	0	2	1,238	0,013	0,501	3,370
3	0	2	2,037	0,035	0,884	5,555
4	0	2	4,980	0,170	2,095	17,075
0	1	2	0,683	0,000	0,248	2,002
1	1	2	1,054	0,002	0,427	2,758
2	1	2	1,601	0,008	0,700	3,981
3	1	2	2,620	0,037	1,198	6,688
4	1	2	8,068	0,603	3,285	24,094
0	2	2	0,924	0,000	0,375	2,367
1	2	2	1,343	0,000	0,590	3,210
2	2	2	1,990	0,002	0,923	4,623
3	2	2	3,302	0,019	1,568	7,954
4	2	2	12,958	1,621	5,364	35,463
0	3	2	1,168	0,000	0,515	2,730
1	3	2	1,646	0,000	0,769	3,670
2	3	2	2,408	0,000	1,171	5,297
3	3	2	4,100	0,005	2,003	9,362
4	3	2	21,838	4,696	9,469	60,745
0	4	2	1,419	0,000	0,666	3,095
1	4	2	1,960	0,000	0,962	4,140
2	4	2	2,857	0,000	1,443	6,012
3	4	2	5,024	0,000	2,516	10,939
4	4	2	70,197	37,360	37,360	271,301
0	0	3	0,677	0,000	0,246	1,981
1	0	3	1,041	0,000	0,422	2,724
2	0	3	1,575	0,000	0,689	3,910
3	0	3	2,557	0,000	1,169	6,478

Continua...

Tabela C2. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
4	0	3	7,118	0,006	2,966	20,743
0	1	3	0,912	0,000	0,371	2,342
1	1	3	1,326	0,000	0,583	3,167
2	1	3	1,954	0,000	0,908	4,535
3	1	3	3,207	0,000	1,526	7,676
4	1	3	10,938	0,039	4,598	28,697
0	2	3	1,157	0,000	0,509	2,701
1	2	3	1,625	0,000	0,758	3,620
2	2	3	2,368	0,000	1,149	5,197
3	2	3	3,963	0,000	1,954	8,972
4	2	3	16,780	0,172	7,379	42,000
0	3	3	1,403	0,000	0,659	3,061
1	3	3	1,932	0,000	0,950	4,078
2	3	3	2,803	0,000	1,415	5,892
3	3	3	4,838	0,000	2,432	10,482
4	3	3	28,400	0,887	12,910	73,902
0	4	3	1,657	0,000	0,818	3,422
1	4	3	2,258	0,000	1,153	4,556
2	4	3	3,279	0,000	1,709	6,617
3	4	3	5,848	0,000	3,000	12,145
4	4	3	138,569	42,187	52,601	507,080
0	0	4	0,903	0,000	0,367	2,317
1	0	4	1,308	0,000	0,576	3,125
2	0	4	1,921	0,000	0,894	4,452
3	0	4	3,119	0,000	1,488	7,416
4	0	4	9,538	0,000	4,072	24,461
0	1	4	1,143	0,000	0,504	2,672
1	1	4	1,603	0,000	0,749	3,570
2	1	4	2,321	0,000	1,131	5,093
3	1	4	3,839	0,000	1,888	8,678
4	1	4	13,951	0,001	6,194	33,395
0	2	4	1,388	0,000	0,652	3,027
1	2	4	1,908	0,000	0,937	4,023
2	2	4	2,752	0,000	1,391	5,766
3	2	4	4,672	0,000	2,354	10,070
4	2	4	20,920	0,008	9,706	48,923
0	3	4	1,641	0,000	0,809	3,387
1	3	4	2,226	0,000	1,138	4,490
2	3	4	3,208	0,000	1,678	6,472

Tabela C2. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
3	3	4	5,618	0,000	2,896	11,613
4	3	4	36,181	0,084	17,084	88,599
0	4	4	1,898	0,000	0,975	3,748
1	4	4	2,557	0,000	1,351	4,974
2	4	4	3,708	0,000	1,989	7,224
3	4	4	6,698	0,000	3,528	13,339

Fonte: Andrade e Hamakawa (1994).

Tabela C3. Números mais prováveis para diluições decimais com cinco réplicas, probabilidades de ocorrência e limites mínimo e máximo do intervalo de confiança (IC).

