



LEONARDO DE PAIVA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA O
CONTROLE DE QUALIDADE DE
INOCULANTES PARA SOJA**

LAVRAS – MG

2014

LEONARDO DE PAIVA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA O CONTROLE DE
QUALIDADE DE INOCULANTES PARA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dr^a. Fatima Maria de Souza Moreira

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Barbosa, Leonardo de Paiva.

Avaliação de métodos para controle de qualidade de inoculantes
para soja / Leonardo de Paiva Barbosa. – Lavras : UFLA, 2014.
84 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Nitrogênio - Fixação. 2. Bradyrhizobium. 3. Inoculantes. 4.
Soja. 5. Agricultura. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 589. 90133

LEONARDO DE PAIVA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA O CONTROLE DE
QUALIDADE DE INOCULANTES PARA SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 15 de abril de 2014.

Dr. ^a Fernanda de Carvalho	UFLA
Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Dr. ^a Maria Rita Scotti Muzzi Marques Leitão	UFMG
Dr. Ederson da Conceição Jesus	EMBRAPA

Dr.^a Fatima Maria de Souza Moreira
Orientadora

**LAVRAS - MG
2014**

RESUMO GERAL

O emprego de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN), capazes de estabelecer associação simbiótica com leguminosas, pode suprir as demandas de nitrogênio da cultura, aumentar a produtividade e amenizar os impactos da agricultura no ambiente. No Brasil, o melhor exemplo de fixação biológica de N₂ é a inoculação de BFNN do gênero *Bradyrhizobium* em culturas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Porém, o sucesso da inoculação em leguminosas está associado a um efetivo programa de controle de qualidade. Assim, na primeira parte deste estudo, o objetivo foi testar métodos oficiais estabelecidos pela legislação brasileira e outras técnicas para avaliar a qualidade de inoculantes comerciais para soja que reduzam o tempo e o custo operacional na manipulação das análises. Foram avaliados meios e métodos de contagem de células viáveis e amplitude de erro decorrente do avaliador em 11 inoculantes com diferentes substratos, contendo estirpes aprovadas para soja, registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Todos os inoculantes atenderam aos critérios referentes às concentrações mínimas de unidades formadoras de colônias (UFC) e número máximo de UFC de contaminantes estabelecidos pela legislação. Nossos resultados indicaram que a técnica de microgota apresentou vantagens sobre a técnica por espalhamento nos procedimentos operacionais, no custo experimental e na estimativa de contagem de UFC. O meio de cultura 79 com vermelho Congo ou com azul de bromotimol foi eficaz para contagem de colônias bacterianas. Porém, a adição de vancomicina não inibiu as bactérias contaminantes e não houve diferença nos resultados de contagem de células entre os avaliadores. Na segunda parte desse estudo, o objetivo foi avaliar a eficiência simbiótica de isolados com características culturais distintas das estirpes *B. japonicum* e *B. elkanii* presentes em inoculantes comerciais para soja. A caracterização cultural e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram utilizados na identificação dos isolados. Os isolados e as estirpes recomendadas SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 foram testadas separadamente para a mesma cultivar de soja em condições controladas em casa de vegetação. Os isolados foram caracterizados em grupos culturais distintos. A identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou que alguns isolados não apresentavam similaridade com as estirpes inoculantes na formulação do produto. Não houve perda na capacidade de nodulação dos isolados estudados. Contudo, houve significativa diferença nas características simbióticas entre os isolados, as estirpes inoculantes e os controles sem nodulação. Porém, a presença de variantes morfológicas ou de rizóbios exóticos não influenciou nas características simbióticas dos produtos inoculantes. Os resultados deste estudo disponibilizam informações metodológicas importantes para programas de controle de qualidade.

Palavras chave: *Bradyrhizobium*. Rizóbios. Fixação biológica de nitrogênio. Técnicas de contagem. Inoculantes. Gene 16S rRNA. Agricultura. Soja.

