



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAMILA RAFAELI BOCATTI

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE INOCULANTES DE  
*BRADYRHIZOBIUM* SPP. E *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*  
PRODUZIDOS *ON FARM***

---

Londrina  
2020

CAMILA RAFAELI BOCATTI

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE INOCULANTES DE  
*BRADYRHIZOBIUM* SPP. E *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*  
PRODUZIDOS *ON FARM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B664q Bocatti, Camila Rafaeli.  
Qualidade microbiológica de inoculantes de Bradyrhizobium spp. e Azospirillum brasilense produzidos on farm / Camila Rafaeli Bocatti. - Londrina, 2020.  
81 f. : il.

Orientador: Marco Antonio Nogueira.  
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Inoculação - Tese. 2. Coinoculação - Tese. 3. Fixação Biológica de Nitrogênio - Tese. 4. Microrganismos patogênicos - Tese. I. Nogueira, Marco Antonio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

CAMILA RAFAELI BOCATTI

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE INOCULANTES DE  
*BRADYRHIZOBIUM* SPP. E *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*  
PRODUZIDOS *ON FARM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária – Embrapa Soja

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mariangela Hungria  
Empresa Brasileira de Pesquisa  
Agropecuária – Embrapa Soja

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Amanda Letícia Pit Nunes  
Total Biotecnologia

Londrina, 21 de fevereiro de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus. Toda essa jornada só foi possível por eu ter a certeza de que Ele é Pai, justo e bom, e age de acordo com as necessidades de cada filho.

Agradeço imensamente aos meus pais, Darcy e Guimar. Meus exemplos de vida e honestidade. Doaram suas vidas por mim e por meus irmãos. Sem eles, eu jamais seria quem sou hoje.

Aos meus irmãos, Cíntia, Guilherme e Fernanda, minha ponte com a melhor infância que alguém poderia ter. Meus companheiros de percurso.

Ao meu eterno amor, Adriano, por todo apoio e paciência. Nunca escondeu o orgulho que sente de mim.

A todos os amigos do Laboratório de Biotecnologia de Solos da Embrapa Soja, Alisson, Amanda, Artur, Débora, Flávia, Gabriel, Jhonatan, Lully, Maria Beatriz, Maria Clara, Mariana, Paloma, Paula, Rafaela, Thiago e Vanessa, sem eles essa jornada teria sido mais árdua, em especial às amigas Fabiane Paulitsch e Fernanda Moura, por pararem seus trabalhos para me socorrer nos dias de maior sobrecarga.

Ao doutorando Leonardo Medeiros, do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina, por todo suporte com as análises de antibiograma.

Aos funcionários do laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja: Lígia, Renan e Eduara pela paciência e boa vontade, sempre prontos em ajudar. Também a pós-doutoranda, Jakeline Delamuta, pela delicadeza ao sanar minhas dúvidas na parte molecular, sempre com carinho.

Ao meu orientador, Dr. Marco Antonio Nogueira, pelas orientações pontuais e assertivas, sempre disponível, paciente e sereno. Não poderia ter escolhido melhor orientador! Minha eterna gratidão.

À Dra<sup>a</sup> Mariangela Hungria, pelo privilégio de vê-la vestir a camisa deste trabalho, auxiliar e conduzir com verdadeiro amor de mãe! Minha eterna admiração.

A todos os produtores e colaboradores que disponibilizaram as amostras. Sem a sua contribuição, este trabalho não seria possível.

BOCATTI, Camila Rafaeli. **Qualidade microbiológica de inoculantes de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* produzidos *on farm***. 2020. 81f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O uso de inoculantes com bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento de plantas tem grande importância nos sistemas de produção não apenas da soja, mas também de vários cereais como milho, trigo e arroz, além de pastagens. Todavia, muitos produtores têm investido na tentativa de multiplicação *on farm* desses microrganismos, sem as condições assépticas necessárias para garantir sua pureza e concentração. O objetivo deste trabalho foi analisar amostras provenientes de multiplicações *on farm* de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, visando estimar a concentração de células dos microrganismos de interesse e identificar possíveis microrganismos contaminantes. As amostras foram obtidas de propriedades rurais, em tanques de multiplicação, por meio de um kit de amostragem e enviadas ao laboratório sob refrigeração para análise. Foi empregado o método da diluição seriada e espalhamento em placas de Petri para contagem e seleção das colônias microbianas, nos meios de cultura YMA (Yeast Manitol Agar), RC (Rojo Congo), LB (Luria Bertani), AN (Ágar Nutriente) e Sabouraud. Após obtenção de isolados puros, morfologicamente distintos, foi feita a identificação molecular por meio do sequenciamento parcial do gene 16S (900-1100 pb) e comparação em bancos de dados. Para determinação da presença das bactérias de interesse foi empregado o teste do Número Mais Provável (NMP). Para *Bradyrhizobium* o teste foi realizado em plantas iscas de soja em sacos de polipropileno contendo solução nutritiva. Para *Azospirillum*, empregou-se o teste *in vitro* em meio semi-sólido NFb (Nitrogen-Free Bromothymol blue), verificando-se a ocorrência de alcalinização do meio e presença de véu de crescimento típico. Foram analisadas 18 amostras de cinco estados brasileiros, sendo seis de *Bradyrhizobium* e 12 de *Azospirillum*. Ao todo foram isolados e identificados 85 microrganismos, sendo que *Bradyrhizobium* foi encontrado em duas amostras nas concentrações  $9,3 \times 10^2$  e  $0,357 \times 10^1$  e *Azospirillum* em uma amostra na concentração  $2,5 \times 10^5$ . Todas as amostras apresentaram microrganismos contaminantes. Entre 25 gêneros de microrganismos, 44% são potenciais agentes patogênicos como *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*. 61,1% das amostras apresentaram isolados com alta homologia com *Enterococcus faecalis*, uma bactéria patogênica a humanos e animais, frequentemente relacionada com bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, abscessos, meningites e endocardites. 33,3% continham isolados resistentes a antimicrobianos recomendados pelo “Clinical & Laboratory Standards Institute”; um dos isolados, do gênero *Enterococcus* mostrou-se resistente a todos os antimicrobianos recomendados. Também foram encontradas leveduras em 55,5% das amostras. As amostras de inoculantes provenientes das multiplicações *on farm* não possuem os microrganismos de interesse ou, quando presentes, estão em concentrações abaixo das indicadas e apresentam vários microrganismos contaminantes que podem conferir risco à saúde humana e animal.

Palavras-chave: Inoculação. Coinoculação. Fixação Biológica de Nitrogênio. Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas. Microrganismos patogênicos. Fermentação *on farm*.

BOCATTI, Camila Rafaeli. **Microbiological quality of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants produced on farm.** 2020. 81f. Dissertation (Master in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The use of inoculants with diazotrophic and plant growth-promoting bacteria is of great importance in the production systems not only of soybean, but also of various cereals such as corn, wheat and rice, as well as pastures. However, many farmers have tried to multiply these microorganisms *on farm*, without the necessary aseptic conditions to guarantee their purity and concentration. The objective of this work was to analyze samples from on farm multiplications of inoculants based on *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*, aiming to estimate the concentration of cells of the microorganisms of interest and to identify possible contaminating microorganisms. The samples were collected in rural properties, from multiplication tanks, using a sampling kit and sent to the laboratory under refrigeration for analysis. The method of serial dilution and spreading on Petri dishes was used to count and select microbial colonies in the culture media YMA (Yeast Mannitol Agar), RC (Rojo Congo), LB (Luria Bertani), AN (Agar Nutrient) and Sabouraud. After obtaining pure, morphologically distinct isolates, molecular identification was performed by partial sequencing of the 16S gene (900-1100 bp) and comparison with ribosomal databases. To determine the presence of the bacteria of interest, the Most Probable Number (MPN) test. For *Bradyrhizobium*, MPN was carried out on soybean as trap plants in polypropylene bags containing nutrient solution. For *Azospirillum*, the MPN was conducted in vitro in a semi-solid NFb (Nitrogen-Free Bromothymol blue) medium, verifying the occurrence of alkalization of the medium and the presence of a typical growth veil. Eighteen samples from five Brazilian states, including six of *Bradyrhizobium* and 12 of *Azospirillum* were analyzed. Overall, 85 microorganisms were isolated and identified, where *Bradyrhizobium* was found in two samples at the concentrations of  $9,3 \times 10^2$  and  $0,357 \times 10^1$  and *Azospirillum* in one sample at the concentration  $2,5 \times 10^5$ . All samples showed contaminating microorganisms. Among 25 genera of microorganisms, 44% are potential pathogens such as *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Enterococcus* and *Pseudomonas*. 61.1% of the samples presented isolates with high homology with *Enterococcus faecalis*, a bacterium pathogenic to humans and animals, often related to bacteremia, septicemia, urinary tract infections, abscess, meningitis and endocarditis. 33.3% contained antimicrobial resistant isolates recommended by Clinical & Laboratory Standards Institute One of the isolates of the genus *Enterococcus* was resistant to all recommended antimicrobials. In addition, yeasts were found in 55.5% of the samples. The samples from inoculants produced on farm do not have the microorganisms of interest or, when present, they are in below the indicated concentrations and present several contaminating microorganisms that may threaten human and animal health.

Keywords: Inoculation. Coinoculation. Biological Nitrogen Fixation. Plant Growth Promoting Bacteria. Pathogenic microorganisms. *On farm* fermentation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Ágar Nutriente
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
LB	Lúria Bertani
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFb	Nitrogen-Free Bromothymol blue
NMP	Número Mais Provável
RC	Rojo Congo
YMA	Yeast Mannitol Ágar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>09</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
2.1	A CULTURA DA SOJA.....	11
2.2	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO .....	12
2.3	RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS .....	16
2.4	<i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> .....	17
2.5	COINOCULAÇÃO COM <i>BRADYRHIZOBIUM</i> E <i>AZOSPIRILLUM</i> .....	18
2.6	INOCULANTES.....	20
2.7	PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE INOCULANTES .....	21
2.8	PRODUÇÃO DE INOCULANTES <i>ON FARM</i> .....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
4.1	OBTENÇÃO DOS INOCULANTES.....	27
4.2	COLETA DAS AMOSTRAS.....	27
4.3	DILUIÇÃO SERIADA DECIMAL.....	28
4.4	MÉTODO DO ESPALHAMENTO EM PLACA DE PETRI E ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS.....	28
4.5	ANÁLISES DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ORGANOLÉPTICAS DAS AMOSTRAS.....	29
4.6	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	29
4.7	AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL POR PCR .....	29
4.8	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENES RIBOSSOMAIS .....	30
4.9	CONCENTRAÇÃO DE RIZÓBIOS NODULANTES DE SOJA NAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL EM PLANTAS DE SOJA.....	31
4.10	CONCENTRAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL EM MEIO SEMISSÓLIDO.....	33
4.11	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE DISCO-	

	DIFUSÃO .....	34
4.12	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS SOB MICROSCÓPIO ÓPTICO .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>74</b>
	APÊNDICE A – Protocolo de Amostragem .....	75
	APÊNDICE B – Ficha de Identificação das Amostras .....	76
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>77</b>
	ANEXO A – Composição dos meios de cultura utilizados.....	78
	ANEXO B – Composição das soluções utilizadas.....	80

## 1 INTRODUÇÃO

A soja é umas das principais *commodities* do agronegócio brasileiro, com uma projeção da safra 2019/2020 ultrapassando 125 milhões de toneladas em uma área plantada de aproximadamente 37 milhões de hectares. O sucesso desta cultura no Brasil ocorre, dentre outros fatores, devido à eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) por meio da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, que supre a demanda de N exigido pela planta, cerca de 80 kg para cada tonelada de soja produzida, garantindo altos rendimentos sem que seja necessário utilizar fertilizantes nitrogenados. O nitrogênio é um dos nutrientes mais requeridos por esta cultura, estando envolvido na síntese de macromoléculas como ATP, clorofila, ácidos nucleicos e proteínas. Entretanto, organismos eucariotos, como os vegetais, são incapazes de absorver e assimilar este elemento diretamente da atmosfera, apesar de sua abundância. Em contrapartida, alguns organismos procariotos, também denominados diazotróficos, são eficientes fixadores de nitrogênio, convertendo-o a uma forma absorvível e assimilável pelas plantas por meio de um complexo enzimático denominado nitrogenase.

Além das bactérias fixadoras de nitrogênio, outro grupo de microrganismos tem contribuído com o avanço da agricultura no Brasil: as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Estas bactérias estimulam o crescimento e o desenvolvimento das plantas ao se associarem ao sistema radicular por meio de sua atividade biorreguladora de produção e excreção de hormônios vegetais como auxinas, giberelinas e citocininas, além de outros mecanismos como solubilização de fosfatos, antibiose e indução de resistência sistêmica. Na cultura da soja, o *Azospirillum* tem se destacado, e, quando associada com *Bradyrhizobium* em coinoculação, resulta em ganhos expressivos de produtividade. O uso de inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio e RPCP nas lavouras de soja brasileiras tem contribuído não somente com o aumento da produtividade, mas também com a economia anual de cerca de 15 bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados. Apesar de o solo ser naturalmente colonizado por microrganismos, a inoculação contribui com o aporte de microrganismos fisiologicamente ativos.

A produção de inoculantes no Brasil é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e deve seguir recomendações

que garantam sua qualidade e eficiência, como concentração mínima de células, ausência de contaminantes na diluição  $1 \times 10^{-5}$  e viabilidade até a data de vencimento, que deve ser de, no mínimo, seis meses.

Apesar da alta qualidade e do baixo custo dos inoculantes produzidos no Brasil, alguns produtores têm investido na produção popularmente conhecida como *on farm*, de inoculantes e de outros insumos biológicos sem, muitas vezes, atender às condições necessárias para que o produto final tenha a concentração e a pureza que garantam sua eficiência, sem adequado controle de qualidade. Muitas vezes, os microrganismos que se desenvolvem nesse tipo de produção são contaminantes que, além de se multiplicarem mais rapidamente que os microrganismos de interesse podem, inclusive, oferecer riscos à saúde humana e animal por apresentarem potencial patogênico. Algumas destas bactérias possuem resistência a antimicrobianos, revelando mais um risco desta prática, que colabora para a manutenção e disseminação de genes de resistência.

O objetivo desse trabalho foi analisar amostras de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* produzidos *on farm* em várias regiões do Brasil, visando estimar a concentração de células viáveis dos microrganismos de interesse, identificar e caracterizar possíveis contaminantes quanto ao potencial risco sanitário.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A CULTURA DA SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta herbácea, pertencente à classe Magnoliopsida (Dicotiledônea), ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Faboideae, gênero *Glycine*, sendo *Glycine max* a espécie mais cultivada em todo o mundo (SEDIYAMA, 2009). Originária do continente asiático, a leguminosa já constituía a base alimentar do povo chinês há mais de 5.000 anos (CÂMARA, 2015). Trazida dos Estados Unidos, foi introduzida no Brasil em 1822 por Gustavo D'utra, professor da Escola de Agronomia da Bahia. Contudo, em virtude da baixa latitude da região, não houve êxito no cultivo naquele Estado (DALL'AGNOL et al., 2007). Somente na década de 1940 o grão obteve sucesso no Rio Grande Sul como alternativa de verão para a sucessão do trigo (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003) e, a partir dos anos 1960, houve a expansão das áreas de cultivo para outras regiões do país (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). É considerada uma cultura chave para a segurança alimentar global, por ser fonte de proteína e energia para a nutrição humana e animal, respondendo por 56% da produção de oleaginosas no mundo (USDA, 2019).

Segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), para a safra 2019/20, a oleaginosa apresentou crescimento na área plantada de 2,6% em relação à safra anterior, correspondendo a 36,8 milhões de hectares, com a produção nacional estimada em mais de 125 milhões de toneladas. A região Centro-Oeste é responsável por 45,1% da produção nacional, sendo o Estado de Mato Grosso o maior produtor, contribuindo com 27,4% (CONAB, 2020). Dados da Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro (Agrostat) revelam que, até o mês de junho de 2019, aproximadamente 83,6 milhões de toneladas do grão foram exportadas, além das exportações de óleo e farelo de soja, que totalizaram 18,3 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2019).

A produção da leguminosa no país está entre as práticas econômicas com crescimento mais expressivo. Em virtude da estrutura e demanda do mercado internacional, o acréscimo na produção pode ser atribuído a uma série de fatores, tais como o elevado teor de proteínas dos grãos (aproximadamente 40%), considerável teor de óleo (cerca de 20%) e seu cultivo ser integralmente

mecanizado e altamente automatizado (HIRAKURI; LAZZAROTTO, 2014). A soja é uma *commodity* padronizada, garantindo sua produção e negociação por produtores de diversos países. A leguminosa assegurou sua posição de principal *commodity* agrícola sustentada por diferentes segmentos, como produção de carnes, elaboração de bebidas à base de soja e fabricação de óleos alimentícios (RIGO et al., 2015). Além disso, o avanço da leguminosa no Brasil foi possibilitado devido à implementação de programas de melhoramento genético para a cultura, com o desenvolvimento de cultivares mais resistentes a algumas doenças que afetam a cultura, além da adaptação a regiões com diferentes condições edafoclimáticas (FREITAS, 2011). Ademais, a soja foi adaptada a baixas latitudes, o que permite uma ampla gama de ambientes de produção no país, por meio do desenvolvimento de cultivares adaptadas a diferentes ambientes e com alto potencial produtivo (CÂMARA, 2015).

O oitavo levantamento para a produção mundial de soja prevê volume de 337,5 milhões de toneladas para a safra 2019/20, com expectativas de que o Brasil supere os Estados Unidos como o principal produtor de soja do mundo nessa safra, o que o tornaria responsável por 33% da produção mundial, seguido pelos EUA com 32,85% e, em terceiro lugar, a Argentina com 15,80%. Juntos, estes três países são responsáveis por 81,65% da safra mundial da oleaginosa (USDA, 2019).

## 2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é o elemento químico mais abundante na atmosfera terrestre, cerca de 78%, na forma do gás inerte  $N_2$ . Nos sistemas biológicos, o N é um dos componentes de macromoléculas essenciais à vida como enzimas, proteínas e ácidos nucleicos. Nas plantas está associado à formação de raízes, composição da clorofila, produção e translocação de fotoassimilados (HUNGRIA, MENDES, MERCANTE, 2013). Organismos eucariotos, como os vegetais, são incapazes de incorporar o  $N_2$  atmosférico, cuja tripla ligação covalente que une os dois átomos é extremamente forte e estável. Apenas as formas inorgânicas reativas, como o nitrato ( $NO_3^-$ ) e o amônio ( $NH_4^+$ ) são passíveis de absorção e assimilação pelas plantas (BRILL, 1977).