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
1	0	0	0,199	36,483	0,048	1,118
2	0	0	0,447	26,579	0,139	1,664
3	0	0	0,777	21,738	0,283	2,431
4	0	0	1,276	18,681	0,516	3,799
5	0	0	2,312	16,643	1,003	8,676
0	1	0	0,182	3,344	0,044	1,012
1	1	0	0,403	5,450	0,125	1,473
2	1	0	0,684	7,662	0,249	2,067
3	1	0	1,071	10,459	0,433	2,951
4	1	0	1,689	14,827	0,735	4,659
5	1	0	3,289	26,380	1,473	12,173
0	2	0	0,367	0,182	0,114	1,326
1	2	0	0,612	0,563	0,223	1,814
2	2	0	0,931	1,282	0,377	2,472
3	2	0	1,384	2,720	0,605	3,497
4	2	0	2,161	6,259	0,991	5,626
5	2	0	4,932	26,016	2,169	17,179
0	3	0	0,556	0,009	0,202	1,624
1	3	0	0,828	0,042	0,336	2,151
2	3	0	1,190	0,143	0,522	2,885
3	3	0	1,721	0,455	0,798	4,074
4	3	0	2,708	1,716	1,293	6,713
5	3	0	7,923	22,564	3,309	24,796
0	4	0	0,748	0,000	0,304	1,917
1	4	0	1,050	0,002	0,462	2,489
2	4	0	1,460	0,010	0,681	3,308
3	4	0	2,086	0,048	1,013	4,686
4	4	0	3,350	0,302	1,644	7,952
5	4	0	12,988	19,923	5,406	38,961
0	5	0	0,944	0,000	0,416	2,205
1	5	0	1,279	0,000	0,599	2,829
2	5	0	1,743	0,000	0,853	3,744
3	5	0	2,480	0,002	1,249	5,337
4	5	0	4,111	0,027	2,059	9,338
5	5	0	23,978	18,721	10,430	93,682
0	0	1	0,180	0,332	0,044	1,004
1	0	1	0,399	0,535	0,124	1,459
2	0	1	0,677	0,743	0,246	2,043
3	0	1	1,055	0,997	0,428	2,906

Continua...

Tabela C3. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
4	0	1	1,658	1,374	0,721	4,543
5	0	1	3,139	2,273	1,408	11,112
0	1	1	0,364	0,045	0,113	1,315
1	1	1	0,607	0,137	0,221	1,795
2	1	1	0,921	0,307	0,373	2,443
3	1	1	1,364	0,639	0,601	3,427
4	1	1	2,116	1,418	0,971	5,469
5	1	1	4,562	5,206	2,035	15,241
0	2	1	0,551	0,004	0,200	1,611
1	2	1	0,820	0,020	0,333	2,130
2	2	1	1,176	0,068	0,516	2,850
3	2	1	1,696	0,211	0,787	4,003
4	2	1	2,643	0,758	1,263	6,508
5	2	1	6,993	7,892	2,999	21,049
0	3	1	0,741	0,000	0,301	1,900
1	3	1	1,040	0,002	0,458	2,464
2	3	1	1,442	0,009	0,673	3,266
3	3	1	2,054	0,043	0,997	4,600
4	3	1	3,260	0,259	1,603	7,679
5	3	1	10,858	11,038	4,602	30,036
0	4	1	0,936	0,000	0,412	2,186
1	4	1	1,267	0,000	0,592	2,801
2	4	1	1,722	0,001	0,843	3,694
3	4	1	2,437	0,005	1,229	5,233
4	4	1	3,982	0,056	2,001	8,983
5	4	1	17,238	16,148	7,540	47,884
0	5	1	1,134	0,000	0,532	2,472
1	5	1	1,499	0,000	0,738	3,140
2	5	1	2,015	0,000	1,027	4,136
3	5	1	2,857	0,000	1,484	5,906
4	5	1	4,829	0,006	2,469	10,452
5	5	1	34,760	31,238	15,496	134,382
0	0	2	0,362	0,002	0,112	1,304
1	0	2	0,601	0,005	0,219	1,779
2	0	2	0,910	0,012	0,369	2,414
3	0	2	1,345	0,024	0,589	3,385
4	0	2	2,072	0,052	0,953	5,322
5	0	2	4,268	0,169	1,923	13,773
0	1	2	0,547	0,000	0,199	1,598

Continua...