GENERAL ABSTRACT

The use of nodulating N₂-fixing bacteria (NNFB) capable of establishing mutualistic symbiosis with legumes can meet plant N needs in an economic and environmentally sound way. In Brazil, the best example of biological nitrogen fixation (BNF) use is the NNFB inoculation process with the genus *Bradyrhizobium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivation, where, chemical N fertilizer was completely replaced. The success of inoculation in legumes is associated with an effective quality control program. The first part of this study aimed to test the official methods established by Brazilian legislation and other techniques to evaluate the quality of commercial soybean inoculants that purport to reduce the time and cost of performing the analyses. We evaluated the media and techniques for counting viable cells and the error amplitude introduced by analysts of 11 inoculants with different substrates containing strains approved for soybeans registered with the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). All inoculants met the criteria for the minimum levels of colony-forming units (CFU) and the maximum number of contaminant CFU established by legislation. Our results indicate that the microdrop technique was superior to the spreading technique in operating procedure, experimental cost, and estimated CFU count. Culture medium 79 with Congo red or bromothymol blue was effective for counting bacterial colonies. However, bacterial contaminants remained uninhibited after vancomycin addition. There was no difference in the cell counts between analysts, but all materials and procedures were strictly standardized. In the second part, the objective was to evaluate the symbiotic effectiveness of isolates with distinct cultural characteristics of *B. japonicum* strains and *B. elkanii* present in commercial inoculants for soybean. Cultural characterization and partial sequencing of the 16S rRNA gene were used to identify the isolates. The isolates and strains recommended SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA SEMIA 587 and 5019 were tested separately for the same cultivar under controlled conditions in greenhouse. The isolates were characterized in different cultural groups. The identification by sequencing of the 16S rRNA gene showed that some isolates showed no similarity with the inoculants in product formulation. There was no loss in nodulation of the isolates. However, there was significant difference in symbiotic characteristics among isolates, the inoculants and controls without nodulation. However, the presence of morphological variants or exotic rhizobia did not influence the characteristics of the symbiotic inoculant product. The results of this study provide important information for methodological quality control programs.

Keywords: *Bradyrhizobium*, rhizobia, biological nitrogen fixation, counting techniques, inoculants, 16S rRNA gene, agriculture, soybean.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	8
INTRODUÇÃO	8
REFERENCIAL TEÓRICO	10
1. A BIOTECNOLOGIA DA INOCULAÇÃO.....	10
1.1. <i>Bradyrhizobium ssp.</i> E A CULTURA DA SOJA	11
1.2. INOCULANTES COMERCIAIS	12
1.3. FORMULAÇÃO E PRODUÇÃO DE INOCULANTES	14
2. CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES	15
2.1. IMPORTÂNCIA DE UM PROGRAMA DE CONTROLE DE QUALIDADE	15
2.2. PADRÕES PARA QUALIDADE DE INOCULANTES	16
2.2.1 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS	17
2.2.2 MEIOS DE CULTURA.....	18
2.2.3 CARACTERIZAÇÕES CULTURAIS E GENÉTICAS.....	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	27
ARTIGO 1	27
EVALUATING METHODS FOR QUALITY CONTROL OF COMMERCIAL SOYBEAN INOCULANTS	27
ARTIGO 2.....	55
EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE VARIANTES DE ESTIRPES DE <i>Bradyrhizobium spp.</i> EM INOCULANTES COMERCIAIS PARA A SOJA.....	55

PRIMEIRA PARTE

INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por fertilizantes químicos no âmbito mundial, associado com o descompasso na sua oferta, ocasiona a elevação dos preços a níveis cada vez mais inacessíveis, não só aos pequenos e médios, mas também aos grandes produtores. Neste contexto, torna-se de fundamental importância a contribuição dos processos biológicos na agricultura para equilibrar entre os ganhos econômicos e os impactos ambientais globais. A sustentabilidade na agricultura está relacionada com o emprego de produtos biológicos que promovam o aumento da produtividade vegetal, a redução no custo da produção agrícola, na diminuição do uso de combustíveis fósseis e em amenizar a poluição do solo, da água e da atmosfera. No Brasil, a cultura da soja é o melhor exemplo de como um processo biológico pode ser manejado eficientemente. Nessa cultura, ocorre a substituição total de adubos químicos nitrogenados pela inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN).