O principal meio de incorporação de N ao ecossistema ocorre pela redução enzimática do N<sub>2</sub> atmosférico à amônia (NH<sub>3</sub>), em um processo realizado exclusivamente por organismos procariotos, denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), que contribui tanto com a reposição do conteúdo de N perdido por lixiviação, volatilização ou desnitrificação, quanto com a redução do uso de fertilizantes nitrogenados. Deste modo, essa etapa do ciclo do N contribui com 65% de todo N incorporado aos sistemas biológicos (ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013). Ao converter o N<sub>2</sub> atmosférico em amônia, a FBN atende ao suprimento global de N, fornecendo 175 milhões de toneladas ao ano. Ambientes naturais e agrícolas são beneficiados pela atividade de microrganismos fixadores de nitrogênio, tanto pela reposição de N, quanto pela substituição do uso de fertilizantes nitrogenados (DIXON; KAHN, 2004; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013). Considera-se que a FBN seja um dos processos biológicos mais importantes do planeta, depois da fotossíntese (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002; MENDES et al., 2010). A diazotrofia, habilidade de reduzir o N atmosférico à amônia, é uma característica exclusiva dos domínios *Bacteria* e *Archaea* (SAWADA et al., 2003; GOYAL; MAHESHWARI, 2012; ORMEÑO-ORRILLO; HUNGRIA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2013). Estudos realizados por Hellriegel e Wilfarth em 1888 foram os primeiros a identificar os microrganismos presentes nos nódulos das raízes de leguminosas e atribuí-los como responsáveis pela obtenção do N atmosférico. No mesmo ano, esses microrganismos foram isolados por Beijerinck, que os denominaram *Bacillus radicicola* (SMITH; RICHARDS; NEWTON, 2013).

Além da FBN, as demais fontes de N para as plantas são o solo, a fixação não-biológica e os fertilizantes nitrogenados (FAGAN et al., 2007). No solo, o N oriundo da mineralização da matéria orgânica se esgota rapidamente, assim como aquele proveniente da fixação não-biológica decorrente de descargas elétricas, vulcanismo e combustões, as quais não são capazes de suprir a demanda geral desse nutriente nos agrossistemas e ecossistemas naturais (HUNGRIA; CAMPO e MENDES, 2007). Os fertilizantes nitrogenados caracterizam uma forma de N de absorção e assimilação mais rápida, porém muito onerosa. O processo industrial de obtenção de amônia (NH<sub>3</sub>) a partir de N<sub>2</sub> é um processo químico, conhecido como Haber-Bosch, que demanda altas temperaturas e pressão, utilizando, para isto, fontes não renováveis de energia (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além disso, os

fertilizantes nitrogenados possuem um aproveitamento raramente superior a 50%, sendo, portanto, de baixa eficiência (HUNGRIA; CAMPO e MENDES, 2007). Somado ao alto custo econômico, há ainda os riscos ambientais de sua fabricação e utilização, resultando em poluição atmosférica por ser fonte de gases efeito estufa e contaminação de corpos aquáticos com nitrato.

A FBN pode ser classificada em três grupos quanto à interação das bactérias diazotróficas com as plantas: i) vida livre, que utilizam o N fixado para seu próprio uso, mas eventualmente uma pequena porção pode ser disponibilizada às plantas, especialmente após a morte e mineralização das células bacterianas; ii) associativas, que apresentam algum grau de interação com a planta hospedeira, endofiticamente ou no rizoplane, mas sem a formação de estruturas diferenciadas; iii) simbióticas, em que ocorre uma estreita interação com a planta hospedeira com a formação de estruturas especializadas como os nódulos, resultando em uma relação morfológica e fisiológica funcional entre os dois parceiros da simbiose (FAGAN, 2007; GIONGO, 2007).

Algumas leguminosas, como a soja, possuem a capacidade de formar simbiose com bactérias diazotróficas capazes de suprir a maior parte do N demandado pela planta. Estas bactérias adentram o sistema radicular, via pelos radiculares e a infecção desencadeia mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, em ambos os simbiontes. Ocorre, na planta, a formação de estruturas especializadas denominadas de nódulos e a bactéria se diferencia em bacteroide no interior destas estruturas, o que culmina na síntese do complexo enzimático nitrogenase e da proteína leghemoglobina (FAGAN et al., 2007; SILVA et al., 2011). A habilidade de fixar  $N_2$  destas bactérias é atribuída à presença desse complexo enzimático, composto por Ferro-proteína (Fe-proteína) e Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína). No entanto, ambas são extremamente sensíveis ao oxigênio ( $O_2$ ) (DIXON; KAHN, 2004), que mesmo em níveis baixos é capaz de inativar a enzima de forma irreversível. Por esta razão, a leghemoglobina, tem a função de regular a disponibilidade de  $O_2$  no interior do nódulo, protegendo-o contra o excesso de  $O_2$ . O nódulo, quando ativo, apresenta uma coloração rosácea intensa em seu interior, indicativo da atividade da leghemoglobina (SINCLAIR e VALDEZ, 2012).

No interior dos nódulos as bactérias reduzem o  $N_2$  a  $NH_3$ , que é rapidamente convertida em  $NH_4^+$ , o qual é, posteriormente, distribuído aos tecidos vegetais por meio de moléculas orgânicas como ureídos e aminoácidos

(VELÁZQUEZ; SILVA; PEIX, 2010). A FBN é um processo natural, de baixo custo, altamente eficiente e sem impactos ao meio ambiente (HUNGRIA; CAMPO e MENDES, 2007). A planta, por sua vez, fornece fotoassimilados aos microrganismos, formando-se uma simbiose entre planta-bactéria, em que ambas se beneficiam (ZUFFO, 2016).

As bactérias coletivamente chamadas de rizóbios são os principais contribuintes para a FBN em simbiose com leguminosas de importância agrônômica como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) e a soja, respectivamente, e vêm sendo utilizados há várias décadas como inoculantes (XAVIER et al., 2004). Atualmente, os inoculantes para soja comercializados no Brasil são produzidos com as estirpes autorizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019, *B. japonicum* SEMIA 5079 (BÁRBARO et al., 2009) e *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 (DELAMUTA et al., 2013), que podem ser introduzidas aos pares ou isoladamente nos inoculantes comerciais.

As bactérias diazotróficas, principalmente as simbióticas, têm sido alvo de várias pesquisas em todo o mundo. Em 1960, a Comissão Nacional da Soja ressaltou a importância da FBN, destacando a necessidade de priorizar sua integração ao programa de melhoramento genético dessa cultura. A partir de então, fertilizantes nitrogenados foram substituídos pela inoculação com estirpes eficientes de bactérias diazotróficas simbióticas (ALCANTARA et al., 2014). A caracterização destes microrganismos quanto à eficiência da FBN é fundamental para o desenvolvimento de variedades mais aptas a formar simbiose e se beneficiar da FBN (MOREIRA et al., 2010).

Originalmente, os solos brasileiros não possuíam rizóbios eficientes em nodular soja, uma vez que a cultura é exótica. Entretanto, após a inoculação e o cultivo da soja, uma população de rizóbios se estabelece no solo e é capaz de nodular as culturas de soja estabelecidas nos anos seguintes (LOUREIRO et al. 2006). Existe, ainda, a hipótese que os *Bradyrhizobium* nodulantes de soja estabelecidos nos solos brasileiros vieram com as primeiras sementes de soja provenientes dos Estados Unidos (FERREIRA; HUNGRIA, 2002).

Todas as cultivares melhoradas de soja no Brasil possuem eficiência na FBN, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. A FBN é tão eficiente que as tentativas de aumentar o rendimento de grãos pela adição de fertilizantes nitrogenados dificilmente são bem-sucedidas se as plantas forem inoculadas

adequadamente com estirpes selecionadas (ALVES, BODDEY; URQUIAGA, 2003; SATURNO et al., 2017). Campos, Hungria e Tedesco (2001) enfatizam a importância da seleção de estirpes elite mais eficientes para a cultura da soja, as quais podem vir a substituir outras inicialmente utilizadas na cultura.

### 2.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

O uso de inoculantes à base de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCP) pode trazer vários benefícios às culturas agrícolas, como o aumento da eficiência de uso de fertilizantes, estímulo do crescimento e o desenvolvimento das plantas ao associarem-se às superfícies radiculares, rizosfera, filosfera e nos tecidos internos de diferentes espécies vegetais (HUNGRIA et al. 2010). Além de atuar no aumento da eficiência de uso de nutrientes e água, também aumentam a resistência das plantas em situações de estresses bióticos e abióticos, como agentes de biocontrole e na indução de resistência sistêmica (SINGH et al. 2013; BASHAN et al. 2014; FUKAMI; CEREZINI; HUNGRIA, 2018).

O solo apresenta grande diversidade de RPCP, em vida livre, endofiticamente ou associadas às raízes das plantas, promovendo efeitos benéficos no crescimento de várias espécies vegetais (SILVEIRA e FREITAS, 2007). A atividade biorreguladora dessas bactérias ocorre, em boa parte, em virtude da produção de fitormônios, com destaque para as auxinas, giberelinas e citocininas (MASCIARELLI et al., 2013), acelerando o crescimento de raízes secundárias e pelos radiculares (GLICK, 2014). Além disso, outros mecanismos como a solubilização de fosfatos e o aumento da atividade do óxido nítrico podem contribuir para o desenvolvimento vegetal e aumento da tolerância a condições de estresse (GUIMARÃES et al., 2018). O conjunto de mecanismos de ação desses microrganismos resulta em maior desenvolvimento radicular que promove melhor exploração do solo em busca de água e nutrientes (HUNGRIA et al., 2010).

Dentre as diversas espécies de RPCP destacam-se as o gênero *Azospirillum*, que colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias espécies vegetais, sendo então chamados de diazotrófos endofíticos facultativos (DÖBEREINER e BALDANI, 1982). A inoculação desses microrganismos em diversas espécies vegetais, inclusive gramíneas, favorece o desenvolvimento das plantas por meio de vários mecanismos, como a FBN, produção de fitormônios,

entre outros, resultando na melhoria dos parâmetros fotossintéticos, condutância estomática e elasticidade da parede celular, que atuam positivamente na produtividade das culturas (ZUFFO et al., 2015).

#### 2.4 AZOSPIRILLUM BRASILENSE

No Brasil, as RPCP do gênero *Azospirillum* são as mais estudadas em gramíneas, principalmente trigo (*Triticum aestivum*) e milho (*Zea mays*), com aumentos de 31% e 26% na produtividade de grãos, respectivamente, pelas estirpes AbV5 e AbV6 (HUNGRIA, 2011), e de 15% na biomassa aérea de braquiárias (HUNGRIA et al., 2016), podendo ser considerado um microrganismo generalista quanto ao efeito sobre o hospedeiro. Dentre os mecanismos de promoção de crescimento, o *Azospirillum* promove antagonismo a agentes patogênicos, produção de fitormônios, menor sensibilidade às variações de temperatura e disponibilidade hídrica (ARAÚJO, 2008; CERZINI et al., 2016). Diversos estudos têm documentado o sucesso da inoculação de *Azospirillum* em arroz (*Oryza sativa*) (GUIMARÃES et al. 2018), trigo (GUIMARÃES et al. 2018; HUNGRIA, 2011), milho (GUIMARÃES et al. 2018; CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013; FERREIRA et al., 2013; HUNGRIA, 2011) e braquiárias (HUNGRIA et al., 2016; DUARTE et al., 2020).

O *Azospirillum* tem grande aplicabilidade devido à capacidade de estimular a produção de hormônios vegetais em quantidades expressivas, o que resulta na promoção do crescimento de plantas. As pesquisas têm evidenciado a capacidade da bactéria *Azospirillum brasilense* em produzir auxinas, giberelinas e citocininas em condições “*in vitro*” (ZUFFO et al., 2015; MASCIARELLI et al., 2013; FUKAMI et al., 2017). A colonização por essas bactérias estimula o sistema radicular, resultando em uma absorção mais eficiente de água e nutrientes (BALDANI; BALDANI; DOBEREINER, 1987; FERREIRA et al., 2013). Dentre as respostas fisiológicas induzidas por *Azospirillum* destacam-se o aumento do teor de clorofila, que melhora diretamente os parâmetros fotossintéticos, condutância estomática, melhoria no potencial hídrico, maior teor de prolina na parte aérea e raízes, incremento no teor de água do apoplasto, maior elasticidade da parede celular e aumento da altura e da fitomassa das plantas (BARASSI et al., 2008).

## 2.5 COINOCULAÇÃO DE *BRADYRHIZOBIUM* SPP. E *AZOSPIRILLUM* SPP.

As pesquisas acerca da FBN no Brasil não são desenvolvidas apenas com o objetivo de avaliar as estirpes selecionadas, mas também buscam determinar a distribuição e sobrevivência das bactérias no solo, novas técnicas de inoculação e, nos últimos anos, a associação de diferentes gêneros de microrganismos (BÁRBARO et al., 2009). Neste cenário, estudos sobre a associação de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp. com *Azospirillum brasilense* têm ganhado espaço na literatura e nos sistemas de produção de soja, em uma prática conhecida como coinoculação. O *Azospirillum* pertence ao grupo das RPCP devido à sua capacidade de colonizar as raízes das plantas, estimulando o crescimento radicular (KLOEPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOWICZ, 1989).

Plantas inoculadas com *A. brasilense* apresentam mais raízes laterais, favorecendo a absorção de água e nutrientes, resultado da ação do ácido indol-acético (AIA), giberelinas e citocininas (TIEN; GASKIN; HUBBEL, 1979). Entretanto, por ser uma bactéria associativa, *A. brasilense* disponibiliza apenas parte do N fixado e não produz quantidade suficientes para atender à demanda das plantas, ao contrário das bactérias simbióticas que podem suprir todo o N demandado pelas plantas em simbiose (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

Para a cultura da soja, *A. brasilense* vem sendo estudado com o intuito de promover aumento do sistema radicular, possibilitando aumento da área de infecção dos rizóbios, que leva a uma nodulação mais abundante e precoce (CHIBEBA et al., 2015). As pesquisas direcionam para a prática da coinoculação, em que as já tradicionalmente usadas bactérias do gênero *Bradyrhizobium* são empregadas em associação com o *Azospirillum* (BULEGON, 2014). O uso conjunto de inoculantes à base de *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* spp. em leguminosas tem mostrado resultados favoráveis em termos de promoção de crescimento e produtividade (BENINTENDE et al., 2010; HUNGRIA, MENDES e MERCANTE, 2013; HUNGRIA et al., 2013; ZUFFO et al. 2015).

Em termos conceituais, coinoculação ou inoculação mista é uma das técnicas usadas na otimização do cultivo da soja, que tem por objetivo conciliar dois microrganismos promotores de crescimento de plantas. Essa sinergia se torna interessante, pois supera os efeitos benéficos isolados que cada microrganismo produziria. A concentração do inóculo e a maneira de inocular são determinantes

para o bom funcionamento da coinoculação, a qual, quando realizada de maneira inadequada, pode resultar em prejuízos, pela inibição da formação de nódulos e redução da massa radicular (BÁRBARO et al., 2009; HUNGRIA et al., 2013).

Os efeitos benéficos da coinoculação estão associados à produção de fitormônios, com destaque especial às citocininas, auxinas e giberelinas (TIEN, et al., 1979), que levam a alterações na morfologia do sistema radicular, como número de raízes laterais e aumento no comprimento (DOBELLAERE; OKON, 2007). Essas alterações morfológicas possibilitam a exploração de um volume maior do solo por parte das plantas, tornando-as menos suscetíveis a déficits hídricos e mais eficientes na absorção de nutrientes (COHEN et al., 2015). Experimentos em Londrina e Ponta Grossa, no estado do Paraná, utilizaram *Bradyrhizobium japonicum* via sementes e *A. brasilense* no sulco de semeadura, sendo que a inoculação com *B. japonicum* resultou em incremento médio de 222 kg/ha (8,4%) enquanto que com a coinoculação o aumento foi de 427 kg/ha (16,1%) (HUNGRIA et al., 2013). Ao realizar a coinoculação com *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *A. brasilense*, o produtor investe aproximadamente R\$ 12,00 / ha, porém eleva sua produtividade em 8% em relação à inoculação anual apenas com *Bradyrhizobium*, totalizando um aumento de 380 kg/ha de soja (HUNGRIA et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2018).

Além do aumento radicular estimulado pelo *Azospirillum*, Chibeba et al. (2015), afirmam que a coinoculação é benéfica ao longo de todo o ciclo de crescimento da soja, pois favorece a nodulação precoce, etapa crítica para o estabelecimento da relação simbiótica entre plantas de soja e bactérias fixadoras de nitrogênio.

Produtos à base de *A. brasilense*, juntamente com as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, foram utilizados inicialmente para coinoculação, tanto na Argentina quanto na África do Sul (REIS, 2007) e, posteriormente, no Brasil (BÁRBARO et al., 2009; HUNGRIA et al. 2013), visando atender as demandas de uma agricultura sustentável e como estratégia para reduzir o uso de fertilizantes e aumentar a entrada de N por meio da otimização da FBN (DALOLIO et al., 2018).

## 2.6 INOCULANTES

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), inoculante é todo produto que contém microrganismos favoráveis ao crescimento de plantas combinados a veículos variados que permitem sua sobrevivência até o momento de uso, podendo ser líquido, turfoso, gel ou liofilizado (MAPA, 2010; BRUXEL, 2012). As formulações utilizadas devem fornecer as condições necessárias para a manutenção da viabilidade das estirpes até sua aplicação, que pode ser via solo, sementes ou sobre as plantas (DAEKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004).

O principal desafio na formulação de inoculantes é preservar a natureza “viva” do ingrediente ativo. O inoculante deve ser capaz de manter as células vivas desde o processo de produção até o final do período de armazenamento, conservando suas propriedades funcionais até o momento de uso. Essa característica do agente biológico difere das formulações químicas de produtos agrícolas que mantêm sua eficácia mesmo após longos períodos de armazenamento (XAVIER, 2004). Mesmo após um isolado microbiano parecer promissor em condições de laboratório, formulá-lo em um produto comercial com o objetivo de produzir resultados semelhantes sob uma ampla gama de condições de campo é tão desafiador quanto a prospecção da cepa promissora (STEPHENS e RASK, 2000). Muitas vezes, inoculantes contendo o mesmo microrganismo devem ser produzidos em diferentes formulações para se adaptar a diferentes climas, tipos de solo e às preferências dos usuários (XAVIER, 2004).

Para potencializar o êxito da inoculação, a formulação de um inoculante deve associar vários aspectos, dentre eles: proporcionar um ambiente de preservação para os microrganismos (teor e qualidade da água, composição, pH), permitindo uma taxa ótima de crescimento e impedindo a redução de sua população durante o transporte, armazenamento e após introdução no solo, facilidade de uso, sustentável e de baixo custo de produção (BASHAN, 1998; HUNGRIA et al., 2005).

No Brasil, a legislação estabelece que inoculantes à base de microrganismos que devem estar na lista das estirpes autorizadas pelo MAPA, como as estirpes de *Bradyrhizobium* para a cultura da soja, precisam garantir a concentração e pureza na data de vencimento e estar devidamente registrados. Para microrganismos que constam na lista de microrganismos recomendados, como é o caso do *Azospirillum*, além da concentração e pureza, é preciso comprovar a eficiência agrônômica para a obtenção do registro (BRASIL, 2011).

O uso de inoculantes contendo estirpes de *Bradyrhizobium* tem contribuído para o avanço do Brasil no cultivo da soja e, paralelamente, tem-se uma diminuição dos impactos ambientais decorrentes da não necessidade de uso de fertilizantes nitrogenados (DAMASCENO, 2011). Segundo a Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), em 2016 foram comercializadas mais de 45 milhões de doses de inoculantes de soja. Neste mesmo cenário, Hungria, Mendes e Mercante (2013) apontam que o país economiza cerca de 15 bilhões de dólares em fertilizantes nitrogenados com o uso de inoculantes.

Os inoculantes, apesar da alta qualidade e eficiência, são comercializados a baixo custo para o agricultor. Estimando-se a dose de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* a um custo de R\$ 3,00/ha, o lucro estimado estaria por volta de 8% no aumento da produtividade (HUNGRIA et al., 2006) ou R\$ 126,60/ha. Em se tratando da coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, a um custo aproximado de R\$ 12,00/ha, os rendimentos atingiram 16% (HUNGRIA et al., 2013) ou R\$ 390,00/ha na safra 2017/2018 (NOGUEIRA et al., 2018).