Tabela C3. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
1	1	2	0,813	0,002	0,330	2,109
2	1	2	1,163	0,006	0,511	2,814
3	1	2	1,670	0,019	0,776	3,936
4	1	2	2,582	0,067	1,235	6,315
5	1	2	6,308	0,575	2,763	18,473
0	2	2	0,734	0,000	0,299	1,884
1	2	2	1,030	0,000	0,453	2,439
2	2	2	1,425	0,002	0,665	3,224
3	2	2	2,020	0,008	0,983	4,519
4	2	2	3,171	0,045	1,564	7,427
5	2	2	9,438	1,343	4,070	25,088
0	3	2	0,929	0,000	0,409	2,167
1	3	2	1,255	0,000	0,587	2,771
2	3	2	1,700	0,000	0,833	3,645
3	3	2	2,399	0,002	1,210	5,134
4	3	2	3,861	0,019	1,946	8,662
5	3	2	14,058	2,916	6,222	35,595
0	4	2	1,124	0,000	0,528	2,450
1	4	2	1,484	0,000	0,730	3,107
2	4	2	1,990	0,000	1,014	4,080
3	4	2	2,806	0,000	1,460	5,789
4	4	2	4,663	0,005	2,392	10,044
5	4	2	22,118	6,982	10,143	58,002
0	5	2	1,323	0,000	0,654	2,733
1	5	2	1,722	0,000	0,883	3,449
2	5	2	2,290	0,000	1,207	4,530
3	5	2	3,247	0,000	1,733	6,482
4	5	2	5,589	0,001	2,917	11,580
5	5	2	54,210	33,684	23,386	194,950
0	0	3	0,541	0,000	0,197	1,584
1	0	3	0,804	0,000	0,327	2,089
2	0	3	1,150	0,000	0,505	2,781
3	0	3	1,648	0,000	0,765	3,871
4	0	3	2,523	0,001	1,210	6,136
5	0	3	5,770	0,009	2,577	16,561
0	1	3	0,730	0,000	0,296	1,868
1	1	3	1,020	0,000	0,449	2,415
2	1	3	1,409	0,000	0,658	3,184
3	1	3	1,990	0,000	0,968	4,439

Continua...

Tabela C3. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
4	1	3	3,090	0,002	1,526	7,199
5	1	3	8,388	0,044	3,691	21,787
0	2	3	0,920	0,000	0,405	2,149
1	2	3	1,242	0,000	0,582	2,743
2	2	3	1,680	0,000	0,823	3,599
3	2	3	2,360	0,000	1,191	5,040
4	2	3	3,750	0,002	1,897	8,365
5	2	3	12,049	0,152	5,395	29,244
0	3	3	1,115	0,000	0,523	2,428
1	3	3	1,468	0,000	0,724	3,073
2	3	3	1,963	0,000	1,001	4,028
3	3	3	2,758	0,000	1,436	5,675
4	3	3	4,510	0,001	2,326	9,659
5	3	3	17,498	0,497	8,140	41,492
0	4	3	1,312	0,000	0,648	2,708
1	4	3	1,703	0,000	0,874	3,412
2	4	3	2,260	0,000	1,192	4,468
3	4	3	3,188	0,000	1,703	6,349
4	4	3	5,390	0,000	2,820	11,116
5	4	3	27,804	1,968	13,240	69,472
0	5	3	1,516	0,000	0,780	2,990
1	5	3	1,946	0,000	1,033	3,756
2	5	3	2,570	0,000	1,396	4,923
3	5	3	3,651	0,000	1,996	7,062
4	5	3	6,390	0,000	3,401	12,730
5	5	3	91,759	34,542	37,218	295,079
0	0	4	0,721	0,000	0,294	1,852
1	0	4	1,010	0,000	0,445	2,391
2	0	4	1,391	0,000	0,650	3,146
3	0	4	1,960	0,000	0,954	4,364
4	0	4	3,018	0,000	1,493	6,978
5	0	4	7,588	0,000	3,390	19,410
0	1	4	0,912	0,000	0,402	2,130
1	1	4	1,228	0,000	0,576	2,716
2	1	4	1,660	0,000	0,815	3,551
3	1	4	2,322	0,000	1,173	4,950
4	1	4	3,648	0,000	1,849	8,093
5	1	4	10,610	0,002	4,808	25,190
0	2	4	1,104	0,000	0,519	2,408

Continua...