A seleção de bactérias eficientes associadas ao melhoramento vegetal gerou variedades de soja altamente responsivas a esse processo biológico. A associação simbiótica com BFN do gênero *Bradyrhizobium* é um dos fatores responsáveis pelo sucesso da produtividade da soja. No Brasil, as estirpes aprovadas como inoculantes são capazes de suprir completamente a demanda por N da planta hospedeira. Além disso, essas estirpes apresentam potencial para o ganho de produtividade vegetal, boa competitividade com as comunidades microbianas nativas e adaptação às condições edafoclimáticas do local.

A eficácia da inoculação em leguminosas está relacionada a um eficiente programa de controle de qualidade dos produtos inoculantes. O estabelecimento de parâmetros e métodos de análises é primordial para fiscalização dos produtos. No Brasil, o MAPA em parceria com empresas e instituições de ensino e pesquisa aprovou normas específicas para o controle de qualidade de inoculantes utilizados na agricultura. A comercialização de inoculantes de baixa qualidade pode comprometer e inviabilizar a utilização da tecnologia de inoculação.

Em virtude do aumento acentuado da produção de soja e do êxito da biotecnologia da inoculação, o controle de qualidade desses produtos deve ser realizado com métodos rápidos e eficazes. Além desses, a descrição de características culturais e genéticas das estirpes dos inoculantes pode auxiliar na padronização dos produtos, garantindo sua eficiência simbiótica com a planta hospedeira. Assim, os objetivos deste trabalho foram testar métodos oficiais estabelecidos pela legislação brasileira; propor outras técnicas para avaliar a qualidade de inoculantes comerciais para a soja que reduzissem o tempo e o custo operacional na manipulação das análises e avaliar a eficiência simbiótica de colônias com características

culturais distintas das estirpes *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* presentes nos inoculantes.

REFERENCIAL TEÓRICO

1 A BIOTECNOLOGIA DA INOCULAÇÃO

A produção sustentável de uma cultura agrícola está associada a um manejo adequado de nutrientes no solo. O nitrogênio (N), por exemplo, é essencial para o desenvolvimento vegetal, sendo suas principais fontes a matéria orgânica do solo, os fertilizantes industriais e o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Na FBN, compostos nitrogenados são disponibilizados diretamente para a planta, evitando a sua perda por volatilização, lixiviação e desnitrificação. Assim, a utilização de bactérias fixadoras de N₂ nodulíferas (BFNN), capazes de associarem-se simbioticamente com leguminosas, pode suprir parte ou totalmente as necessidades de nitrogênio de certas plantas.

A fixação biológica de nitrogênio é mediada por várias espécies de procariotos presentes nos solos e na rizosfera, podendo estabelecer relações simbióticas ou associativas com uma variedade de espécies de plantas, contribuindo com sua nutrição nitrogenada (MOREIRA, 2010). Bactérias dos gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rizhobium* e *Sinorhizobium* são agrupadas genericamente como rizóbio, possuindo a capacidade de infectar as raízes de plantas leguminosas e formar pequenas estruturas denominadas de nódulos. A presença do complexo enzimático da nitrogenase nas células de microrganismos fixadores de nitrogênio promove a redução de nitrogênio elementar (N₂) atmosférico em amônia (NH₃) assimilável. A contribuição microbiana de nitrogênio no planeta pode ser de 175 x 10⁶ toneladas, ou seja, 65% do total do nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O isolamento e a caracterização de microrganismos do solo capazes de produzir compostos promotores do crescimento de plantas são importantes para melhorias no uso eficiente de fertilizantes e no aumento de produção. A seleção das estirpes ocorre com base no potencial para o ganho de produtividade vegetal, no grau de competitividade com as comunidades microbianas nativas e na adaptação dessas estirpes às condições edafoclimáticas do local. Caso a estirpe selecionada apresente potencial agrícola, várias medidas devem ser adotadas para sua indicação como inoculante. Inoculantes são biofertilizantes, definidos como produtos ou formulações contendo microrganismos selecionados, que quando aplicados às sementes, na superfície das plantas ou no solo, colonizam a rizosfera ou o interior das raízes, aumentando a disponibilidade de nutrientes primários para a planta hospedeira (VESSEY, 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A tecnologia da inoculação com BFNN em sementes de leguminosas nodulíferas pode aumentar a produtividade, reduzir o custo na produção agrícola,

diminuir o uso de combustíveis fósseis e amenizar a poluição do solo, da água e da atmosfera, contribuindo assim para a sustentabilidade na agricultura.