Bashan et al. (2014) destacam que os dois principais aspectos que determinam o sucesso da inoculação são a eficácia do isolado bacteriano e a tecnologia de inoculação. Hungria et al. (2006) complementam que o manejo inadequado do inoculante, seja durante o transporte, na forma de armazenamento, do tempo de inoculação antes da semeadura, e mesmo na forma de inocular, podem diminuir o número de células viáveis, o que compromete sua eficiência potencial. A qualidade dos inoculantes pode ser verificada por diversos fatores, que incluem a confirmação das estirpes contidas no inóculo, número mínimo de células viáveis, ausência de contaminação, facilidade de aplicação, tempo de prateleira, e adequações quanto à embalagem, rotulagem e instruções de uso (XAVIER et al., 2004).

## 2.7 PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE INOCULANTES

A produção de inoculantes no Brasil teve início em 1950 na Seção de Microbiologia Agrícola (SEMIA), da Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul. Os primeiros trabalhos de seleção e produção de inoculantes empregaram estirpes do Instituto Biológico de São Paulo e isolamentos locais, com culturas em meio líquido e em meio sólido. O veículo turfoso foi adotado, pela primeira vez, em

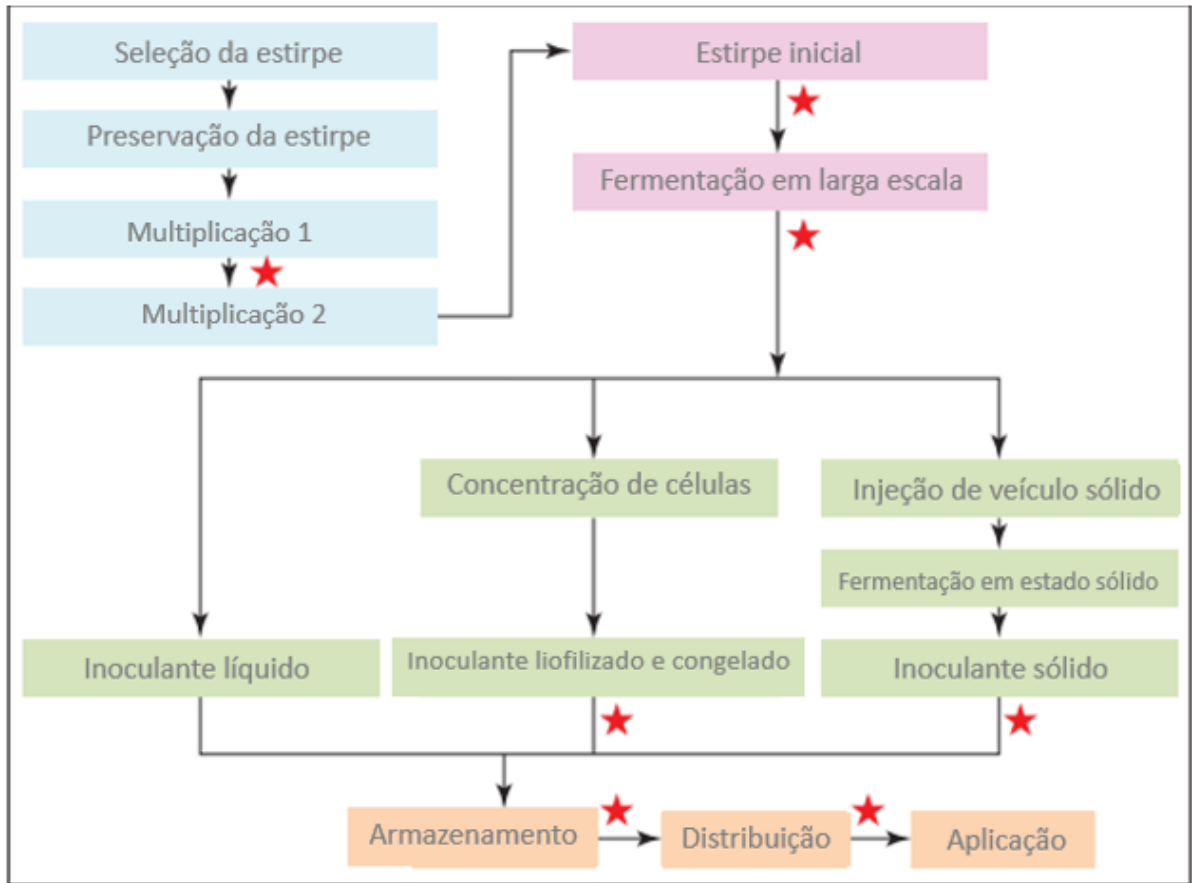
1954 e a produção alcançou 10 mil doses para soja, suficiente para cerca de 8 mil hectares. Em 1955, foram trazidas estirpes da "Coleção de Culturas" do Prof. O. N. Allen, da Universidade de Wisconsin e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FREIRE; VERNETTI, 1999). Em 1956, a primeira indústria privada de inoculantes foi fundada em Pelotas, Rio Grande do Sul, e contou com a orientação técnica do Prof. Dr. João Ruy Jardim Freire (FREIRE; VERNETTI, 1999; ARAÚJO, 2012). Em 1975, o governo brasileiro definiu que os inoculantes produzidos e comercializados deveriam conter estirpes recomendadas por órgãos oficiais de pesquisa (GIONGO, 2007).

Existe um grande mercado para a produção e uso de inoculantes para leguminosas, mas que vem crescendo também para as demais BPCP, com destaque para os gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. A produção de inoculantes no Brasil é regulamentada pelo MAPA por meio da Instrução Normativa (IN) nº 13 de 2011 (BRASIL, 2011) que determina que os inoculantes produzidos no Brasil devem seguir certas especificações, dentre elas, elaboração em suporte esterilizado, concentração mínima de células de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mL ou g de produto para rizóbios e  $1 \times 10^8$  para *Azospirillum* e ausência de contaminantes na diluição de  $1 \times 10^{-5}$ . A IN nº 30, de 2010 (BRASIL, 2010) regulamenta o controle de qualidade do produto comercial, com base em metodologias específicas a serem realizadas pelos laboratórios certificados pelo MAPA. Essas instruções normativas são resultado do consenso da interação que ocorre entre a pesquisa, a indústria de inoculantes e o MAPA por meio da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE) (SILVA, 2006). Além da concentração e pureza, os inoculantes devem conter somente estirpes autorizadas ou recomendadas pelo MAPA informadas na IN 13 (BRASIL, 2011). Essas medidas contribuem para que o Brasil possua umas das legislações mais bem elaboradas no que diz respeito às normas de produção e comercialização de inoculantes, resultando em produtos de excelente qualidade (NOGUEIRA e HUNGRIA, 2014).

A produção industrial de inoculantes é complexa. Demanda habilidades no manuseio asséptico das estirpes bacterianas, entendimento das condições em que o microrganismo cresce e sobrevive, pesquisa e desenvolvimento para encontrar os veículos adequados para a formulação de inoculantes comerciais

e um programa de controle e garantia da qualidade a fim de que o processo correto de fabricação e a integridade do produto sejam mantidos (DEAKER et al., 2016).

A cadeia de produção industrial dos inoculantes pode ser resumida na figura a seguir: (Figura 1).



Adaptado de DAEKER et al., 2016.

**Figura 1:** Diferentes cores indicam diferentes processos. Seleção e preservação da estirpe (azul); Produção em larga escala de lotes de culturas (lilás); Formulação de inoculantes (verde); Armazenamento, distribuição e aplicação (laranja). Estrelas vermelhas indicam pontos de controle de qualidade para determinar a pureza da estirpe, crescimento, sobrevivência e estabilidade funcional.

Após o processo de seleção do microrganismo de interesse, a produção inicia-se com as multiplicações subsequentes da estirpe selecionada até a estirpe inicial, a partir daí inicia-se a fermentação para o processo de produção. As principais exigências desta etapa são a esterilidade da cultura e o fornecimento de oxigênio para as células rizobiais. O meio de cultura escolhido deve ser autoclavado a 121° C por 20 minutos, para esterilização. Após o resfriamento, em câmara de fluxo laminar, são inoculadas as estirpes multiplicadas, que são então mantidas sob agitação ou com fornecimento de oxigênio filtrado até que atinja densidade óptica de 0,1. Para grandes culturas são usados fermentadores, que devem ser passíveis de

esterilização, permitir acesso para inoculação e amostragem e fornecer aeração à cultura. Após atingir a densidade celular necessária, o inoculante é então elaborado com diversos veículos: turfoso, pastas líquidas, granulares, congeladas ou preparações liofilizadas, que mantenham as bactérias vivas até o momento do uso (DAEKER et al., 2016). As características desejáveis dos materiais transportadores são: i) capacidade de ser finamente moída para permitir uma mistura completa com outros componentes e facilitar a aplicação; ii) pH ajustável para 6,5-7,0; iii) capacidade de retenção de umidade; iv) Facilidade de esterilização; v) Ausência de materiais tóxicos e baixa salinidade (THOMPSON, 1980).

A tecnologia de produção de bioformulações demanda cuidados específicos e uso de equipamentos sofisticados que garantam produtos de qualidade no mercado (ARORA, KHARE e MAHESHWARI, 2011). A importância da produção de inoculantes de qualidade engloba não somente aspectos relativos à lavoura quanto à eficiência agrônômica, mas também aspectos sanitários relativos às plantas e animais (KABI, 1997).

## 2.8 PRODUÇÃO *ON FARM* DE INOCULANTES

A multiplicação de microrganismos em biofábricas na propriedade rural, prática conhecida como produção "*on farm*", tem sido adotada por alguns produtores, principalmente pela possibilidade de redução de custos. Apesar de empregarem produtos comerciais como fonte de inóculo para iniciar o cultivo, a prática não é ilegal do ponto de vista da legislação, pois tem amparo na Lei dos Orgânicos, que permite a produção de insumos agrícolas para uso próprio na fazenda. Entretanto, apesar de constar no Art. 10, parágrafo 8, do Decreto 6.913/2009 que: "Ficam isentos de registro os produtos fitossanitários com uso aprovado para a agricultura orgânica produzidos exclusivamente para uso próprio", os inoculantes não se caracterizam como produtos fitossanitários, ficando então uma lacuna na legislação brasileira acerca da fabricação *on farm* destes produtos.

Amostras provenientes de produções *on farm* de *Bacillus* spp. têm revelado alto índice de contaminação por outros microrganismos, o que indica que as instalações empregadas para essa finalidade não possuem condições necessárias de assepsia que garantam um ambiente livre de contaminantes, o que requer a esterilização do meio de cultura e padronização do sistema de produção e

do produto final (VALICENTE et al., 2018). Na maioria das vezes, os produtos *on farm* são produzidos e armazenados em caixas d'água ou em tanques que não apresentam as características adequadas para serem considerados um fermentador, uma vez que não permitem adequada esterilização e permitem o contato com ar não filtrado, o que resulta na contaminação durante o processo de multiplicação. Como consequência, como os contaminantes geralmente apresentam menor tempo de geração que os microrganismos de interesse, esses acabam predominando no produto final (VALICENTE et al., 2018). Entre as limitações que podem ocorrer durante as etapas de produção, a falta de uma esterilização eficiente do meio de cultivo e dos equipamentos é um dos principais problemas. Além disso, não há controle de temperatura, aeração e condutividade elétrica, fatores fundamentais que influenciam na curva de crescimento microbiano. Como agravante, raramente há conhecimento sobre a característica de crescimento do microrganismo desejado e para a identificação e contagem de células dos microrganismos de interesse. Alguns produtores se guiam de forma empírica por medidas do pH do meio e pela cor da mistura.

Dentre os microrganismos que estão sendo multiplicados e utilizados nas propriedades brasileiras, as mais comuns são: *Azospirillum brasilense*, empregado como promotor de crescimento; *Bacillus thuringiensis*, para controle de larvas de lepidópteros; *Bradyrhizobium* spp., para fixação biológica de nitrogênio, *Bacillus subtilis*, agente de biocontrole de doenças e promotor de crescimento, além de fungos como *Trichoderma* spp.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a qualidade microbiológica de amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* provenientes de produções *on farm* de diversos Estados do Brasil.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Isolar e identificar os microrganismos presentes nas amostras.
- ✓ Avaliar o potencial de inóculo dos microrganismos de interesse.
- ✓ Verificar a presença de contaminantes com potencial patogênico.
- ✓ Avaliar a presença de contaminantes com resistência a antimicrobianos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos empregados neste trabalho obedeceram à Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010, que estabelece os métodos oficiais para análise de inoculantes, contagem de células viáveis, identificação dos microrganismos de interesse e análise de pureza (MAPA, 2010). Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-SOJA), em Londrina-Paraná. Foram empregados inoculantes comerciais para controle em todas as análises.

### 4.1 OBTENÇÃO DOS INOCULANTES

Para obtenção das amostras de produções *on farm* para as análises, foi estabelecido contato por meio de e-mail com produtores, colaboradores, agrônomos, técnicos e funcionários parceiros, mencionando o presente trabalho e solicitando, aos interessados, o envio das amostras para análises microbiológicas.

### 4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Aos que manifestaram interesse em enviar amostras, foi enviado um kit de amostragem composto por: caixa de isopor, tubos cônicos estéreis tipo Falcon de 50 mL, pipetas descartáveis estéreis de 3 mL, luvas descartáveis, filme de parafina plástica Parafilm M® para vedação do recipiente, Protocolo de Coleta contendo as informações necessárias para a realização da coleta (Apêndice A) e Ficha de Identificação das Amostras (Apêndice B) e gelo artificial reutilizável para manter o produto a temperaturas amenas durante o transporte. Durante o processo de obtenção das amostras dos tanques de produção, todos os cuidados com assepsia, para evitar contaminações foram enfatizados aos colaboradores. Após a amostragem de duas alíquotas por local de produção, as amostras foram encaminhadas por SEDEX ao laboratório para análise.

#### 4.3 DILUIÇÃO SERIADA DECIMAL

Antes de serem manipulados em câmaras de fluxo laminar, os frascos contendo as amostras foram homogeneizados e desinfestados externamente com etanol a 70%. Os cultivos empregados nesse trabalho para isolamento dos microrganismos foram baseados em diluições seriadas decimais, que consistem em suspender alíquotas de 1 mL das amostras, com o auxílio de uma micropipeta com ponteira estéril, em 9 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%), produzindo a diluição  $10^{-1}$ , seguindo-se de diluições decimais sucessivas até a diluição  $10^{-7}$ , para verificar crescimento microbiano com base no Método do Espalhamento sobre meios de cultura em placas de Petri.

#### 4.4 MÉTODO DO ESPALHAMENTO EM PLACAS DE PETRI PARA ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Sob condições de assepsia em câmara de fluxo laminar, alíquotas de 100  $\mu$ L das diluições em série foram inoculadas na superfície de meios de cultura apropriados para cada microrganismo de interesse com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As diluições utilizadas para plaqueamento foram as de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ . Para *Bradyrhizobium* foi utilizado o meio de cultura YMA (*Yeast Mannitol Agar*) e para *Azospirillum* foi utilizado meio RC (*Rojo Congo*). Além disso, foram utilizados também os meios de cultura LB (*Lúria Bertani*) e AN (*Ágar Nutriente*) no intuito de aumentar as possibilidades de isolamento de microrganismos variados, além do meio Sabouraud para isolamento de fungos. Detalhes da constituição dos meios de cultura estão apresentados no Anexo A.

Após a inoculação dos meios, a incubação foi feita a 28-30°C no escuro e a observação, para acompanhar o desenvolvimento das colônias, foi realizada diariamente a partir do 2º dia até o 7º dia – tempo necessário para que as colônias de *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* estejam visíveis para contagem. As colônias bacterianas morfologicamente distintas, obtidas em cada meio de cultura, foram estriadas em novas placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura de origem para a obtenção de colônias isoladas. Deste modo, todas as colônias morfologicamente distintas foram isoladas e purificadas, para posteriormente serem submetidas à identificação molecular. O meio AN foi escolhido para o crescimento final dos isolados após purificação, de modo que todos os isolados das amostras

fossem cultivados no mesmo meio para facilitar as comparações morfológicas e evitar a obtenção de isolados morfológicamente iguais. Todos os isolados deste trabalho cresceram em meio AN. Após o término das análises do trabalho, os isolados foram criopreservados em meio AN com 30% de glicerol na temperatura de -80°C para manutenção dos cultivos.

#### 4.5 ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ORGANOLÉPTICAS DAS AMOSTRAS

Após a retirada das alíquotas utilizadas para as análises, foram determinados o pH e a condutividade elétrica das amostras. Para a determinação do pH foi utilizado um medidor de pH modelo FiveEasy Plus pH meter FP20 (METTLER TOLEDO, Ohio, Estados Unidos) e para a condutividade elétrica foi utilizado um condutivímetro digital Tec-4MP (TECNAL, Piracicaba, Brasil). Foi também feita uma avaliação sensorial quanto ao odor das amostras.

#### 4.6 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Cada isolado morfológicamente distinto, após purificação nos seus respectivos meios de cultura, foi submetido à extração do DNA genômico. Células bacterianas de cada isolado foram crescidas em meio de cultivo AN líquido. A extração do DNA total foi realizada por meio do kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen®) conforme instruções do fabricante. Após a extração, a integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

#### 4.7 AMPLIFICAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL MEIO DE PCR

O DNA genômico de cada isolado foi utilizado como molde para amplificação do gene ribossomal *16S RNAr*. Foram empregados os iniciadores universais fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991), que foram adicionados (10 pmol/reação) a um mix de reação contendo tampão 10X (Tris- base a 200 mM, pH 8,4, KCl a 500 mM), dNTPs (0,3 mM de cada base), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), enzima Taq DNA polimerase (1U), DNA molde (de 10 a 20 ng/μL) e água ultrapura esterilizada, para completar o volume final a 50 μL.

Os ciclos de amplificação para o gene ribossomal 16S consistiram de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 segundos, 93°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos (WEISBURG et al., 1991).

Os produtos oriundos da PCR foram purificados por meio do kit PureLink (Invitrogen®), de acordo com as instruções do fabricante, e a integridade e concentração do material verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

#### 4.8 SEQUENCIAMENTO DOS GENES RIBOSSOMIAIS

Nesta etapa, os produtos de PCR purificados foram amplificados novamente em um mix que consiste na adição de 200 ng/μl de DNA molde, 1,3 μL de BigDye (compatível com o sequenciador ABI3500XL, *Applied Biosystems*), 3,2 pmol/ μL de cada *primer* (DELAMUTA et al., 2013), 2,5 μL de tampão 10x (500 mM KCl; 200 mM Tris-HCl, pH 8,4) e 12,2 μL de H<sub>2</sub>O milli-Q estéril, totalizando um volume de 20 μL por reação, distribuídos em placas de 96 poços. A reação compreendeu um ciclo inicial de 96 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por 4 min, em um termociclador (MJ Research Inc. PTC 200).

Após amplificação, as amostras foram purificadas de acordo com procedimento descrito por Menna et al. (2006) em que são adicionados 2 μL de acetato de amônio estéril (7,5 M) e 65 μL de etanol a 99,5% em temperatura ambiente, em cada poço da placa. Posteriormente, a placa foi selada e homogeneizada, sendo submetida a uma centrifugação de 4000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e, em seguida, foram adicionados 150 μL de etanol 70% nos poços, com centrifugação a 4000 rpm por 20 min. Após o descarte do sobrenadante, uma nova centrifugação foi realizada a 300 rpm durante 25 s. Por fim, a placa foi colocada em uma estufa a 37 °C por cerca de 30 min para secagem do material.