Tabela C3. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
1	2	4	1,453	0,000	0,716	3,043
2	2	4	1,939	0,000	0,990	3,973
3	2	4	2,710	0,000	1,414	5,566
4	2	4	4,370	0,000	2,259	9,323
5	2	4	14,788	0,011	6,936	33,554
0	3	4	1,300	0,000	0,642	2,685
1	3	4	1,687	0,000	0,865	3,377
2	3	4	2,233	0,000	1,178	4,406
3	3	4	3,130	0,000	1,675	6,222
4	3	4	5,210	0,000	2,734	10,684
5	3	4	21,212	0,053	10,305	47,799
0	4	4	1,501	0,000	0,773	2,964
1	4	4	1,923	0,000	1,022	3,715
2	4	4	2,538	0,000	1,378	4,855
3	4	4	3,582	0,000	1,959	6,915
4	4	4	6,148	0,000	3,284	12,192
5	4	4	34,531	0,358	16,900	82,467
0	5	4	1,707	0,000	0,909	3,245
1	5	4	2,172	0,000	1,190	4,056
2	5	4	2,860	0,000	1,590	5,319
3	5	4	4,070	0,000	2,271	7,647
4	5	4	7,214	0,000	3,922	13,880
5	5	4	160,883	40,960	66,026	528,982
0	0	5	0,904	0,000	0,399	2,113
1	0	5	1,218	0,000	0,570	2,689
2	0	5	1,642	0,000	0,805	3,509
3	0	5	2,288	0,000	1,155	4,864
4	0	5	3,548	0,000	1,805	7,840
5	0	5	9,538	0,000	4,370	22,290
0	1	5	1,094	0,000	0,514	2,387
1	1	5	1,440	0,000	0,709	3,013
2	1	5	1,918	0,000	0,978	3,923
3	1	5	2,668	0,000	1,391	5,448
4	1	5	4,250	0,000	2,214	8,963
5	1	5	12,928	0,000	6,112	28,621
0	2	5	1,289	0,000	0,637	2,662
1	2	5	1,670	0,000	0,857	3,342
2	2	5	2,205	0,000	1,163	4,348
3	2	5	3,078	0,000	1,647	6,102

Continua...

Tabela C3. Continuação.

D1	Diluição		Fator NMP	Prob. (%)	Intervalo de Confiança	
	D2	D3			Mínimo	Máximo
4	2	5	5,030	0,000	2,654	10,293
5	2	5	17,668	0,000	8,661	37,976
0	3	5	1,488	0,000	0,767	2,942
1	3	5	1,908	0,000	1,012	3,676
2	3	5	2,503	0,000	1,360	4,790
3	3	5	3,518	0,000	1,925	6,774
4	3	5	5,926	0,000	3,178	11,711
5	3	5	25,260	0,003	12,716	54,486
0	4	5	1,692	0,000	0,901	3,216
1	4	5	2,149	0,000	1,176	4,016
2	4	5	2,821	0,000	1,570	5,243
3	4	5	3,990	0,000	2,230	7,481
4	4	5	6,930	0,000	3,780	13,281
5	4	5	42,560	0,034	21,237	97,173
0	5	5	1,898	0,000	1,042	3,495
1	5	5	2,400	0,000	1,346	4,366
2	5	5	3,150	0,000	1,791	5,716
3	5	5	4,498	0,000	2,557	8,237
4	5	5	8,060	0,000	4,475	15,040

Fonte: Andrade e Hamakawa (1994).

Tabela C4. Tabela de McCrady para estimativa do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas em contagem com três repetições por diluição.