1.1 *Bradyrhizobium ssp.* E A CULTURA DA SOJA

No Brasil, o exemplo mais bem sucedido de aplicação da tecnologia da inoculação é a utilização de BFNN do gênero *Bradyrhizobium* nas culturas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), em que, graças ao melhoramento da planta e a seleção de bactérias eficientes, a adubação química nitrogenada foi totalmente substituída, havendo uma economia de bilhões de dólares anuais pelos produtores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; FRANCO, 2009).

O gênero *Bradyrhizobium* é caracterizado por bactérias Gram-negativas, com crescimento lento, capazes de alcalinizar o meio 79 com azul de bromotimol (VINCENT, 1970), produzir muco com consistência variada e promover nodulação nas raízes de soja (MOREIRA et al., 1993; NEVES; RUMJANEK, 1997). No país, quatro estirpes são recomendadas para uso como inoculante para soja: *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080). Em uma avaliação morfofisiológica e simbiótica, podemos diferenciar essas espécies principalmente pela consistência do muco (aquoso ou viscoso) (Figura 1), na competitividade de nodulação (KUYKENDALL et al., 1988), eficiência de fixação de N₂ (FUHRMANN, 1990), resistência a antibióticos (KUYKENDALL et al., 1988) e constituição dos exopolissacarídeos (FRAYSSE; COUDERC; POINSOT, 2003).

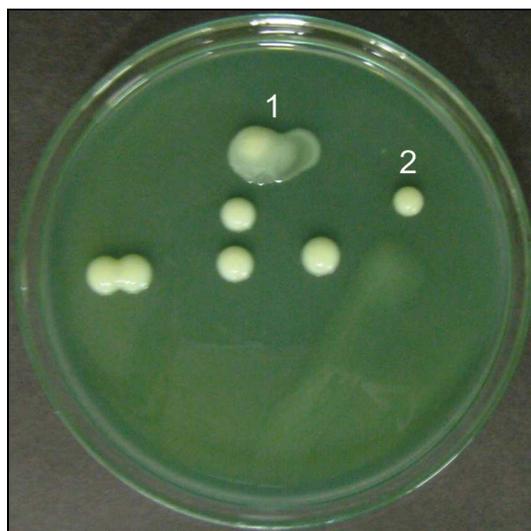


Figura 1 Aspectos culturais das colônias de *B. japonicum* e *B. elkanii* em meio de 79 com azul de bromotimol. Símbolos: 1 – colônia aquosa de *B. elkanii* (SEMIA 587); 2 – colônia viscosa de *B. japonicum* (SEMIA 5079).

A soja foi introduzida no país no final do século 19, porém o seu plantio para fins comerciais ocorreu após a década de 1960 (ALVES et al., 2003). Hoje o país é o maior produtor de soja do mundo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014). Como a soja é uma espécie exótica no Brasil, pesquisas foram necessárias para o desenvolvimento de variedades adaptadas ao solo e ao clima (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003). Embora adaptada a altas latitudes e a clima temperado, a expansão da soja no cerrado brasileiro exemplifica sua boa adaptação a áreas com climas adversos, solos ácidos e álicos, além de uma eficiente associação simbiótica com *Bradyrhizobium spp.* nessas condições.

A expansão da soja no país e o sucesso na simbiose com *Bradyrhizobium* podem estar relacionados com a ampla distribuição dessas bactérias nos solos brasileiros. A predominância do gênero *Bradyrhizobium* como simbiote de leguminosas florestais e herbáceas (forrageiras, grãos e adubação verde) observada nos estudos de Moreira et al. (1993), Moreira e Siqueira (2006), Guimarães et al. (2012), e Rufini et al. (2014) indicam uma grande diversidade de espécies de bactérias nativas em solos tropicais.

1.2 INOCULANTES COMERCIAIS

Programas para selecionar estirpes de rizóbios eficientes e competitivas estão em operação no Brasil desde a década de 1960 (JARDIM-FREIRE; VERNETTI, 1999). Porém, diante da ausência de padrões metodológicos para recomendação de estirpes na agricultura, apenas em 1985 foi criada a “Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse agrícola – RELARE”. Assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em parceria com a RELARE, empresas e instituições de ensino e pesquisa, propôs normas específicas para controlar a qualidade de inoculantes comercializados e utilizados na agricultura (BRASIL, 2011).

Para que uma estirpe bacteriana seja indicada para fins comerciais, como produto inoculante, deve-se realizar uma série de experimentos laboratoriais e em campo antes da sua recomendação. A instrução normativa MAPA nº13, de 25 de março de 2011 (BRASIL, 2011), descreve o protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas inoculantes e tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. No geral, as características desejáveis aos inoculantes são: manter estabilidade genética, produzir efeito sobre a cultura agrícola, competir com populações microbianas indígenas do solo, migrar do substrato do inoculante para a planta hospedeira e persistir em ambientes adversos do solo na ausência do hospedeiro.

Em 2011, no Brasil, foram comercializadas aproximadamente 19 milhões de doses de inoculantes, sendo 99% destinados à soja, dando ao país lugar de destaque como produtor de inoculantes para leguminosas (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES, 2013). Outras leguminosas, como o feijão, amendoim, ervilha, lentilha, forrageiras, arbóreas e gramíneas, como milho, trigo e sorgo também podem receber inoculantes, porém os estudos de ordem econômica não são divulgados.

Estima-se que para produzir 1.000 kg de grãos de soja sejam necessários 83 kg de N. Para uma produtividade média nacional estimada para a safra 2013/14 de 2.966 kg ha⁻¹ (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014), seriam necessários 246 kg ha⁻¹ de N. Como a eficiência de aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados é de 50%, seriam necessários 492 kg ha⁻¹ de N mineral. Assim, a substituição de fertilizantes nitrogenados por inoculantes geraria um expressivo lucro econômico na produção, além de suprir a demanda da cultura por nitrogênio. De acordo com Hungria et al. (2006), as estirpes aprovadas como inoculantes para soja no Brasil são capazes de fixar aproximadamente 300 kg de N ha⁻¹, com eficiência de utilização próxima a 100%. Além disso, o N deixado nos resíduos culturais da soja pode contribuir para as culturas em sucessão, como por exemplo, milho de segunda safra e trigo.

Embora a área para plantio de soja no Brasil tenha estabilizado nos últimos anos (Figura 2), atualmente o país é o maior produtor de soja do mundo. A estimativa é de que a safra 2013/2014 alcance 90 milhões de toneladas, o que representa um incremento de 10,4% em relação à safra 2012/13. De acordo com a Figura 2, a estabilização na área de plantio e na comercialização de doses de inoculantes nos últimos anos, contrasta com o aumento na produção da soja. Esse aumento de produção pode estar relacionado, principalmente, ao uso de tecnologias e manejo recomendado para a cultura da soja.