Após secagem completa, os precipitados foram ressuspensos em 10 μL de formamida, aquecidos a 95°C durante 5 min e resfriados por 2 min em gelo. Posteriormente as amostras foram submetidas ao sequenciador ABI 3500XL (*Applied Biosystems*), para obtenção de dados numéricos das sequências de pares

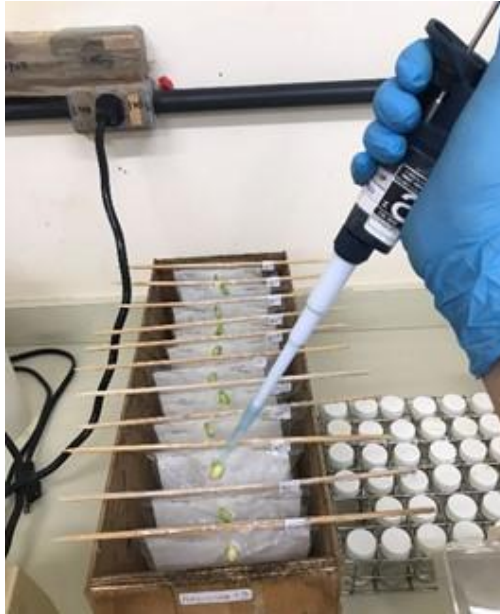
de base. Tais dados foram analisados com o programa Bionumerics versão 7.6 e corrigidos manualmente com base em sequências depositadas no banco de dados de genes ribossomais do GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta BLAST.

#### 4.9 CONCENTRAÇÃO DE RIZÓBIOS NODULANTES DE SOJA NAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL EM PLANTAS DE SOJA

Para as amostras em que o microrganismo de interesse era *Bradyrhizobium*, o teste do Número Mais Provável (NMP) empregou a soja como planta armadilha em um sistema hidropônico em sacos de polipropileno contendo 300 mL de solução nutritiva (BROUGHTON; DILWORTH, 1971). Sementes da cultivar BRS 543 RR foram pré-germinadas em papel Germitest por três dias e, após esse período, as plântulas na fase cotiledonar (Vc) foram transferidas através de um pequeno orifício na superfície do saco, de modo que a radícula da plântula fosse cuidadosamente depositada sobre uma tira de papel de filtro, no interior do sistema hidropônico para embeber a plântula e supri-la com a solução nutritiva, enquanto os cotilédones permaneceram na parte externa.

A inoculação com 1 mL das suspensões das amostras nas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em solução salina (NaCl 0,85%) foi realizada em triplicata para cada diluição sobre as raízes, através do orifício do recipiente (Figura 2). Após a inoculação, os suportes contendo as plântulas inoculadas foram mantidos em casa de vegetação (Figura 3), onde as plantas permaneceram até a avaliação visual da presença ou ausência de nódulos entre 25 e 30 dias após a inoculação. As diluições em que a planta apresentou um ou mais nódulos foram contabilizadas como positivas. A partir dos resultados positivos e negativos em cada diluição foi obtido o número característico e, por meio deste, o número mais provável (NMP) de células viáveis de rizóbios nodulantes de soja nas amostras com base em uma tabela de probabilidades (ANDRADE; HAMAKAWA 1994).

**Figura 2:** Inoculação das radículas de soja com 1 mL das diluições das amostras, em triplicata.



**Fonte:** a autora (2019).

**Figura 3:** Inoculação das radículas de soja com 1 mL das diluições das amostras, em triplicata.



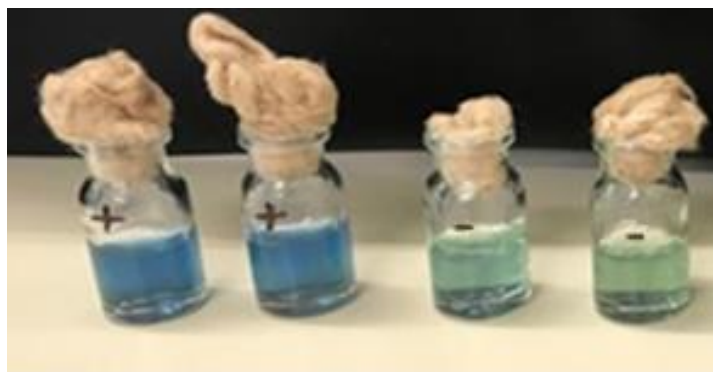
**Fonte:** a autora (2019).

#### 4.10 CONCENTRAÇÃO DAS BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL *IN VITRO* EM MEIO SEMISSÓLIDO.

O NMP em meio semissólido (VIDEIRA; ARAUJO; BALDANI, 2007) foi realizado utilizando frascos de penicilina contendo 5 mL do meio de cultura NFb (*Nitrogen Free Bromothymol blue*) semissólido. Em cada frasco foi adicionada uma alíquota de 100  $\mu$ L das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  das amostras provenientes da multiplicação de *Azospirillum*, em triplicata. Após a inoculação das diluições correspondentes, os frascos foram incubados a 28 °C no escuro e avaliados após 7 dias. A presença da película característica na porção superior do meio semissólido e a sua alcalinização, que altera a cor do meio de verde para azul, confere caráter positivo ao teste, enquanto a ausência de película confere caráter negativo. Controles positivo e negativo foram incluídos pela inoculação com inoculante comercial ou a solução salina usada para as diluições, respectivamente (Figura 4).

Além do *Azospirillum brasilense*, outros microrganismos podem alcalinizar o meio, portanto apenas a alteração de cor, não confere caráter positivo ao teste, sendo necessária a formação de película. As diluições que apresentaram caráter positivo foram re-isoladas em placa de Petri contendo o meio RC, para confirmação da presença ou ausência de *Azospirillum brasilense* por meio das análises moleculares descritas anteriormente.

**Figura 4:** Frascos com meio NFb semissólido inoculados com as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  das amostras de inoculante de *Azospirillum* produzidas *on farm*. Frascos com coloração azul: controle positivo com alteração do pH e formação de película. Frasco com coloração verde: controle negativo.



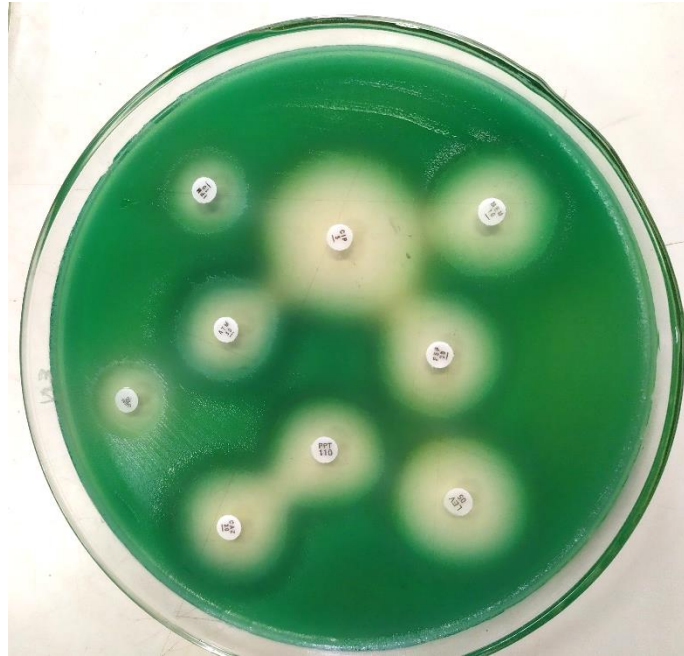
**Fonte:** a autora (2019).

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS PELA TÉCNICA DE DISCO-DIFUSÃO.

Após o sequenciamento, todos os isolados pertencentes a gêneros potencialmente patogênicos foram levados ao Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da Universidade Estadual de Londrina e submetidos à avaliação da sensibilidade a antimicrobianos pela Técnica de Disco-Difusão (KIRBY & BAUER, 1966) (BUAER et al., 1966). Uma suspensão de bactérias de cultivo recente, entre 24 e 48 horas, em solução salina estéril (NaCl 0,85%) foi preparada até a obtenção de uma turbidez compatível com o grau 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). Em seguida, com o auxílio de um *swab*, foi feita a inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de ágar *Müller Hinton*. Após a secagem da superfície do ágar, foi feita a adição de discos de papel impregnados com antimicrobianos, conforme indicado nas atualizações anuais do CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute) para cada grupo de antimicrobianos e cada grupo de microrganismos. Os antimicrobianos utilizados e suas concentrações foram: Amicacina 30 µg; Amoxicilina + Clavulanato 20/10 µg; Ampicilina 10 µg; Ampicilina + Sulbactam 10/10 µg; Aztreonam 30 µg; Cefazolina 30 µg; Cefepime 30 µg; Cefotaxima 30 µg; Cefoxitina 30 µg; Ceftazidima 30 µg; Ceftriaxona 30 µg; Ciprofloxacina 5 µg; Clindamicina 2 µg; Cloranfeniol 30 µg; Eritromicina 15 µg; Ertapenem 10 µg; Gentamicina 10 µg; Imipenem 10 µg; Linezolida 30 µg; Levofloxacina 5 µg; Meropenem 10 µg; Penicilina 10 µg; Piperacilina + Tazobactam 100/10 µg; Estreptomicina 10 µg; Sulbactam 10 µg; Sulfametoxazol + Trimetoprim 1.25/23.75 µg; Tetraciclina 30 µg e Vancomicina 30 µg.

As placas foram incubadas em estufa a 36 °C por 18-24 h. Após este período foram interpretados os padrões dos halos de inibição ao redor de cada disco, conforme indicado pelo CLSI (Figura 5).

**Figura 5:** Formação de halos de inibição de crescimento em torno de discos impregnados com antibióticos adicionados à placa contendo o microrganismo em estudo.



**Fonte:** a autora (2020).

#### 4.12 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE LEVEDURAS SOB MICROSCÓPIO ÓPTICO

Todos os isolados, anteriormente à criopreservação, foram submetidos à observação ao microscópio óptico *AxioLab A1* (ZEISS) acoplado a um sistema de vídeo-câmera digital *AxioCam ERc 5s* (ZEISS). Um esfregaço de cada isolado foi feito em lâmina, coberto com 50  $\mu$ L de água destilada autoclavada e por uma lamínula. Todos os isolados foram observados no aumento de 400x, possibilitando o reconhecimento de características típicas de eucariotos como núcleo, vacúolo e dimensões celulares.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total foram analisadas 18 amostras provenientes de diversas regiões do Brasil (Tabela 1). Em todas as amostras foi detectada a presença de microrganismos contaminantes. O microrganismo de interesse de cada amostra está informado na tabela, bem como suas propriedades físico-químicas e organolépticas, tipo de multiplicação (caixas abertas ou fermentadores) e tempo de crescimento.

A medida do pH é utilizada para indicar as condições de acidez ou basicidade dos meios e que tem grande influência no crescimento microbiano (SKOOG et al., 2014). Com exceção dos microrganismos extremófilos, a maioria cresce melhor em valores de pH do meio entre 5,5 e 8,0 (MADINGAN et al., 2016). O pH dos meios de cultivo utilizados neste trabalho está dentro da faixa da neutralidade, 6,8 - 7,0 para YMA para cultivo de *Bradyrhizobium* e 7,0 para RC para cultivo de *Azospirillum*. Nesse estudo, 94,4% das amostras exibiram pH abaixo do ideal, variando entre 3,6 e 5,9. Essa condição é bastante negativa ao desenvolvimento dos microrganismos, pois condições de acidez no solo atuam negativamente nas atividades da microbiota do solo, principalmente sobre os microrganismos benéficos, como os rizóbios, limitando sua multiplicação e sobrevivência, conseqüentemente reduzindo a nodulação e fixação de nitrogênio (GRAHAM et al., 1982; GRAHAM, 1991). O mesmo ocorre com o *Azospirillum*, cujo pH ideal para seu crescimento varia entre 6,0 e 7,8 (DÖBEREINER; PEDROSA, 1987).

A condutividade elétrica (CE) é medida pela capacidade de uma solução aquosa transmitir corrente elétrica. Quanto maior a concentração de íons dissociados em uma solução, maior a capacidade em conduzir corrente elétrica (FUNASA, 2014). Essa propriedade está diretamente relacionada à osmolaridade da solução, a qual influencia nas trocas de solutos e de água com o meio. Os inoculantes comerciais utilizados como padrão, apresentaram condutividade 1.960  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para o inoculante à base de *Bradyrhizobium* e 9.810  $\mu\text{S}/\text{cm}$  para o inoculante à base de *Azospirillum*. As amostras analisadas apresentaram grandes variações na condutividade. As formulações utilizadas pelos produtores são bastante distintas, o que pode justificar os valores encontrados.

Além do pH e condutividade elétrica, foi realizada uma análise sensorial das amostras. De acordo com Schirmer et al. (2008) as noções quanto às



**Tabela 1:** Município de origem da amostra, microrganismo de interesse, pH, condutividade elétrica, odor, tipo de multiplicação e tempo de crescimento das amostras de inoculantes *on farm* empregadas na caracterização microbiológica.

Amostra	Origem	Microrganismo de interesse	pH	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	Odor	Tipo de multiplicação	Tempo de crescimento
1	Presidente Bernardes - SP	<i>Bradyrhizobium</i>	5,7	4.300	Pútrido	Caixas abertas	2 dias
2	Presidente Bernardes - SP	<i>Azospirillum</i>	4,0	2.900	Azedo	Caixas abertas	1 dia
3	Barreiras - BA	<i>Bradyrhizobium</i>	4,9	2.100	Azedo	Fermentador	10 dias
4	Marilândia do Sul - PR	<i>Azospirillum</i>	4,4	890	Azedo	Caixas abertas	2 dias
5	Mauá da Serra - PR	<i>Azospirillum</i>	5,9	800	Azedo	Caixas abertas	4 horas
6	Mauá da Serra - PR	<i>Azospirillum</i>	3,6	1.030	Azedo	Caixas abertas	7 dias
7	Luís Eduardo Magalhães - BA	<i>Azospirillum</i>	7,2	2.060	Fecal	Caixas abertas	5 dias
8	Panambi - RS	<i>Azospirillum</i>	3,9	1.620	Urina	Caixas abertas	1 dia
9	Palotina - PR	<i>Bradyrhizobium</i>	5,3	6.890	Azedo	Caixas abertas	2 dias
10	Palotina - PR	<i>Azospirillum</i>	5,0	8.390	Lixo	Caixas abertas	2 dias
11	Sorriso - MT	<i>Azospirillum</i>	3,9	5.930	Azedo	Caixas abertas	3 dias
12	Sorriso - MT	<i>Azospirillum</i>	4,4	4.640	Fecal	Caixas abertas	3 dias
13	Panambi - RS	<i>Bradyrhizobium</i>	4,7	1.870	Fermento	Fermentador	2 dias
14	Panambi - RS	<i>Azospirillum</i>	4,8	2.200	Fermento	Fermentador	1 dia
15	Salto Grande - SP	<i>Bradyrhizobium</i>	4,0	3.830	Azedo	Caixas abertas	3 dias
16	Salto Grande - SP	<i>Azospirillum</i>	5,5	7.020	Fecal	Caixas abertas	1 dia
17	Lutécia - SP	<i>Bradyrhizobium</i>	5,5	2.760	Fecal	Não informado	Não informado
18	Lutécia - SP	<i>Azospirillum</i>	5,1	2.910	Azedo	Não informado	Não informado

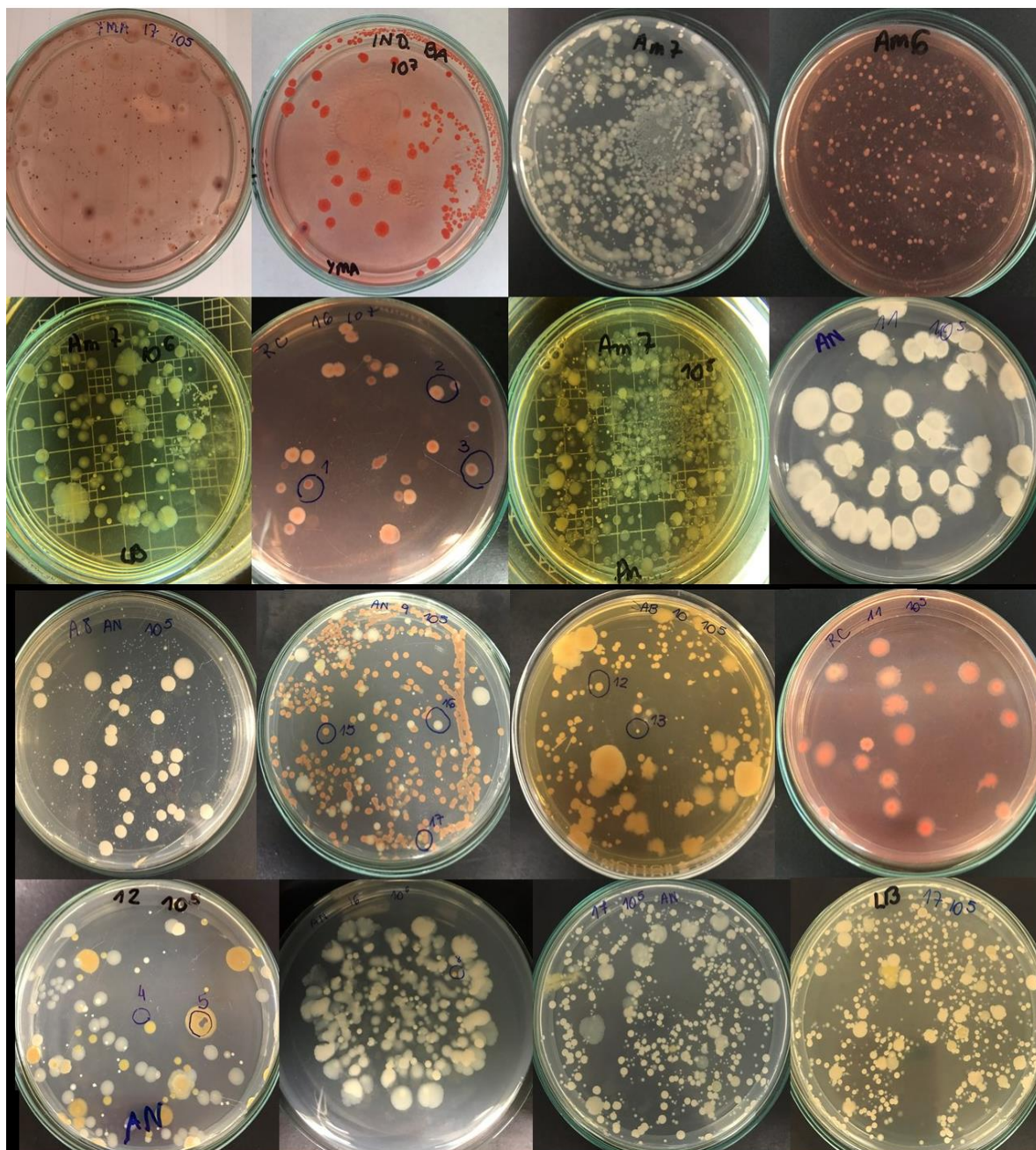
Fonte: a autora (2019)

As placas com meio de cultivo apresentaram contaminações em todas as diluições (Figura 7). A variedade de microrganismos encontrados nas amostras revela a falta de controle microbiológico do ambiente de multiplicação dos microrganismos de interesse. Muitos organismos, que não os de interesse, encontraram condições para se desenvolverem, enquanto outros, como é o caso do *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, não foram capazes de se multiplicar.