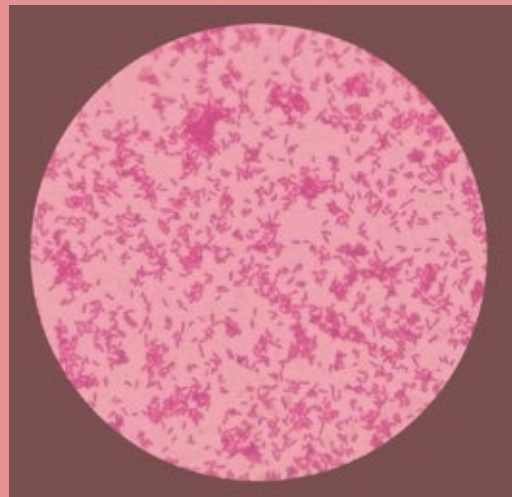
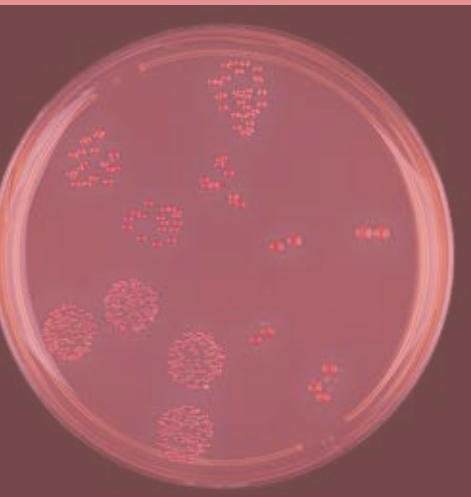
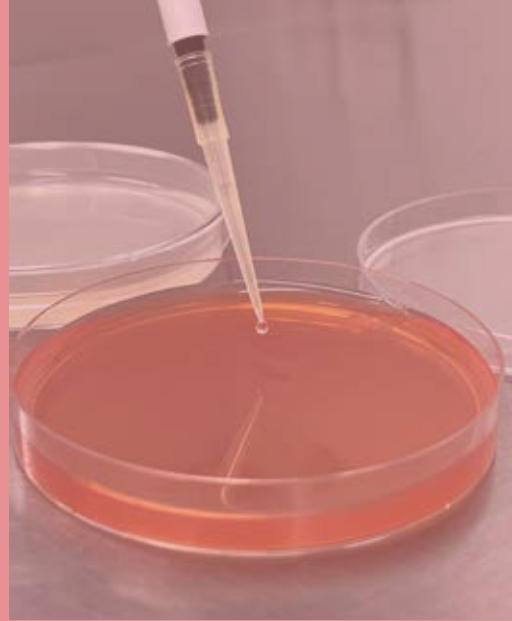
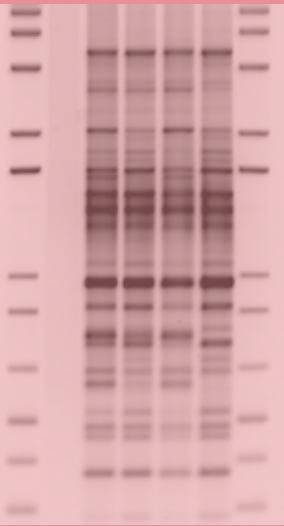
Diluição com crescimento	NMP (f)	Diluição com crescimento	NMP (f)	Diluição com crescimento	NMP (f)	Diluição com crescimento	NMP (f)
0 0 0	0,0	1 2 1	1,4	2 2 3	4,0	3 2 0	9,5
0 0 1	0,3	1 3 0	1,6	2 3 0	3,0	3 2 1	15,0
0 1 0	0,3	2 0 0	0,9	2 3 1	3,5	3 2 2	20,0
0 1 1	0,6	2 0 1	1,4	2 3 2	4,0	3 2 3	30,0
0 2 0	0,6	2 0 2	2,0	3 0 0	2,5	3 3 0	25,0
1 0 0	0,4	2 1 0	1,5	3 0 1	4,0	3 3 1	45,0
1 0 1	0,7	2 1 1	2,0	3 0 2	6,5	3 3 2	110,0
1 0 2	1,1	2 1 2	3,0	3 1 0	4,5	3 3 3	140,0
1 1 0	0,7	2 2 0	2,0	3 1 1	7,5		
1 1 1	1,1	2 2 1	3,0	3 1 2	11,5		
1 2 0	1,1	2 2 2	3,5	3 1 3	16,0		

Fonte: Brasil (2010).

Tabela C5. Tabela de McCrady para estimativa do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas em contagem com cinco repetições por diluição.

Diluição com crescimento	NMP (f)	Diluição com crescimento	NMP (f)	Diluição com crescimento	NMP (f)	Diluição com crescimento	NMP (f)
000	0,0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5,0
002	0,4	211	0,9	402	2,0	521	7,0
010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12,0
012	0,6	221	1,2	411	2,0	524	15,0
020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
021	0,6	230	1,2	420	2,0	530	8,0
030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11,0
100	0,2	240	1,4	422	3,0	532	14,0
101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
102	0,6	301	1,1	431	3,0	534	20,0
103	0,8	302	1,4	432	4,0	535	25,0
110	0,4	310	1,1	410	3,5	540	13,0
111	0,6	311	1,4	441	4,0	541	17,0
112	0,8	312	1,7	450	4,0	542	25,0
120	0,6	313	2,0	451	5,0	543	30,0
121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35,0
122	1,0	321	1,7	501	3,0	545	45,0
130	0,8	322	2,0	502	4,0	550	25,0
131	1,0	330	1,7	503	6,0	551	35,0
140	1,1	331	2,0	504	7,5	552	60,0
200	0,5	340	2,0	510	3,5	553	90,0
201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160,0
202	0,9	350	2,5	512	6,0	555	180,0

Fonte: Brasil (2010).



Apoio



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA