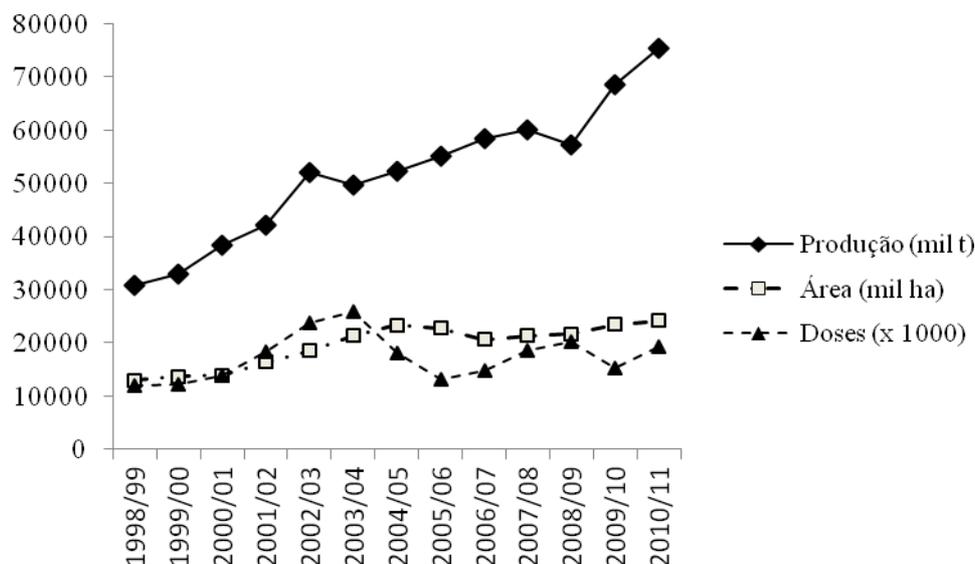


Figura 2 Produção, área com plantio e doses de inoculantes comercializadas para cultura da soja no Brasil entre os anos de 1998 e 2011 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2014; ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES, 2014).

1.3 FORMULAÇÃO E PRODUÇÃO DE INOCULANTES

Após verificar a eficiência e o potencial agrônomo da estirpe, sua utilização na produção comercial como inoculante ocorrerá caso a estirpe desenvolva e sobreviva em substrato artificial (suporte para inoculação) durante o transporte e estocagem, se mantenha viável quando em contato com as sementes e seja compatível com produtos agroquímicos que podem ser aplicados nas sementes (HERRIDGE, 2008). Além disso, os inoculantes devem ser capazes de resistir a vários processos tecnológicos durante a produção e manter suas principais propriedades metabólicas (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Para inoculantes com bactérias, a composição do meio e as condições da cultura (temperatura, agitação e duração) estão diretamente relacionadas à natureza específica da estirpe e ao tipo de inoculante produzido.

Um fator importante para manutenção das propriedades fisiológicas ideais dos inoculantes é a escolha de um substrato apropriado. O substrato é o responsável por manter um alto número de células viáveis e de conduzi-las até o momento da inoculação. Ele providencia um *habitat* temporário no solo, criando microambientes protegidos e suprindo a carência nutricional (ARORA; KHARE; MAHESHWARI, 2011). No estudo de Herridge, Gemell e Hartley (2002), estão listadas várias características de um substrato ideal. No mercado podemos encontrar quatro formas básicas de substratos para inoculantes: substratos secos (pó), turfas, grânulos e líquidos. A turfa e o líquido são os substratos mais comumente utilizados em inoculantes bacterianos. Além de promover todo suporte básico para não comprometer as

características das bactérias no inoculante, o substrato deve ser de fácil manipulação no momento da inoculação. Segundo a Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), os resultados de um questionário aplicado entre agricultores de pequenas, média e grandes empresas revelaram que a maioria dos produtores prefere inoculantes líquidos (61%), os outros 39% dividem-se entre turfoso e a mistura dos dois. Assim, esforços para o aprimoramento de inoculantes líquidos devem ser preferidos devido a sua maior aceitação no mercado.

O aumento na comercialização e na oferta de novos inoculantes têm exigido um aumento na fiscalização dos produtos. Toda essa complexa rede de produção, comercialização e utilização de inoculantes pode ficar comprometida caso não haja um eficiente programa de controle de qualidade.

2 CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES

2.1 IMPORTÂNCIA DE UM PROGRAMA DE CONTROLE DE QUALIDADE

O sucesso na produção de inoculantes de qualidade para leguminosas está relacionado a um eficiente programa de controle. O estabelecimento de parâmetros e métodos de análises que definam os critérios de qualidade dos inoculantes é primordial para fiscalização e padronização dos produtos. Em alguns países, existem programas de controle de qualidade gerenciados por legislação governamental específica (p.e. Argentina, Uruguai, Canadá e França,) ou por organizações voluntárias vinculadas ao governo (p.e. na Austrália, Nova Zelândia e China) ou independentes (p.e. Estados Unidos e Reino Unido) (OLSEN et al., 1994; CATROUX; HARTMANN; REVELLIN, 2001, DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004, HERRIDGE; GEMELL; HARTLEY, 2002, BENINTENDE, 2010).