O tempo médio de crescimento das estirpes recomendadas de *Bradyrhizobium* para atingir a concentração ideal no produto final é de, aproximadamente, sete dias (JORDAN, 1982; KUYKENDALL et al., 1992; DELAMUTA et al., 2013). De forma semelhante, *Azospirillum brasilense* possui tempo de crescimento entre cinco e sete dias (DÖBEREINER, 1991). Em contrapartida, muitos contaminantes apresentam tempos de geração muito menores, de forma a dominar o meio de cultura em menos de 24 h. De acordo com Hibbing et al. (2010), os diferentes microrganismos entram em competição por recursos do meio à medida que este se torna empobrecido pela crescente população. Portanto, é cabível concluir que as altas taxas de multiplicação dos microrganismos contaminantes, somadas às taxas de crescimento mais lentas dos microrganismos de interesse, resultam no rápido empobrecimento do meio e na inibição do desenvolvimento dos microrganismos que apresentam menor tempo de geração.

Em relação à identificação taxonômica dos isolados com base no DNA ribossomal, foram consideradas as sequências com maior similaridade depositadas no banco de dados GenBank do NCBI, por meio da análise de Blast (Tabela 2). Embora a identificação de um isolado apenas com base na sequência parcial do DNA ribossomal não seja precisa e definitiva, indica uma grande probabilidade que tenha relação com isolados já identificados quando as sequências de bases depositadas nos bancos de dados tenham alta homologia. Dessa forma, adotou-se como critério que os isolados cujas sequências do DNA ribossomal apresentassem similaridade de, no mínimo, 99% com as estirpes tipo de uma espécie já identificadas e depositadas no banco de dados do NCBI, seriam considerados como prováveis pertencentes àquela espécie. Já os isolados que apresentaram similaridade inferior a 99% com as estirpes tipo, ficaram limitados apenas quanto ao gênero.

**Figura 7:** Placas de Petri contendo diferentes meios de cultura inoculados com diferentes diluições das amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* ou *Azospirillum* obtidas de produções *on farm*. Os meios utilizados foram AN, LB, RC, YMA e Sabouraud.



Fonte: a autora (2019).

\*As anotações sobre algumas placas indicam as colônias morfologicamente distintas que foram selecionadas para isolamento e identificação.

**Tabela 2:** Identificação molecular baseada no sequenciamento parcial do gene *16S rRNA* de isolados bacterianos obtidos de amostras de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* produzidos *on farm* e possibilidade de de serem patógenos humanos.

Amostra	Fragmento DNA (pb)*	Espécie	Cobertura*	Identidade*	Patógeno de humanos	Referência
1.1	1139	<i>Citrobacter braakii</i>	99%	99,56%	Sim	Hirai et al., 2016.
1.2	1139	<i>Enterobacter bugandensis</i>	99%	99,68%	Sim	Pati et al., 2018..
1.3	1134	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99%	100%	Sim	McConnell et al., 2013.
1.4	1134	<i>Rummeliibacillus pycnus</i>	100%	100%	Não	Her; Kim, 2013. Vaishampayan et al., 2009.
1.5	1058	<i>Enterococcus faecalis</i>	98%	100%	Sim	Poulsen et al., 2012.
2.1	1134	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	99,82%	Não	Faccin et al., 2013.
2.2	1139	<i>Citrobacter</i> sp.	99%	98,91%	Depende da espécie	Brenner et al., 1999. Hasan; Sultana; Hossain, 2019.
2.3	1139	<i>Escherichia coli</i>	99%	99,82%	Sim	Forson et al., 2018
2.4	1009	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	100%	Sim	Poulsen, et al., 2012
2.5	1110	<i>Lactococcus lactis</i>	99%	99,82%	Não	Guerra, 2018.
2.6	1140	<i>Kurthia gibsonii</i>	95%	100%	Não	Dworkin et al., 2006.
3.1	1097	<i>Acetobacter syzygii</i>	99%	99,72%	Não	Aghazadeh; Pouralibaba; Yari Khosroushahi, 2017.
3.2	1127	<i>Lactobacillus farraginis</i>	98%	100%	Não	Endo; Okada, 2007.
3.3	1136	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99%	100%	Não	Jung et al., 2019.
3.4	1127	<i>Enterococcus</i> sp.	99%	99,73%	Depende da espécie	Camargo et al., 2014.
4.1	1134	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,82%	Não	Guerra, 2018.
4.2	1132	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	99%	100%	Sim	Knight et al., 2018.

Continua...

Tabela 2: continuação...

Amostra	Fragmento DNA (pb)	Espécie	Cobertura	Identidade	Patógeno de humanos	Referência
4.3	-	Levedura**	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
4.4	812	<i>Enterobacter</i> sp.	100%	99,88%	Sim	Abbott; Janda, 1997. Kus; Burrows, 2007.
4.5	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
4.6	1052	<i>Raoultella</i> sp.	99%	99,62%	Raramente	Ramirez-Quintelo; Chavarriaga-Restrepo, 2017
4.7	1134	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	99,91%	Sim	Kasper et al., 2017.
4.8	1081	<i>Acinetobacter</i> sp.	100%	99,91%	Depende da espécie	Chagas, 2015.
5.1	1132	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	100,00%	Não	Guerra, 2018.
5.2	1069	<i>Azospirillum brasilense</i>	99%	100,00%	Não	Santini et al., 2018.
5.3	1138	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	99%	99,47%	Não	Selvakumar et al., 2010
6.1	1120	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	100,00%	Não	Van Diji; Hecker, 2013.
6.2	1132	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,86%	Não	Guerra, 2018.
7.1	1110	<i>Citrobacter</i> sp.	100%	99,18%	Depende da espécie	Brenner et al., 1999. Hasan; Sultana; Hossain, 2019.
7.2	1089	<i>Comamonas aquatica</i>	100%	99,91%	Não	Dai et al., 2016
7.3	1058	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98%	99,62%	Sim	Boszcowski et al., 2019.
7.4	1100	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	99%	99,91%	Apenas uma espécie ( <i>S. maltophilia</i> )	Kasper et al., 2017.
7.5	1084	<i>Atlantibacter hermannii</i>	98%	99,91%	Sim	Hata et al., 2016. Ioannou, 2019.
8.1	1104	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,37%	Não	Guerra, 2018.
8.2	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.

Continua...

**Tabela 2:** continuação...

Amostra	Fragmento DNA (pb)	Espécie	Cobertura	Identidade	Patógeno de humanos	Referência
8.3	1039	<i>Lactobacillus</i> sp.	100%	97,02%	Não	Kitaka et al., 2017.
8.4	1081	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,08%	Sim	Poulsen, et al., 2012.
8.5	1083	<i>Burkholderia contaminans</i>	99%	99,25%	Sim	Power et al., 2016.
9.1	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
9.2	1058	<i>Acetobacter</i> sp.	99%	99,34%	Não	Kommanee et al., 2012.
9.3	1107	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	98,65%	Depende da espécie	Camargo et al., 2014.
9.4	1129	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,67%	Não	Guerra, 2018.
9.5	1138	<i>Bacillus subtilis</i>	99%	99,59%	Não	Van Dijk; Hecker, 2013.
9.6	1074	<i>Kocuria</i> sp.	99%	98,32%	Depende da espécie	Kandi et al., 2016.
9.7	1062	<i>Terribacillus goriensis</i>	99%	99,10%	Não	Krishnamurthi; Chakrabarti, 2008T.
9.8	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
9.9	1119	<i>Lactobacillus</i> sp.	100%	98,21%	Não	Kitaka et al., 2017.
10.1	1133	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	99,76%	Sim	Poulsen, et al., 2012.
10.2	1045	<i>Acetobacter</i> sp.	98%	99,33%	Não	Kommanee et al., 2012.
10.3	1076	<i>Lactobacillus</i> sp.	99%	99,81%	Não	Kitaka et al., 2017.
10.4	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
11.1	706	<i>Bacillus</i> sp.	100%	98,45%	Depende da espécie	Tuazon et al., 1979. Amin;Rakhisi; ahmady, 2015.
11.2	637	<i>Paenibacillus</i> sp.	100%	98,90%	Depende da espécie	Sáez-Nieto et al., 2017.

Continua...

**Tabela 2:** continuação...

Amostra	Fragmento DNA (pb)	Espécie	Cobertura	Identidade	Patógeno de humanos	Referência
11.3	919	<i>Enterococcus hirae</i>	100%	99,59%	Raramente	Bourafa et al., 2015.
11.4	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
11.5	1064	<i>Rummeliibacillus</i> sp.	99%	98,85%	Não	Her; Kim, 2013. Vaishampayan et al., 2009.
12.1	582	<i>Acinetobacter</i> sp.	100%	98,31%	Depende da espécie	Chagas, 2015.
12.2	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
12.3	1018	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	100%	99,21%	Sim	Ieranò et al., 2009.
13.1	1081	<i>Lactococcus lactis</i>	100%	99,72%	Não	Guerra, 2018.
13.2	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
13.3	1072	<i>Gluconobacter japonicus</i>	100%	99,12%	Não	Cañete-Rodríguez et al., 2016.
13.4	975	<i>Acetobacter</i> sp.	100%	98,87%	Não	Kommanee et al., 2012.
14.1	1094	<i>Enterococcus faecalis</i>	99%	99,45%	Sim	Poulsen, et al., 2012.
14.2	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
14.3	1050	<i>Weissella paramesenteroides</i>	100%	99,60%	Não	Libonatti et al., 2019.
15.1	1021	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	100%	98,53%	Não	Jung et al., 2019.
15.2	1046	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100%	99,18%	Sim	Nguyen; Park; Otto, 2017.
16.1	1097	<i>Citrobacter</i> sp.	99%	98,63%	Depende da espécie	Brenner et al., 1999. Hasan; Sultana; Hossain, 2019.
16.2	1062	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98%	99,18%	Sim	Boszcowski et al., 2019.

Continua...

**Tabela 2:** continuação...

Amostra	Fragmento DNA (pb)	Espécie	Cobertura	Identidade	Patógeno de humanos	Referência
16.3	1052	<i>Enterobacter</i> sp.	100%	98,86%	Sim	Abbott; Janda, 1997. Kus; Burrows, 2007.
16.4	1015	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	99,81%	Sim	Morello et al., 2019.
16.5	1073	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100%	98,21%	Sim	McConnell et al., 2013.
17.1	1033	<i>Citrobacter</i> sp.	99%	99,13%	Depende da espécie	Brenner et al., 1999. Hasan; Sultana; Hossain, 2019.
17.2	1128	<i>Enterococcus</i> sp.	100%	97,87%	Depende da espécie	Camargo et al., 2014.
17.3	1047	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100%	99,24%	Sim	McConnell et al., 2013.
17.4	1082	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100%	99,08%	Sim	Boszczowski et al., 2019.
17.5	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
18.1	1119	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100%	98,75%	Sim	McConnell et al., 2013.
18.2	1081	<i>Enterococcus faecalis</i>	100%	99,35%	Sim	Poulsen, et al., 2012.
18.3	484	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	99,17%	Sim	Almeida et al., 2005.
18.4	995	<i>Citrobacter</i> sp.	100%	99,90%	Depende da espécie	Brenner et al., 1999. Hasan; Sultana; Hossain, 2019.
18.5	-	Levedura	-	-	Depende da espécie	Moyad, 2008. Hafed et al., 2019.
18.6	1033	<i>Comamonas</i> sp.	100%	99,52%	Não	Ghanbarinia; Kheirbadi; Mollania, 2015.

**Fonte:** a autora (2019)

\* Fragmento de DNA (pb) sequenciado; Cobertura: porcentagem da sequência de interesse alinhada a uma sequência já depositada no Genbank; Identidade: identidade máxima obtida com as maiores pontuações de alinhamentos.

\*\* Os isolados identificados como “leveduras” por meio de observação em microscópio não foram submetidos à identificação molecular.

\*\*\* A numeração dos isolados foi feita utilizando-se o número da amostra seguido, após o ponto (.) pelo número do isolado obtido. Por exemplo, o isolado 1.5 é o isolado número 5 da amostra 1.

Quanto aos microrganismos de interesse, apenas *Azospirillum* foi recuperado em uma amostra, enquanto que *Bradyrhizobium* não foi encontrado em nenhuma amostra com base no isolamento em diferentes meios de cultura, em meio à grande variedade de microrganismos contaminantes. Muitos destes contaminantes são potenciais ou comprovadamente patogênicos a humanos e podem causar diversas doenças, oferecendo risco à saúde dos indivíduos que manipulam estes produtos, ou mesmo consumidores finais se aplicados em produtos consumidos *in natura*.

A partir da análise das 18 amostras foram obtidos 85 isolados (Tabela 2). Apenas um foi compatível com um dos microrganismos de interesse, o isolado 5.2 foi identificado como *A. brasilense*. Dentre os 84 isolados restantes, foram identificados 25 gêneros de microrganismos sendo 44% deles potenciais agentes patogênicos de humanos, como *Acinetobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp, *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. e *Stenotrophomonas* sp.

Há relatos na literatura que citam alguns representantes dos gêneros encontrados como causadores de injúrias em plantas, como *Citrobacter* sp. (ALLAHVERDI; RAHIMIAN; RAVANLOU, 2016), *Enterobacter* sp. (GARCÍA-GONZALES et al., 2018; SCHROEDER; DU TOIT; SCHWARTZ, 2009) e *Paenibacillus* sp. (ZHANG et al., 2017). Entretanto, nenhum deles relevante para a soja ou outra cultura de interesse agrícola.

Em relação à amostra 5, proveniente de Mauá da Serra – PR, o produto foi coletado após 4 horas o inóculo à base de um produto comercial ter sido adicionado ao tanque de multiplicação, o que pode explicar a presença do *A. brasilense* na amostra, uma vez que o pouco tempo de exposição às condições de cultivo podem ter ainda permitido a sobrevivência do microrganismo. Vale ressaltar que o método do NMP com base em tubos múltiplos em meio NFb, de acordo com a IN 30 (MAPA, 2010), é utilizado para estimar o número de células de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas e não é seletivo para *A. brasilense*. Mesmo havendo alteração de pH e formação de película, não houve confirmação da espécie pelos métodos moleculares, com exceção do isolado 5.2.

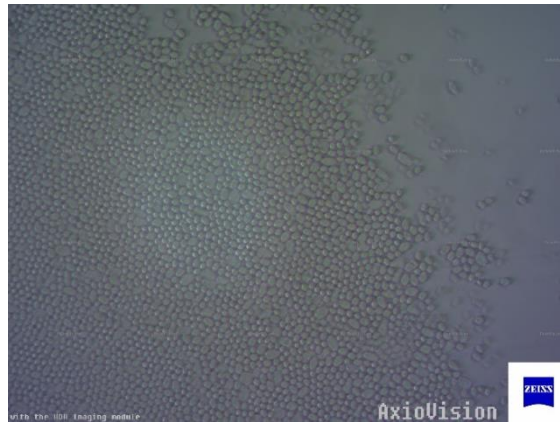
Dois estudos similares a este foram conduzidos com produtos biológicos oriundos de produções *on farm* e corroboram os resultados desse trabalho. Boaventura et al. (2015) realizaram análises de amostras de produção *on*

*farm* de *Bacillus thuringiensis* em Goiás e concluíram que o “produto caseiro” não apresentava quantidades de células do *B. thuringiensis* que fosse capaz de causar mortalidade significativa das lagartas de *Helicoverpa armigera*, além de, provavelmente, conter microrganismos prejudiciais a seres humanos. Valicente et al. (2018) obtiveram amostras de biopesticidas, também de *B. thuringiensis*, produzidos *on farm* no Mato Grosso e constaram a presença de vários isolados morfológicamente distintos, sem qualquer semelhança com a morfologia das colônias do microrganismo de interesse. Concluíram que produtos de origem *on farm* apresentam contaminações por diferentes espécies de bactérias e mostram-se inadequados para uso como biopesticida, apresentando risco de contaminação para humanos e animais.

Madingam et al. (2016) explicam que as células leveduriformes são geralmente maiores que as células bacterianas e podem ser distinguidas das bactérias microscopicamente devido ao maior tamanho e pela presença de estruturas celulares internas como o núcleo e vacúolos. De acordo com Salazar et al. (2016) células bacterianas possuem tamanhos entre 0,5 e 5  $\mu\text{m}$  enquanto as células de leveduras exibem tamanhos entre 5 e 10  $\mu\text{m}$ . Essas diferenças podem ser claramente detectadas no aumento de 400x (Figuras 8 e 9). Todos os isolados que apresentaram as características citadas foram classificados como leveduras. Optou-se por não realizar a identificação molecular destes isolados, sendo suficiente apenas a classificação como levedura.

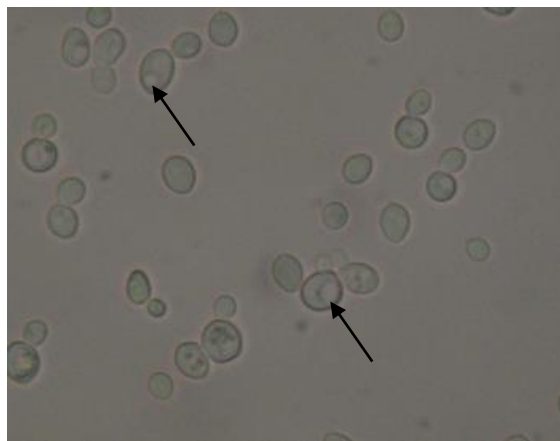
A identificação microscópica revelou a presença de leveduras em 55,5% das amostras. Embora a identificação molecular destes organismos não tenha sido realizada, alguns gêneros de leveduras podem causar injúrias a humanos e animais. De acordo com Sidrim e Rocha (2006), o gênero *Candida* é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies. Em contrapartida, algumas leveduras são utilizadas nas indústrias de fermentação alimentícia e de bebidas, sem danos a humanos e animais, como é o caso do *Saccharomyces cerevisiae*. (KAPOOR; VIRARAGHAVAN, 1995)

**Figura 8:** Células leveduriformes obtidas de meios de cultura inoculados com amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* produzidos *on farm* observadas no aumento de 400x.



**Fonte:** a autora, (2019).

**Figura 9:** Células leveduriformes obtidas de meios de cultura inoculados com amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* produzidos *on farm* observadas no aumento de 400x. As setas indicam o núcleo das células.



**Fonte:** GAENSLY (2016).

Os resultados da avaliação do potencial de inóculo dos microrganismos de interesse por Número Mais Provável (NMP) em plantas armadilha de soja para os inoculantes de *Bradyrhizobium* spp. e em meio NFb semissólido para *Azospirillum brasilense*, revelaram ausência, ou baixa concentração dos microrganismos de interesse (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3:** Estimativa do número de células de *Bradyrhizobium* presentes nas amostras de inoculantes produzidos *on farm*, pelo método do Número Mais Provável (NMP) em plantas armadilha de soja.

Amostra	Número de células por mL
01	Ausente
03	Ausente
09	Ausente
13	$9,3 \times 10^2$
15	Ausente
17	$0,357 \times 10^1$

**Fonte:** a autora (2019)

**Tabela 4:** Estimativa do número de bactérias diazotróficas pelo método do Número Mais Provável (NMP) em meio NFb semissólido (em UFC/mL).

Amostra	Concentração de bactérias Diazotróficas por mL	Presença de <i>Azospirillum brasilense</i>
02	Ausente	Negativo
04	Ausente	Negativo
05	$2,5 \times 10^5$	Positivo
06	Ausente	Negativo
07	$2,5 \times 10^5$	Negativo
08	Ausente	Negativo
10	Ausente	Negativo
11	Ausente	Negativo
12	$2,5 \times 10^5$	Negativo
14	$9,5 \times 10^2$	Negativo
16	$2,5 \times 10^6$	Negativo
18	$2,5 \times 10^5$	Negativo

**Fonte:** a autora (2019)

Dentre as seis amostras de *Bradyrhizobium*, quatro não apresentaram formação de nódulos nas raízes de soja em nenhuma diluição, indicando ausência do microrganismo de interesse. Apenas nas amostras 13 e 17 foi possível detectar a presença de nódulos (Figura 10) nas plantas armadilhas de soja, entretanto, as concentrações estimadas foram muito abaixo da mínima estabelecida na legislação (MAPA, 2011), o que reforça a baixa qualidade do produto produzido

*on farm* e, conseqüente, o não cumprimento do objetivo do inoculante. A nodulação, mesmo sem a detecção do *Bradyrhizobium* nas pacas de Petri pode ser explicada com base nas diluições utilizadas. Nos testes de NMP em plantas as diluições onde houveram formação de nódulos foram as de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , já no espalhamento em placas de Petri, as diluições utilizadas foram as de  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ . De forma similar, apesar da constatação de microrganismos diazotróficos em seis amostras no meio semissólido NFb, a presença de *A. brasilense* foi confirmada pelo sequenciamento em apenas uma amostra. O caráter positivo das amostras 07, 12, 14, 6 e 18 pode ser justificado pela presença de gêneros de microrganismos que também possuem a capacidade de fixar nitrogênio, como *Citrobacter*, *Burkholderia* (HONGRITTIPUN, YOUNPENSUK; RERKASEN, 2014), *Klebsiella* (SCHMITZ; KLOPPROGGE; GRABBE, 2002), *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* (LIBA et al., 2006), *Enterobacter* (LIN et al., 2012) e *Comamonas* (ANDRADE et al., 1997).

**Figura 10:** Nódulos ativos obtidos das raízes de soja inoculadas com a amostra 13, indicando a atividade da leghemoglobina.



**Fonte:** a autora (2020).

Em muitos casos, observou-se o escurecimento do sistema radicular da planta quando inoculada com essas amostras de inoculantes produzidos *on farm* (Figura 11). O escurecimento das raízes pode estar associado ao acúmulo de lignina, isoflavonóides ou taninos nos tecidos, substâncias que estão associadas a respostas contra infecções por fungos ou bactérias, e podem limitar a propagação do patógeno invasor. É uma resposta frequente à infecção ou lesão (TAIZ; ZEIGER, 2006).

**Figura 11:** Escurecimento das raízes de soja inoculadas com as amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* produzidos on farm.



**Fonte:** a autora (2020).

Os testes de avaliação da sensibilidade dos isolados potencialmente patogênicos a antimicrobianos revelaram resistência a alguns dos antimicrobianos testados. Os antimicrobianos utilizados seguiram as recomendações do CLSI para cada microrganismo, assim como os valores de interpretação dos halos de inibição. Os isolados sem potencial patogênico não foram testados. De acordo com os resultados, dos 45% dos isolados que apresentam potencial patogênico, 33,3% possuem resistência a antimicrobianos. (Tabela 6).

**Tabela 6:** Resultado do teste de resistência a antimicrobianos aplicado aos isolados com potencial patogênico obtidos de amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* produzidos on farm.

Amostra	Microrganismo	Resistente	Sensível
1 – Presidente Bernardes/SP	1.1 – <i>Citrobacter</i> sp.	FOX, AMC	AMP, CFZ, GEN, AMI, CPM, CFZ, CTR, CIP, SXT, IMI, AZT, CAZ, CHL, TET
1 – Presidente Bernardes/SP	1.2 – <i>Enterobacter</i> sp.	AMP, FOX, AMC	CFZ, GEN, AMI, CPM, CFZ, CTR, CIP, SXT, IMI, AZT, CAZ, CHL, TET
1 – Presidente Bernardes/SP	1.3 – <i>Acinetobacter baumannii</i>	CTX, SXT	PTZ, CIP, CAZ, IMI, CTX, LEV, CPM, GEN, SAM, MRP, AMI
1 – Presidente Bernardes/SP	1.5 – <i>Enterococcus faecalis</i>	GEN, LNZ, AMP, STR, VAN, PEN	

Continua...

Tabela 6: continuação

Amostra	Microrganismo	Resistente	Sensível
2 – Presidente Bernardes/SP	2.2 – <i>Citrobacter</i> sp.	IMI, AZT, AMP*, CFZ*, AMC**	GEN, AMI, CPM, FOX, CTR, CIP, SXT, CAZ, CHL, TET
2 – Presidente Bernardes/SP	2.3 – <i>Escherichia coli</i>		ERT, MRP, CIP, FOX, IMI, SXT, CTX, AMP, GEN, TET, AMC
2 – Presidente Bernardes/SP	2.4 – <i>Enterococcus faecalis</i>	LNZ, AMP, STR, VAN, PEN	GEN
3 – Barreiras/BA	3.4 – <i>Enterococcus</i> sp.	LNZ, PEN	AMP, GEN, STR, VAN
4 – Mauá da Serra/PR	4.2 – <i>Acinetobacter nosocomialis</i>	CTR**	SAM, CAZ, CIP, LEV, IMI, MRP, GEN, AMI, PTZ, CPM, SXT
4 – Mauá da Serra/PR	4.4 – <i>Enterobacter</i> sp.	AMI, AMC, CHL, SXT, AMP*, CFZ*, FOX*, GEN**, CPM**	AZT, CAZ, CIP, IMI, TET
4 – Mauá da Serra/PR	4.7 – <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		LEV, SXT
7 – Luís Eduardo Magalhães/BA	7.1 – <i>Citrobacter</i> sp.	AMI, AZT, GEN, IMI, AMP*, CFZ*, CTR**	AMC, CPM, FOX, CIP, SXT, CAZ, CHL, TET
7 – Luís Eduardo Magalhães/BA	7.3 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP*	CFZ, GEN, AMI, AMC, CPM, FOX, CTR, CIP, SXT, IMI, AZT, CAZ, CHL, TET
7 – Luís Eduardo Magalhães/BA	7.4 – <i>Stenotrophomonas</i> sp.		LEV, SXT
7 – Luís Eduardo Magalhães/BA	7.5 – <i>Atlantibacter hermannii</i>	AMP	CFZ, GEN, AMI, AMC, CPM, FOX, CTR, CIP, SXT, IMI, AZT, CAZ, CHL, TET
8 – Panambi/RS	8.4 – <i>Enterococcus faecalis</i>		AMP, LNZ, PEN, STR, VAN
9 – Palotina/PR	9.3 – <i>Enterococcus</i> sp.	(amostra perdida )	
10 – Palotina/PR	10.1 – <i>Enterococcus faecalis</i>	STR	AMP, LNZ, PEN, VAN
11 – Sorriso/MT	11.3 – <i>Enterococcus hirae</i>		AMP, LNZ, PEN, STR, VAN
12 – Sorriso/MT	12.1 – <i>Acinetobacter</i> sp.		CAZ, SXT, CIP, IMI, LEV, MRP, PTZ, CTR, AMI, SUL, CPM, GEN
14 – Panambi/RS	14.1 – <i>Enterococcus faecalis</i>		AMP, LNZ, PEN, STR, VAN
15 – Salto Grande/SP	15.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ERY	GEN, CLI, CIP, FOX, TET, CHL, LNZ, PEN
16 – Salto Grande/SP	16.1 – <i>Citrobacter</i> sp.	CFZ*, AMC*	SXT, AMI, CHL, TET, IMI, AMP, CIP, CAZ, CFZ, GEN, CTR, AZT, CPM, AMC
16 – Salto Grande/SP	16.2 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP*	AMC, SXT, AMI, CHL, TET, IMI, CFZ, CIP, CAZ, CFZ, GEN, CTR, AZT, CPM, AMC

Continua...

Tabela 6: continuação

Amostra	Microrganismo	Resistente	Sensível
16 – Salto Grande/SP	16.3 – <i>Enterobacter</i> sp.	AMC*, AMP*, CFZ*	SXT, CHL, TET, IMI, CFZ, CIP, CAZ, GEN, CTR, AZT, CPM
16 – Salto Grande/SP	16.4 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		GEN, CFZ, LEV, MRP, IMI, CPM, CIP, AZT, PTZ
16 – Salto Grande/SP	16.5 – <i>Acinetobacter baumannii</i>	CTR*	CAZ, SXT, CIP, IMI, LEV, MRP, PTZ, AMI, SUL, CPM, GEN
17 – Lutécia/SP	17.1 – <i>Citrobacter</i> sp.	AMP*, CFZ*, AMC*	AMC, SXT, AMI, CHL, TET, IMI, CIP, CAZ, CFZ, GEN, CTR, AZT, CPM
17 – Lutécia/SP	17.2 – <i>Enterococcus</i> sp.		GEN, LNZ, AMP, STR, VAN, PEN
17 – Lutécia/SP	17.3 – <i>Acinetobacter baumannii</i>	PTZ*	CAZ, SXT, CIP, IMI, LEV, MRP, CTR, AMI, SUL, CPM, GEN
17 – Lutécia/SP	17.4 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP*	AMC, SXT, AMI, CHL, TET, IMI, CFZ, CIP, CAZ, CFZ, GEN, CTR, AZT, CPM, AMC
18 – Lutécia/SP	18.1 – <i>Acinetobacter baumannii</i>		CAZ, SXT, CIP, IMI, LEV, MRP, CTR, AMI, SUL, CPM, GEN, PTZ
18 – Lutécia/SP	18.2 – <i>Enterococcus faecalis</i>		AMP, LNZ, PEN, STR, VAN
18 – Lutécia/SP	18.3 – <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		LEV, SXT
18 – Lutécia/SP	18.4 – <i>Citrobacter</i> sp.	AMI, CTR, AZT, AMP*, AMC*, CFZ*, GEN**, IMI**	SXT, CHL, TET, CIP, CAZ, CPM

Fonte: a autora (2020).

\* Resistência Intrínseca (natural do microrganismo)

\*\* Resistência Intermediária

Siglas: AMI (Amicacina); AMC (Amoxicilina + clavulanato); AMP (Ampicilina); SAM (Ampicilina + sulbactam); AZT (Aztreonam); CFZ (Cefazolina); CPM (Cefepime); CTX (Cefotaxima); FOX (Cefoxitina); CAZ (Ceftazidima); CTR (Ceftriaxona); CIP (Ciprofloxacina); CLI (Clindamicina); CHL (Cloranfenicol); ERY (Eritromicina); ERT (Ertapenem); GEN (Gentamicina); IMI (Imipenem); LNZ (Linezolida); LEV (Levofloxacina); MRP (Meropenem); PEN (Penicilina); PTZ (Piperacilina + Tazobactam); STR (Streptomicina); SUL (Sulbactam); SXT (Sulfametoxazol + Trimetropim); TET (Tetraciclina); VAN (Vancomicina).

Dentre os 85 isolados encontrados, 21 apresentaram resistência a antimicrobianos. O isolado 1.5, *Enterococcus faecalis*, apresentou resistência a todos os antimicrobianos indicados e o isolado 2.4, da mesma espécie, mostrou-se resistente a cinco deles. Este microrganismo, encontrado em 61,1% das amostras, é frequentemente relacionado com bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, abscessos, meningites e endocardites (CAUWERTS et al., 2007; KENSE et al., 2011; ZOU et al. 2011, POULSEN, et al., 2012). Isso reforça os riscos sanitários da

prática da produção *on farm* de inoculantes no que se refere a patógenos humanos resistentes a antimicrobianos.

Os estudos acerca da produção *on farm* de inoculantes e seus impactos nos sistemas de produção e potenciais riscos à saúde pública ainda são escassos, mas já indicam qualidade insatisfatória, resultando em um produto incapaz de promover os benefícios aos sistemas de produção.

## 6 CONCLUSÕES

As amostras de inoculantes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* produzidos *on farm* apresentaram-se contaminadas por vários microrganismos e, na maioria, sem os microrganismos de interesse. Quando encontrados, os microrganismos de interesse estão em concentrações muito aquém das recomendadas para uso como inoculante.

A alta ocorrência de contaminantes com potencial risco a humanos, alguns com resistência a antimicrobianos, indica que os inoculantes produzidos *on farm*, além de não terem eficácia para a inoculação das culturas, podem trazer risco sanitário e a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos no ambiente, o que pode diminuir os recursos empregados para combate a infecções.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L.; JANDA, J. M. *Enterobacter cancerogenus* (“*Enterobacter taylorae*”): infections associated with severe trauma or crush injuries. **Am J Clin Pathol**, v. 107, n. 3, p. 359–361, 1997.
- AGHAZADEH, Z.; POURALIBABA, F.; YARI KHOSROUSHAHI, A. The prophylactic effect of *Acetobacter syzygii* probiotic species against squamous cell carcinoma. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 11, n. 4, p. 208-214, 2017.
- AKITA, H.; KIMURA, Z.; MOHD YUSOFF, M. Z.; NAKASHIMA, N.; HOSHINO, T. Isolation and characterization of *Burkholderia* sp. strain CCA53 exhibiting ligninolytic potential. **SpringerPlus**, v. 5, p. 596, 2016.
- ALLAHVERDI, T.; RAHIMIAN, H.; RAVANLOU, A. First report of bacterial canker in mulberry caused by *Citrobacter freundii* in Iran. **Plant Dis.**, v. 100, n. 8, p. 1774, 2016.
- ALAUZET, C.; TEYSSIER, C.; JUMAS-BILAK, E.; GOUBY, A.; CHIRON, R.; RABAUD, C.; COUNIL, F.; LOZNIIEWSKI, A.; MARCHANDIN, H. *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 11, p. 3935-3942, 2010.
- ALCANTARA, R. M. C. M.; REIS, V. M. **Metabolismo do carbono dos nódulos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia (Documentos, 253), 2008.
- ALCANTARA, R.M.C.M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Rev Ciênc Agron**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.
- ALMEIDA, M.T.G.; BERTELLI, E.C.P.; ROSSIT, A.R.B.; BERTOLLO, E.M.G.; MARTINEZ, M. Infecções hospitalares por *Stenotrophomonas maltophilia*: aspectos clínico-epidemiológicos, microbiológicos e de resistência antimicrobiana. **Arq Ciênc Saúde**, v. 12, n. 3, p. 141-45, 2005.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant Soil**, v. 252, n. 1, p. 1-9, 2003.
- AMIN, M.; RAKHISI, Z.; AHMADY, A. Z. Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. **Avicenna J. Clin. Microb. Infect.**, v. 2, e23233, 2015.
- ANDRADE, G.; ESTEBAN, E.; VELASCO, L.; LORITE, M.; BEDMAR, E. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing microorganisms from the rhizosphere of *Capparis spinosa* (L.). **Plant Soil**, v. 197, p. 19-23, 1997.
- ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbios no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994

- ARAÚJO, S.C. *Roadmapping* da comercialização de inoculantes no Brasil: novas estratégias, articulações e demandas da ANPIL. **Anais da XVI Relare**. Londrina-PR, 2012.
- ARORA, N. K.; KHARE, E.; MAHESHWARI, D. K. Plant growth promoting rhizobacteria: constraints in bioformulation, commercialization, and future strategies. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.) **Plant growth and health promoting bacteria**. Microbiology monographs, v. 18, Berlin: Springer, 2011, pp. 97–116.
- BAIRD, R.; BRIDGEWATER, L. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 23 ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2017.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of fieldgrown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biol. Fertil. Soils**, v. 4, p. 37-40, 1987.
- BARASSI, C. A. SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A. Potencialidad de *Azospirillum* en optimizar el crecimiento vegetal bajo condiciones adversas. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Eds) **Azospirillum sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, p. 49-59, 2008.
- BÁRBARO, I.M.; MACHADO, P.C.; BÁRBARO JUNIOR, L.S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F.B.; SILVA, J.A.A. Produtividade da soja em resposta à inoculação padrão e coinoculação. **Colloq agrar**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2009.
- BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnol Adv**, v.16, p. 729–770, 1998.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, n. 1, p. 1-16, 2014.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J Clin Pathol**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BENINTENDE, S.; UHRICH, W.; HERRERA, M.; GANGGE, F.; STERREN, M.; BENINTENDE, M. Comparación entre coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium japonicum* en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. **Agriscientia**, v. 27, n. 2, p. 71-77, 2010.
- BOAVENTURA, H. A.; QUINTELA, E. D.; NORONHA JR, N. C.; MONNERAT, R. Avaliação da eficiência do “Bt caseiro” no controle de lagartas de *Helicoverpa armigera*. In: Simpósio de Controle Biológico, 14, 2015, Teresópolis. **Anais [...]**. Londrina: Sociedade Entomológica do Brasil, 2015.

BOLLA, K.N., 2015. Soybean consumption and health benefits. **Int J Scient Technol Res**, v. 4, n. 1, p. 50-53, 2015.

BOSZCZOWSKI, I.; SALOMÃO, M. C.; MOURA, M. L.; FREIRE, M. P.; GUIMARÃES, T.; CURY, A. P.; ROSSI, F.; RIZEK, C. F.; MARTINS, R. C. R.; COSTA, S. F. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 61, n. 29, 2019.

BOURAFI, N.; LOUCIF, L.; BOUTEFNOUCHET, N.; ROLAIN, J.M. *Enterococcus hirae*, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: first case report in Algeria. **New Microbes New Infect**, v. 8, p. 7–9, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº13, 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 [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, p.3-7,2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº30, 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 da República Federativa do Brasil**, seção 1, 2010.

BRENNER, D. J.; O'HARA, C. M.; GRIMONT, P. D.; JANDA, J. M.; FALSEN, E.; ALDOVA, E.; AGERON, E.; SCHINDLER, J.; ABBOTT, S. L.; STEIGERWALT, A. G. Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter urlinae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11). **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 8, p. 2619-2624, 1999.

BRILL, W. J. Biological nitrogen fixation. **Sci Amer**, v. 273, n. 2, p. 78-83, 1977.

BRITT, N. S.; POTTER, E. M. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 5, p. 57–61, 2016.

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

BRUXEL, M. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para identificação molecular das estirpes recomendadas para produção de inoculantes para soja, milho e Trigo**. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

BULEGON, L. G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.;

KESTRING, D. Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomic Sciences**, v. 3, n. 1, p. 26-37, 2014.

CÂMARA, G.M.S. **Introdução ao agronegócio soja**. USP/ESALQ – Departamento de Produção Vegetal - 2015.

CAMARGO, C. H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; IN LEE, S. H.; FERNANDES JÚNIOR, A.; KANENO, R.; RALL, V. L. M. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Bra. J Microbiol**, v.45 n.1, p. 111-115, 2014.

CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixação biológica de N<sub>2</sub> por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto. **Rev Bras Ciênc Solo**, v. 25, n. 3, p. 583-592, 2001.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C.; AMARAL, F. P.; FALEIRO, A. C.; HUERGO, L. F.; ARISI, A. C. M. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **EurJ Soil Biol**, v. 58, p. 45-50, 2013.