É importante distinguir qualidade do produto com controle de qualidade. Qualidade do produto está relacionada ao conjunto de normas internas para a produção do inoculante, garantindo que todos os critérios sejam mantidos internamente a cada etapa de produção. Caso contrário, a produção é cancelada. Controle de qualidade propõe parâmetros padronizados adotados por laboratórios independentes para controlar todas as características de comercialização do produto.

A comercialização de inoculantes de baixa qualidade pode comprometer e inviabilizar a aplicabilidade da tecnologia de inoculação. Para que um inoculante comercial seja considerado potencialmente eficiente, ele deve apresentar um número adequado de BFNN no momento da inoculação, ausência ou baixa concentração de microrganismos contaminantes, assegurar uma nodulação eficiente e ser elaborado com substrato adequado para sobrevivência das BFNN (LUPWAYI et al., 2000).

Vários estudos têm revelado a baixa qualidade de inoculantes comercializados em vários países. Os resultados de Olsen et al. (1994) referentes à avaliação de 40 inoculantes comercializados na América do Norte mostraram que em apenas um inoculante a concentração de *Bradyrhizobium* foi superior à concentração de contaminantes. Gomez et al. (1997) avaliaram 18 inoculantes comerciais para soja na Argentina e observaram que 17 estavam contaminados e, em 14, a concentração de contaminantes foi superior à concentração de *B. japonicum*. Um estudo recente por Herrmann e Lesueur (2013) mostrou que entre 65 inoculantes comercializados, apenas 37% dos produtos podiam ser considerados puros e que 63% estavam contaminados com uma ou mais estirpes bacterianas. A qualidade dos inoculantes industriais pode estar relacionada aos processos de produção como o processamento, purificação e composição dos inoculantes (ALBAREDA et al., 2008) e com a elaboração de normas governamentais que definam padrões de qualidade dos inoculantes (OLSEN et al., 1994; HUNGRIA et al., 2005).

1.1. PADRÕES PARA QUALIDADE DE INOCULANTES

Os parâmetros para definir a qualidade de um produto inoculante variam entre os países, não havendo um acordo internacional para padronizar as características de qualidade (LUPWAYI et al., 2000; STEPHENS; RASK, 2000). Os principais parâmetros utilizados para classificar um inoculante são o número de células viáveis de rizóbio que serão inoculadas por semente e o número máximo de contaminantes toleráveis no produto final (DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004). A variação nas técnicas de análise e nas características das estirpes usadas nos produtos dificulta a padronização de medidas de controle de qualidade.

No Brasil, os métodos para avaliar a qualidade dos inoculantes consideram os critérios estabelecidos nas instruções normativas nº 30 de 12 de novembro de 2010 e nº 13 de 24 de março de 2011 do MAPA (BRASIL, 2010; BRASIL, 2011). Dentre outros critérios, essas instruções normativas estabelecem que: os produtos que contenham BFNN para simbiose com leguminosas sejam quantificados pela técnica de contagem em placa por espalhamento em meio de cultura 79 (FRED; WAKSMAN, 1928) e apresente concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mililitro de produto até a data de seu vencimento; o método indireto por número mais provável (NMP) em plantas pode ser empregado para avaliar a concentração de células nos inoculantes; estes devem estar livres de microrganismos contaminantes a partir do fator de diluição 10^{-5} ; no caso da avaliação de produtos que contenham um número elevado de contaminantes, a contagem de UFC pode ser feita em meio 79 acrescido dos antimicrobianos actidione/ciclohexamida, que permite o crescimento de rizóbios e inibe o crescimento de contaminantes. Embora outros estudos e

programas de controle de qualidade também adotem os critérios descritos (KHAVAZI et al., 2007; BRASIL, 2010; PENNA et al., 2011), o emprego de novas técnicas são fundamentais para aprimorar os procedimentos de avaliação de inoculantes comerciais.