CAÑETE-RODRÍGUEZ, A.M.; SANTOS-DUEÑAS, I.M.; TORIJA-MARTÍNEZ, M.J.; MAS, A.; JIMÉNEZ-HORNERO, J.E.; GARCÍA-GARCÍA, I. An approach for estimating the maximum specific growth rate of *Gluconobacter japonicus* in strawberry purée without cell concentration data. **Biochem Eng J**, v. 105, p 314–320, 2016.

CASSETARI, A. S. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. Tese (doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

CATROUX, G.; HARTMANN, A.; REVELLIN, C. Trends in rhizobial inoculant production and use. **Plant Soil**, v. 230, n.1, p. 21-30, 2001.

CAUWERTS, K.; DECOSTERE, A.; DE GRAEF, E.M.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the erm (B) gene. **Avian Pathol**, v. 36, p. 395-399, 2007.

CEREZINI, P.; KUWANO, B.; SANTOS, M.; TERASSI, F.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Strategies to promote early nodulation in soybean under drought. **Field Crops Res**, v.196, p.160-167, 2016.

CHAGAS, T. P. G. **Caracterização de *Acinetobacter* spp. multirresistentes produtores de carbapenemases, dos tipos OXA e NDM, isolados de diferentes regiões do Brasil**. Tese (doutorado em Ciências) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

CHAVES, L.C. Participação dos microrganismos do gênero *Enterobacter* nas infecções. **ABCS Health Sci**, v. 27, n. 2, p. 19-21, 2002.

CHEN, X.; WANG, L.; ZHOU, J.; WU, H.; LI, D.; CUI, Y.; LU, B. *Exiguobacterium* sp. A1b/GX59 isolated from a patient with community-acquired pneumonia and bacteremia: genomic characterization and literature review. **BMC infect dis**, v. 17, p. 508, 2017.

CHIBEBA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.; BRITO, O.R.; ARAUJO, R.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **Am J Plant Sci**, v.6, p.1641-1649, 2015.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Rev Bras Cienc Solo**, v. 27, n. 5, pp.833-840, 2003.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COHEN, A.C.; BOTTINI, R.; PONTIN, M.; BERLI, F.J.; MORENO, D.; BOCCANLANDRO, H.; TRAVAGLIA, C.N.; PICCOLI, P.N. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiol Plant**, v.153, n.1, p.79-90, 2015.

Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 7 - Safra 2019/20 - n. 4 - Quarto levantamento, janeiro 2020. Disponível em: [<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/grãos>]. Acesso em: 07 jan. 2020.

DEAKER, R.; HARTLEY, E.; GEMELL, G.; HERRIDGE, D. F.; KARANJA, N. Inoculant production and quality control. *In*: HOWIESON, J.G.; DILWORTH, M.J. (Eds.) **Working with rhizobia**. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, 2016.

DAEKER, R. ROUGHLEY, J.R; KENNEDY, I. Legume seed inoculation technology – a review. **Soil Biol Biochem**, v. 36, 1275–1288, 2004.

DAI, W.; ZHU, Y.; WANG, X.; SAKENOVA, N.; YANG, Z.; WANG, H.; LI, G.; HE, J.; HUANG, D.; CAI, Y.; GUO, W.; WANG, Q.; FENG, T.; FAN, Q.; ZHENG, T.; HAN, A. Draft genome sequence of the bacterium *Comamonas aquatica* CJG. **Genome Announc**, v. 4, n. 6, 2016.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.; OLIVEIRA, A. B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. Londrina: Embrapa Soja, 12 p. (Circular Técnica, 43), 2007.

DALOLIO, R. S.; BORIN, E.; CRUZ, R. M. M. S.; ALBERTON, O. Co-inoculação de soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **J Agronom Sci**, v.7, n.2, p.1-7, 2018.

DAMASCENO, R. G. **Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes**. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; ORMENÕ-ORRILLO, E.; MELO, I.S.; MARTINÉZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v.63, p.3342–3351, 2013.

DELEY, J. Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. Part I. General properties and taxonomic position of the species. **J Microbiol Serol**, n. 24, p. 281-297, 1958.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nat Rev Microbiol**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.

DOBBELAERE, S.; OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. In: ELMERICH, C.; Newton, W. E. (Eds.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**, Series: Nitrogen Fixation: Origins, Applications and Research Progress. Springer: Dordrecht, The Netherlands, v. 5, p. 145-170, 2007.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, I. J. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, v.34, p.869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers; Berlin: Springer-Verlag, 1987, 155p.

DUARTE, C. F. D.; CECATO, U.; HUNGRIA, M.; FERNANDES, H. J.; BISERRA, T. T.; GALBEIRO, S.; TONIATO, A. K. B.; SILVA, D. R. Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization. **Crop Pasture Sci**, v. 71, p. 82-89, 2020.

DUTTA, D.; GACHHUI, R. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v.56, p. 1899-1903, 2006.

DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes**: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, v. 4, Springer, 2006.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. **Soja em números** (safra 2018/2019), junho, 2019. Disponível em: [https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos]. Acesso em: 07 jan. 2020.

ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 57, pt. 4, p. 708-712, 2007.

ESCOBAR NIÑO, A. **Actividades enzimáticas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 con aplicaciones medioambientales**. (Tesis doctoral inédita). Universidad de Sevilla, Sevilla, 2016.

FACCIN, D. J. L., RECH, R., SECCHI, A. R., CARDOZO, N. S. M., AYUB, M. A. Z. Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly (3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*, **Process Biochem**, v. 48, p. 420-425, 2013.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.1, 2007.

FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Agric, Ecosyst Environ, Appl Soil Ecol**, v. 72, p. 103-108, 2013.

FERREIRA, M. G.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Res**, v. 79, p. 139-152, 2002.

FORSON, A. O.; TSIDI, W. B.; NANA-ADJEI, D.; QUARCHIE, M. N.; OBENG-NKRUMAH, N. *Escherichia coli* bacteriuria in pregnant women in Ghana: antibiotic resistance patterns and virulence factors. **BMC Res Notes**, v. 11, p. 901, 2018.

FREIRE, J.R.J.; VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesq Agrop Gaúcha**, v.5, p. 117-126, 1999.

FREITAS, M. C. M. **A cultura da soja no Brasil: O crescimento da produção brasileira e o surgimento de uma nova fronteira agrícola**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.7, n. 12; 2011.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Expr**, v. 8, p. 73, 2018.

FUKAMI, J.; OLLERO, F.J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, p. 153, 2017.

GAENSLY, F. **Seleção de leveduras vínicas autóctones produtoras da enzima  $\beta$ -glicosidase em mosto de uvas *Vitis labrusca* visando o aumento do teor de resveratrol livre**. 2026. 131f. Tese (doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

GARCIA, V.; ABAT, C.; MOAL, V.; ROLAIN, J.M. *Citrobacter amalonaticus* human urinary tract infections, Marseille, France. **New Microbes New Infect.**, v. 11, p. 1-5, 2016.

GARCÍA-GONZALEZ, T.; SÁENZ-HIDALGO, H. K.; SILVA-ROJAS, H. V.; MORALES-NIETO, C.; VANCHEVA, T.; KOEBNIK, R.; ÁVILA-QUEZADA, G. D. *Enterobacter cloacae*, an emerging plant-pathogenic bacterium affecting chili pepper seedlings. **Plant Pathol J**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2018.

GHANBARINIA, F.; KHEIRBADI, M.; MOLLANIA, N. *Comamonas* sp. halotolerant bacterium from industrial zone of Jovein of Sabzevar introduced as good candidate to remove industrial pollution. **Iran J Microbiol**, v. 7, n. 5, p. 273-280, 2015.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul.** 2007. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2007.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GOYAL, A.; MAHESHWARI, P. **Frontiers on Recent Developments in Plant Science**, v. 1, Canada: Bentham Science Publishers, 2012.

GUERRA, P. V. **Avaliação do potencial imunomodulatório de *Lactococcus lactis* produtor de Hsp65 na Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania braziliensis*.** 2018. 101 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; SOUZA, A. K. P.; BULEGON, L. G.; OFFEMANN, L. C.; INAGAKI, A. M. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações *In*: ZAMBOM, M. A.; KUHN, O. J.; SILVA, N. L. S.; STANGARLIN, J. R.; NUNES, R. V.; FULBER, V. M.; EYNG, C. (Org.) **Ciências agrárias: ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária.** 1ed. Marechal Cândido Rondon: Centro de Ciências Agrárias/Unioeste, p. 192-212, 2017.

GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Can J Microbiol**, v. 38, p.475-484, 1991.

GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Res**, v. 5, p. 121-128, 1982.

HAFED, L; FARAG, H.; EL-ROUBY, D.; SHAKER, O.; SHABAAN, H-A. *Candida albicans* alcohol dehydrogenase 1 gene in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Pol J Pathol.**, v. 70, n. 3, p. 210-216, 2019.

HARADA, K.; TAKAE, SHIMIZU, T.; HIROICHI, O.; YUI, K.; TADASHI, M.; ANDYUZO, T. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 64, 2019.

- HASAN, S.; SULTANA, M.; HOSSAIN, M. A. Complete genome arrangement revealed the emergence of a poultry origin superbug *Citrobacter portucalensis* strain NR-12. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 18, p. 126-129, 2019.
- HASSAN, A. A.; COUTINHO, C. P.; SÁ-CORREIA, I. Structure of O-antigen and hybrid biosynthetic locus in *Burkholderia cenocepacia* clonal variants recovered from a cystic fibrosis patient. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1027, 2017.
- HATA, H.; NATORI, T.; MIZUNO, T.; KANAZAWA, I.; ELDESOUKY, I.; HAYASHI, M.; MIYATA, M.; FUKUNAGA, H.; OHJI, S.; HOSOYAMA, A.; AONO, E.; YAMAZOE, A.; TSUCHIKANE, K.; FUJITA, N.; EZAKI, T. Phylogenetics of family *Enterobacteriaceae* and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. **Microbiol Immunol**, v. 60, n.5, 2016.
- HELLRIEGEL, H.; WILFARTH, H. Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. **Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rübenzucker - industrie deutschen Reiches**, p. 1- 234, 1888.
- HER, J.; KIM, J. *Rummeliibacillus suwonensis* sp. nov., isolated from soil collected in a mountain area of South Korea. **J Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 268–272, 2013
- HERRMANN, L.; ATIENO, M.; BRAU, L.; LESUEUR, D. Microbial quality of commercial inoculants to increase BNF and nutrient use efficiency. *In*: de BRUJIN, F. J., ed, **Biological Nitrogen Fixation**. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015.
- HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**, v. 311, 2008.
- HIBBING, M.E.; FUQUA, C.; PARSEK, M.R.; PETERSON, S.B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 15-25, 2010.
- HIGASHIDE, T.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, A.; OHKUBO, S.; SAKURAI, M.; SHIRAO, Y.; TAMURA, T.; SUGIYAMA, K. Endophthalmitis Caused by *Enterococcus mundtii*. **J Clin Microbiol**, n., 43, v. 3, p. 1475–1476, 2005.
- HIRAI, J.; UECHI, K.; HAGIHARA, M.; SAKANASHI, D.; KINJO, T.; HARANAGA, S.; FUJITA, J. Bacteremia due to *Citrobacter braakii*: A case report and literature review. **J Infect Chemother**, v. 12, p. 819-821, 2016.
- HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. **O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro** – Londrina: Embrapa Soja, 2014.
- HONGRITTIPUN, P.; YOUNG, S.; RERKASEM, B. Screening of nitrogen fixing endophytic bacteria in *Oryza sativa* L. **J Agric Sci**, v. 6, p. 66–74, 2014.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Circular técnica. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C.; GRAHAM, P.H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. *In*: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston, Texas: Studium Press, 2006.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. A fixação biológica de nitrogênio com a cultura do feijoeiro. *In*: HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; MERCANTE, F. M. **Tecnologia de Fixação Biológica do Nitrogênio com o Feijoeiro: viabilidade em pequenas propriedades familiares e em propriedades tecnificadas**. Londrina: Embrapa Soja, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologia de coinoculação: rizóbios e *Azospirillum* em soja e feijoeiro**. Cartilha (INFOTECA-E). Londrina: Embrapa Soja, 2014. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/984365>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biol Fertil Soils**, v.49, n.7, p.791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agr Ecosyst Environ**, v. 221, p. 125-131, 2016.

IERANÒ, T.; SILIPO, A.; STURIALE, L.; GAROZZO, D.; BRYANT, C.; LANZETTA, R.; PARRILLI, M.; ALDRIDGE, C.; GOULD, F. K.; CORRIS, P. A.; KHAN, C. M. A.; DE SOYZA, A.; MOLINARO, A. First structural characterization of *Burkholderia vietnamiensis* lipooligosaccharide from cystic fibrosis-associated lung transplantation strains. **Glycobiology**, v. 19, n. 11, p. 1214-1223, 2009.

ILLEGHEMS, K.; PELICAEN, R.; DE VUYST, L.; WECKX, S. Assessment of the contribution of cocoa-derived strains of *Acetobacter ghanensis* and *Acetobacter senegalensis* to the cocoa bean fermentation process through a genomic approach. **Food Microbiol**, v. 58, p. 68-78, 2016.

IOANNOU, P. *Escherichia hermannii* infections in humans: A systematic review. **Trop Med Infect Dis**, v.4, n. 17, 2019.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* sp. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **Int J Syst Bacteriol**, v. 32, p. 136-139, 1982.

JUNG, Y-O.; JEONG, H.; CHO, Y.; LEE, E-O.; JANG, H-W.; KIM, J.; NAM, K.T.; LIM, K-M. Lysates of a probiotic, *Lactobacillus rhamnosus*, can improve skin barrier function in a reconstructed human epidermis model. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 17, p. 4289, 2019.

KABI, M.C. Impact of biofertilizer on rural development. *In: Proceedings of National Conference on impact of biotechnology and modern horticulture in rural development*. Calcutta: Jadavpur University, 1997.

KALA, T.C.; CHRISTI, R.M.; BAI, N.R. Effect of *Rhizobium* inoculation on the growth and yield of horsegram (*Dolichos biflorus* Linn). **Plant Arch**, v. 11, 2011.

KAMBOJ, K.; VASQUEZ, A.; BALADA-LLASAT, J.M. Identification and significance of *Weissella* species infections. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1204, 2015.

KANDI, V.; PALANGE, P.; VAISH, R.; BHATTI, A. B.; KALE, V.; KANDI, M. R.; BHOOMAGIRI, M. R. Emerging bacterial infection: identification and clinical significance of *Kocuria* species. **Cureus**, v. 8, n. 8, 2016.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T. Fungal Biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. **Bioresour Technol**, v. 53, p. 195-206, 1995.

KASPER, D.L.; FAUCI, A.S.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, L.; LOSCALZO, J. **Manual de Medicina de Harrison**. Tradução: Ademar Valadares Fonseca et al. – 19. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P.A.; GILLER, K.E.; KUYPER, T.W. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N<sub>2</sub> fixation or nitrate supply. **Plant Biol**, v. 12, p. 60-69, 2010.

KENSE, M.J.; LANDMAN, W.J.M. *Enterococcus cecorum* infections in broiler breeders and their offspring: molecular epidemiology. **Avian Pathol**, v. 40, n. 6, p. 603-612, 2011.

KITAKA, P. R.; ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; BELGINI, D.R.B.; PICCINS-SANTOS, V.; OLIVEIRA, V.M. Lactic acid bacteria: overview of contamination in bioethanol industry. *In: Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 29., 2017, Foz do Iguaçu. **Anais[...]** Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2017.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity **Trends Biotechnol**, v. 7, p. 39-43, 1989.

KNIGHT, D.B.; RUDIN, S.D.; BONOMO, R.A.; RATHER, P. N. *Acinetobacter nosocomialis*: defining the role of efflux pumps in resistance to antimicrobial therapy, surface motility, and biofilm formation. **Front Microbiol.**, v. 9, p.1902, 2018.

KOMMANEE, J.; TANASUPAWAT, S.; YUKPHAN, P.; THONGCHUL, N.; MOONMANGMEE, D.; YAMADA, Y. Identification of *Acetobacter* strains isolated in

Thailand based on the phenotypic, chemotaxonomic, and molecular characterization. **ScienceAsia**, v. 38, p. 44-53, 2012.

KRISHNAMURTHI, S.; CHAKRABARTI, T. Proposal for transfer of *Pelagibacillus goriensis* Kim et al. 2007 to the genus *Terribacillus* as *Terribacillus goriensis* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 58, p. 2287-2291, 2008.

KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Can J Microbiol**, v. 38, p. 501-505, 1992.

LIBA, C.M.; FERRARA, F.I.; MANFIO, G.P.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALBUQUERQUE, R.C.; PAVAN, C.; RAMOS, P.L.; MOREIRA-FILHO, C.A.; BARBOSA, H.R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **J Appl Microbiol**, v.101, n. 5, p. 1076-86, 2006.

LIBONATTI, C.; AGÜERIA, D.; GARCÍA, C.; BASUALDO, M. (2018). *Weissella paramesenteroides* encapsulation and its application in the use of fish waste. **Rev Argent Microbiol**, v. 51, p. 81-83, 2019.

LIN, L.; LI, Z.; HU, C.; ZHANG, X.; CHANG, S.; YANG, L.; LI, Y. AN, Q. Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. **Microbes Environ**, v. 27, n. 4, p. 391-8, 2012.

LIU, L-H.; WANG, N-Y.; WU, A. Y-J.; LIN, C-C.; LEE, C-M.; LIU, C-P. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 51, n. 4, p. 565-572, 2018.

LOUREIRO, M. F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. **Biol Fertil Soils**, v. 43, 2006.

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

MALEK, A.; MCGLYNN, K.; TAFFNER, S.; FINE, L.; TESINI, B.; WANG, J.; MOSTAFA, H.; PETRY, S.; PERKINS, A.; GRAMAN, P.; HARDY, D.; PECORA, N. Next-generation-sequencing-based hospital outbreak investigation yields insight into *Klebsiella aerogenes* population structure and determinants of carbapenem resistance and pathogenicity. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 63, n. 6, 2019.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. Disponível em: [<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/598661>]. Acesso em: 12 jun. 2018.

- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biol Fertil Soils**, v. 38, n. 6, p. 333-339, 2003.
- MASCIARELLI, O.; URBANI L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **J Microbiol**, v. 51, n. 5, 2013.
- MASUDA, T., GOLDSMITH, P.D. World soybean production: area harvested, yield, and longterm projections. **Int Food Agribus Manag Rev** v. 12, 2009.
- McGINLEY, C.; McGINLEY, M. Odor testing biosolids for decision making. *In*: **WATER ENVIRONMENT FEDERATION SPECIALTY CONFERENCE**, Austin (EUA), p. 3-6, 2002.
- MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F.; BUENO, F. **Fixação biológica de nitrogênio na soja**: bom para a qualidade do solo, para o bolso do agricultor e para o Brasil. 2010. Disponível em: <http://www.diadecampo.com.br>. Acesso em 30 out. 2018.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002.
- MORELLO, E.; PÉREZ-BEREZO, T.; BOISSEAU, C.; BARANEK, T.; GUILLON, A.; BRÉA, D.; LANOTTE, P.; CARPENA, X.; PIETRANCOSTA, N.; HERVÉ, V.; RAMPHAL, R.; CENAC, N.; SI-TAHAR, M. *Pseudomonas aeruginosa* lipooxygenase LoxA contributes to lung infection by altering the host immune lipid signaling. **Front Microbiol**, v. 10, 2019.
- MOYAD, M. A. Brewer's/baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and preventive medicine: Part II. **Urol Nurs**, v. 28, p. 73-75, 2008.
- NGUYEN, T. H.; PARK, M. D.; OTTO, M. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* colonization and infections. **Front. Cell Infect Microbiol**, v. 7, 2017.
- NICOLAU, P. B. **Microrganismos e crescimento microbiano**. 2014. Disponível em: <[https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2\\_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano\\_PBN.pdf](https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano_PBN.pdf)>[https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2\\_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano\\_PBN.pdf](https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano_PBN.pdf)>. Acesso em 13 nov. 2019.
- NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Boas práticas de inoculação em soja. 40ª Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul - **Atas e Resumos**, Pelotas, 2014.
- NOGUEIRA, M.A.; PRANDO, A.M.; OLIVEIRA, A.B.; LIMA, D.; CONTE, O.; HARGER, N.; OLIVEIRA, F. T.; HUNGRIA, M. **Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na**

**cultura da soja na safra 2017;18 no estado do Paraná.** Circular técnica. Londrina: Embrapa Soja, 2018.

OLIVEIRA R. Avaliação da contaminação microbiológica durante as etapas do ciclo de produção do morangueiro 2009. 71 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Dinitrogen-fixing prokaryotes. *In*: ROSENBERG, E.; DE LONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. (Eds.). Capítulo 11. **The Prokaryotes** - prokaryotic physiology and biochemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013.

OROS-SICHLER, M.; GOMES, N. C. M.; NEUBER, G.; SMALLA, K. A new semi-nested PCR protocol to amplify large 18S rRNA gene fragments for PCR-DGGE analysis of soil fungal communities. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 63-75, Apr. 2006.

PATI, N. B.; DOIJAD, S. P.; SCHULTZE, T.; MANNALA, G. K.; YAO, Y.; JAISWAL, S.; RYAN, D.; SUAR, M.; GWOZDZINSKI, K.; BUNK, B.; MRAHEIL, M. A.; MARAHIEL, M. A.; HEGEMANN, J. D.; SPRÖER, C.; GOESMANN, A.; FALGENHAUER, L.; HAIN, T.; IMIRZALIOGLU, C.; MSHANA, S. E.; OVERMANN, O.; CHAKRABORTY, T. *Enterobacter bugandensis*: a novel enterobacterial species associated with severe clinical infection. **Sci Rep**, v. 8, p. 5392, 2018.

PELLEGRINO, F.L.; VIEIRA, V.V.; BAIO, P.V.; DOS SANTOS, R.M.; DOS SANTOS, A.L.; SANTOS, N.G.; MEOHAS, M.M.; SANTOS, R.T.; DE SOUZA, T.C.; DA SILVA DIAS, R.C.; SANTORO-LOPES, G.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. *Acinetobacter soli* as a cause of bloodstream infection in a neonatal intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 6, p. 2283-2285, 2011.

POULSEN, L.L.; BISGAARD, M.; SON, N.T.; TRUNG, N.V.; AN, H.M.; DALSGAARD, A. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. **Emerg Infect Dis.**, v.18, p.1096-1100, 2012.

POWER, R.F.; LINNANE, B.; MARTIN, R.; POWER, N.; HARNETT, P.; CASSERLY, B.; O'CONNELL, N.H.; DUNNE, C.P. The first reported case of *Burkholderia contaminans* in patients with cystic fibrosis in Ireland: from the Sargasso Sea to Irish Children. **BMC Pulm Med**, v. 16, n. 1, p. 57, 2016.

RAMÍREZ QUINTERO, J. D.; Bacteriemia por raoultella planticola de origen gastrointestinal. **Iatreia**, v. 30, n. 1, p. 67-71, 2017.

REIS, V.M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

RIGO, A.A.; DAHMER, A.M.; STEFFENS, C.; STEFFENS, J.; CARRÃO-PANIZZI, M.C. Characterization of soybean cultivars genetically improved for human consumption. **Int J Food Eng**, v.1, 2015.

SÁEZ-NIETO, J.A.; MEDINA-PASCUAL, M.J.; CARRASCO, G.; GARRIDO, N.; FERNANDEZ-TORRES, M.A.; VILLALÓN, P.; VALDEZATE, S. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. **New Microbes New Infect.**, v. 19, p.19-27, 2017.

SALAZAR, H. G. M.; Salem, A.Z.M.; KHOLIF, A. E.; MUNROY, H.; PÉREZ, L. S.; ZAMORA, J. L.; GUTIÉREZ, A. Yeast: description and structure. *In*: SALEM, A.Z.M.; KHOLIF, A.E.; PUNIYA, A.K. **Yeast additive and animal production**. Índia: PubBioMed Central Research Publishing Services, p.4 -13, 2016.

SANTINI, J. M. K.; BUZETTI, S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; GALINDO, F. S.; COAGUILA, D. N.; BOLETA, E. H. M. Doses and forms of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize crop. **Rev bras eng agric ambient**, v.22, n.6, p. 373-377, 2018.

SANTOS, H. R. M. **Diversidade de bactérias em nódulos de *Inga vera* Willd. (Leguminosae - Mimosoideae) do sul da Bahia**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

SATURNO, D. F.; CERZINI, P.; MOREIRA, P. da S.; OLIVEIRA, A. B. de.; OLIVEIRA, M. C. N de.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Mineral nitrogen impairs the biological nitrogen fixation in soybean of determinate and indeterminate growth types. **J Plant Nutr**, v.40, p.1690-1701, 2017.

SAWADA, H., KUYKENDALL, L. D., & YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **J Gen Appl Microbiol**, v. 49, n. 3, 2003.

SCHIRMER, W. N.; LACEY, M. E. Q.; LISBOA, H. M.; VIEIRA, M.; ROSSO, L.; CAMPOS, G. F.; RODRIGUES, M. Z. Análises olfatométricas para determinação das características do odor no Manguezal do Itacorubi, município de Florianópolis, Santa Catarina. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 2, p. 57–72, 2008.

SCHMITZ, R.A.; KLOPPROGGE, K.; GRABBE, R. Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii*: NifL, transducing two environmental signals to the nif transcriptional activator NifA. **J Mol Microbiol Biotechnol**, v. 4, n. 3, p. 235-42, 2002.

SCHROEDER, B. K.; DU TOIT, L. J.; SCHWARTZ, H. F. First report of *Enterobacter cloacae* causing onion bulb rot in the Columbia basin of Washington State. **Plant Dis**, v. 93, n. 3, p. 323, 2009.

SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção de uso da soja**. 1. Ed. Londrina: Mecenas, 2009.

SELVAKUMAR, G.; KUNDU, S.; JOSHI, P.; NAZIM, S.; GUPTA, A.D.; GUPTA, H.S. Growth promotion of wheat seedlings by *Exiguobacterium acetylicum* 1P (MTCC 8707) a cold tolerant bacterial strain from the Uttarakhand Himalayas. **Indian J Microbiol**, v. 50, n. 1, p. 50-56, 2010.

SHARIFI-RAD, M.; SHADANPOUR, S.; VAN BELKUM, A.; SOLTANI, A.; SHARIFI-RAD, J. First case of vanA -positive *Enterococcus mundtii* in human urinary tract infection in Iran. **New Microbes and New Infectios**, v. 4, p. 68–70, 2016.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1 ed., 2004.

SILVA, A. F.; CARVALHO, M. A. C.; SCHONINGER, E. L.; MONTEIRO, S.; CAIONE, G.; SANTOS, P. A. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p. 404-412, 2011.

SILVEIRA, A. P. D. D.; FREITAS, S. D. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007.

SINCLAIR, T. R.; VADEZ, V. The future of grain legumes in cropping systems. **Crop Pasture Sci**, v. 63, p. 501-512, 2012.

SINGH, R. K.; MALIK, N.; SINGH, S. (2013). Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Bioscience**, v. 5, p. 8-14, 2013.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução: MATOS, R. M. 9 ed. São Paulo: Cengage Learning 2014.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GLANDORF, B.; VAN ELSAS, J. D.; WERNARD, K. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, June 1999.

SMITH, B. E.; RICHARDS, R. L.; NEWTON, W. E., Eds. **Catalysts for nitrogen fixation: nitrogenases, relevant chemical models and commercial processes**. Kluwer Acad. Publ.: Dordrecht, 2013.

STEPHENS, J.H.G.; RASK, H.M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Res**, v 65, p. 249–258, 2000.

THOMPSON J. Production and quality control of legume inoculants. Pp. 489–533. *In*: BERGERSEN, F. J. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Michigan: John Wiley & Son Ltd., p. 489-533, 1980.

TIEN, T.; GASKIN, M.; HUBBEL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.), **Appl Environ Microbiol**, v. 37, p. 1016–1024, 1979.

TUAZON, C.U.; MURRAY, H.W.; LEVY, C.; SOLNY, M.N.; CURTIN, J.A.; SHEAGREN, J.N. Serious infections from *Bacillus* sp. **JAMA**, v. 241, n. 11, p. 1137-1140, 1979.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Public Distribution. **Oilseeds and Products Update**. December, 2019. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/brazil-oilseeds-and-products-update-21>>. Acesso em 09 jan. 2020.

VAISHAMPAYAN, P.; MIYASHITA, M.; OHNISHI, A.; SATOMI, M.; ROONEY, A.; LADUC, M.T.; VENKATESWARAN, K. Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov., sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al. 2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb. nov. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 59, p. 1094-1099, 2009.

VALICENTE, F.H.; LANA, U.G.P.; PEREIRA, A.C.P.; MARTINS, J.L.A.; TAVARES, A.N.G. **Riscos à produção de biopesticida à base de *Bacillus thuringiensis***. Circular técnica n.239, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2018.

VANCANNEYT, M.; ZAMFIR, M.; DEVRIESE, L.A.; LEFEBVRE, K.; ENGELBEEN, K.; VANDEMEULEBROECKE, K.; AMAR, M.; DE VUYST, L.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 54, pt.6, p. 2175-2179, 2004.

VAN DIJL, J.M.; HECKER, M. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. **Microb Cell Fact**, v. 12, n.3, 2013.

WEISBURG, M.G., BARNES, S.M., PELLETIER, D.A., Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**, v.173, 1991.

VELÁZQUEZ, E.; SILVA, L.; PEIX, A. Legumes: A healthy and ecological source of flavonoids. **Curr Nutr Food Sci**, v. 6, n. 2, p. 109–144, 2010.

VIDEIRA, S.S.; ARAUJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. **Série documentos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. 1990. p. 315-322.

WOESE, C. The evolution of a science. In: BALOWS, A.; SCHLEIFER, K.H.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M. (ed.) **The prokaryotes**: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications. 2.ed. Springer-Verlag, New York, USA. p. 3-18, 1991.

XAVIER I.J.; HOLLOWAY, G.; LEGGETT, M. Development of rhizobial inoculant formulations. **Online Crop Manag Netw**, 2004.

YIN, M.; JIANG, Y.; QIAN, C.; WU, F.; YING, Y.; WU, C.; LI, P.; YING, J.; LI, K.; XU, T.; BAO, Q.; SUN, C. Molecular characteristics and comparative genomics analysis of a clinical *Enterococcus casseliflavus* with a resistance plasmid. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 2159-2167, 2018.

ZHANG, R. Y.; ZHAO, S. X.; TAN, Z. Q.; ZHU, C. H. First report of bacterial stem rot disease caused by *Paenibacillus polymyxa* on *Hylocereus undulatus* in China. **Plant Dis**, v. 101, p. 1031-1031, 2017.

ZUFFO, A. M. **Aplicações de *Azospirillum brasilense* na cultura da soja**. 2016. 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

ZUFFO, A. M.; REZENDE, P. M.; BRUZI, A. T.; OLIVEIRA, N. T.; SOARES, I. O.; GONTIJO NETO, G. F.; CARDILLO, B. E. S.; SILVA, L. O. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* in the soybean crop. **Rev Cienc Agrar** V. 38, n. 1, p. 87-93. 2015.

ZOU, L.K.; WANG, H.N.; ZENG, B.; LI, J.N.; LI, X.T.; ZHANG, A.Y.; ZHOU, Y.S.; YANG, X.; XU, C.W.; XIA, Q.Q. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiol**, v.34, p. 73-80, 2011.

## APÊNDICES

## Apêndice A

### Protocolo de amostragem

Embrapa Soja - Laboratório de Biotecnologia do Solo  
 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE INOCULANTES PRODUZIDOS “ON FARM”

**Objetivo:** obtenção de amostras de inoculantes à base de *Azospirillum*, *Bradyrhizobium* ou *Rhizobium* produzidos “on farm” para avaliação microbiológica quantitativa e qualitativa.

**Material de Amostragem:** tubos tipo “Falcon” de 50 mL esterilizados, pipeta esterilizada, gelo reutilizável, luvas descartáveis, fitas parafilme para vedação, caixa de isopor. Para cada amostra, serão enviados dois tubos de transporte de duas subamostras.

**Procedimento:**

- No dia anterior, manter o gelo reutilizável em congelador ou freezer para ser usado no acondicionamento das amostras para o transporte;
- Obter a(s) amostra(s) quando o produto for considerado pronto para uso, usando utensílios esterilizados enviados no kit de amostragem (alternativamente, se o amostrador tiver disponível, usar os materiais descritos no kit) (Figura 1A).
- No momento da amostragem, calçar as luvas descartáveis enviadas no kit para manipular o material de coleta;
- No produto homogeneizado, coletar com uma pipeta estéril (inclusa no kit) e transferir alíquotas suficientes para completar cerca de 30 mL no tubo tipo “Falcon”. Repita a operação para coletar o mesmo volume para um segundo tubo de modo a se obter duas amostras de, aproximadamente, 30 mL. Identificar as subamostras na ficha anexa. Se o recipiente de produção for fechado, coletar pela saída do produto, após deixar escorrer o primeiro fluxo. Não encher totalmente o tubo de coleta; deixar, aproximadamente, 30 mL de amostra e 20 mL de ar. Fechar bem e vedar com a fita de parafilme fornecida (Figura 1B).
- Transferir as amostras para a caixa de isopor contendo as peças de gelo reutilizável. Manter os tubos em pé, apoiados em folhas de papel (Figura 1C). Lacrar a tampa da caixa com fita adesiva, embrulhar e enviar o mais rápido possível, de preferência Sedex 10 \* ou por transportadora \*, para:

*A/C Marco Antonio Nogueira e Mariangela Hungria*

*Laboratório de Biotecnologia do Solo*

*Rodovia Carlos João Strass, s/nº Acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta*

*Caixa Postal: 231*

*CEP: 86001-970 - Londrina – PR*



Figura 1A. Kit de amostragem a ser enviado.



Figura 1B. Vedação dos tubos com fita parafilme.



Figura 1C. Montagem da caixa com as amostras para envio.

\* Envie o comprovante dos correios para ressarcimento das despesas de envio.

**Apêndice B**  
Ficha de identificação das amostras

Proprietário (opcional): \_\_\_\_\_  
 Telefone e e-mail: \_\_\_\_\_  
 Propriedade (opcional): \_\_\_\_\_  
 Município: \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_  
 Microrganismo multiplicado (obrigatório):  
 ( ) *Bradyrhizobium* tubos \_\_ e \_\_ ( ) *Rhizobium* tubos \_\_ e \_\_ ( ) *Azospirillum* tubos \_\_ e \_\_  
 Área a ser usada com o(s) inoculante(s) (ha): \_\_\_\_\_  
 Técnico Responsável (opcional): \_\_\_\_\_  
 Telefone e e-mail do responsável pelo envio: \_\_\_\_\_  
 Tipo de multiplicação:  
 ( ) caixas abertas ( ) fermentador tipo industrial ( ) outro: \_\_\_\_\_  
 Tempo de crescimento (dias): \_\_\_\_\_  
 Componentes do meio de cultura, ou marca do kit de multiplicação (se possível):  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Coleta em \_\_/\_\_/\_\_ Recebido em \_\_/\_\_/\_\_ Analisado em \_\_/\_\_/\_\_

\*Para ressarcimento das despesas postais, fazer um recibo em nome de:

Fundação de Apoio à Pesquisa e ao Desenvolvimento – FAPED  
 CNPJ: 00.849.774/0001-91  
 Rua: Dr. Campos Junior, 49, centro- Sete Lagoas-MG  
 CEP: 35700-039 - Sete Lagoas - MG

Dados necessários para o ressarcimento:

Nome: \_\_\_\_\_  
 CPF: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_  
 Banco (nome e número): \_\_\_\_\_ nº. \_\_\_\_\_  
 Agência: \_\_\_\_\_  
 C/C: \_\_\_\_\_

## ANEXOS

## ANEXO A

### Composição dos meios de cultura utilizados

#### **YMA (*Yeast Mannitol Agar*)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,2 g/L
NaCl (Cloreto de Sódio)	0,1 g/L
Manitol	5,0 g/L
Extrato de Levedura	0,4 g/L
Solução Vermelho Congo 0,25%	10 mL
Ágar	12 g/L
Água destilada	1000 mL
pH	6,8 – 7,0

#### **RC (*Rojo Congo*)**

Ácido Málico	5,0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,2 g/L
NaCl (Cloreto de Sódio)	0,1 g/L
Extrato de Levedura	0,5 g/L
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (Cloreto Férrico hexahidratado)	0,015 g/L
KOH (Hidróxido de Potássio)	4,8 g/L
Solução Vermelho Congo 0,25%	15 mL
Ágar	16 g/L
Água destilada	1000 mL
pH	7,0

#### **LB (*Lúria Bertani*)**

Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
Ágar	15 g/L
Água destilada	1000 mL
pH	7,5

#### **AN (*Ágar Nutriente*)**

Extrato de carne	3,0 g/L
Glicose	2,5 g/L
Peptona Bacteriológica	10 g/L
Ágar	16 g/L
Água destilada	1000 mL
pH	6,8

**NFb semi-sólido (Nitrogen Free bromothymol blue)**

Ácido Málico	5,0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fosfato de Potássio dibásico)	0,5 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	0,1 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (Cloreto de Cálcio dihidratado)	0,02 g/L
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
Ágar	1,7 g/L
Água destilada	1000 mL
pH	6,8

## ANEXO B

### Composição das soluções utilizadas

**Solução Nutritiva (utilizada nos sacos de polipropileno) (BROUGHTON; DILWORTH, 1971).**

Solução estoque 1: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M	1 ml/L
Solução estoque 2: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5M	1 ml/L
Solução estoque 3: Fe, Mg, S e Mn	1 ml/L
Solução estoque 4: Micronutrientes	1 ml/L

#### **Solução estoque 01: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M (Cloreto de Cálcio Dihidratado)**

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

#### **Solução estoque 02: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0,5M (Fosfato de Potássio Monobásico)**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	68,1 g/L
Água destilada	1000 mL

#### **Solução estoque 03: Fe, Mg, S e Mn (Ferro, Magnésio, Enxofre e Manganês)**

Fe – EDTA (EDTA Férrico)	3,67 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Magnésio heptahidratado)	61,65 g/L
$\text{K}_2\text{SO}_4$ (Sulfato de Potássio Anidro)	43,5 g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Manganês hidratado)	0,169 g/L
Água destilada	1000 mL

#### **Solução estoque 04: Micronutrientes**

$\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibidato de Sódio dihidratado)	0,0553 g/L
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Cobalto heptahidratado)	0,028 g/L
$\text{H}_3\text{BO}_3$ (Ácido Bórico)	0,124 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Cobre pentahidratado)	0,05 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Zinco heptahidratado)	0,144 g/L
Água destilada	1000 mL