2.2.1 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

O número de células viáveis de uma estirpe de interesse no inoculante é o principal parâmetro de qualidade do produto. Os métodos de contagem em placa envolvem a preparação de diluições seriadas em caldo nutritivo ou solução salina, de onde uma alíquota de solução diluída é retirada e, espalhada ou gotejada na superfície do meio de cultura, usualmente, meio 79 (ou Agar Manitol Extrato de Levedura - YMA), e a contagem de UFC é realizada após um período de incubação. Esses métodos são os mais amplamente usados, pois, permite enumerar as células viáveis e os contaminantes dos produtos. Contudo, as limitações da técnica são: subestimar o número de células em placa quando contaminates estão presentes, necessitar de um meio seletivo para distinguir entre as estirpes alvo e os contaminantes, utilizar materiais de consumo padronizados e corpo técnico treinado capaz de reconhecer as características morfofisiológicas da estirpe de interesse (GOMEZ et al., 1997; CATROUX; HARTMANN; REVELLIN, 2001; PENNA et al., 2011).

Os métodos de contagem em placa mais utilizados para quantificar o número de células viáveis são o espalhamento e a microgota. Vários estudos, bem como a instrução normativa brasileira, empregam, principalmente, os procedimentos de contagem em placa por espalhamento na avaliação de qualidade de inoculantes comerciais (OLSEN et al., 1994, LUPWAYI et al., 2000; CATROUX; HARTMANN; REVELLIN, 2001; BRASIL, 2010; PENNA et al., 2011). Porém, o método em microgota permite uma contagem mais rápida e uma maior acurácia na quantificação das colônias. Além disso, requer menos tempo, menor esforço e consumo de material comparado ao método por espalhamento. No entanto, a ausência de parâmetros metodológicos padronizados para a contagem em microgota e a variação nos resultados comparados a outros métodos de contagem podem interferir na adoção dessa técnica pelos programas de controle de qualidade de inoculantes.

Outra técnica de contagem de células viáveis de rizóbios muito empregada em programas de controle de qualidade de inoculantes é a técnica de número mais provável (NMP) em plantas. A estimativa da densidade de células viáveis de BFNN pela técnica NMP em plantas é comumente associada às técnicas de contagem em placa na avaliação da qualidade de inoculantes. Um problema dessa técnica é que ela não apresenta métodos padronizados capazes de reproduzir resultados precisos e de acordo com as outras técnicas de contagem. Embora a técnica de NMP em plantas apresente resultados imprecisos, ela é fundamental aos programas

de controle de qualidade, pois permite avaliar o potencial de infectividade das células de BFNN presente nos inoculantes e o isolamento de estirpes alvo em inoculantes com alta concentração de microrganismos contaminantes.

2.2.2 MEIOS DE CULTURA

A eficácia das técnicas de contagem em placa está associada à elaboração de um meio de cultura apropriado para o crescimento das estirpes de interesse. Na composição dos meios de cultura, a utilização de antibióticos, fungicidas, corantes e indicadores fisiológicos permitem inibir o crescimento de células contaminantes ou distingui-los das estirpes alvo. O desenvolvimento de fungos e bactérias Gram-positivas contaminantes na superfície da placa pode interferir no crescimento de rizóbios, dificultando na avaliação da qualidade do produto (DEAKER; ROUGHLEY; KENNEDY, 2004; LUPWAYI et al., 2000; HERRMANN; LESUEUR, 2013). De acordo com a instrução normativa MAPA nº 30/2010 (BRASIL, 2010), na avaliação de produtos inoculantes formulados com rizóbios que contenham um número elevado de contaminantes, a contagem UFC pode ser feita em meio 79 acrescido de 100 mg L⁻¹ de solução estoque de actidione/ciclohexamida, que permite o crescimento de rizóbios e inibe o crescimento de contaminantes. Outros produtos podem ser usados como inibidores do crescimento de contaminantes. Penna et al. (2011) observaram que a combinação de pentacloronitrobenzeno e vancomicina adicionado ao meio de cultura 79 inibiu o crescimento de fungos e bactérias Gram-positivas e não interferiu no crescimento de *B. japonicum*.

A adição de indicadores ao meio facilita a contagem de colônias bacterianas e/ou identificação de rizóbios nos inoculantes. Desde os estudos de Fred e Waskman (1928), o meio de cultura 79 é usado nos estudos com BFNN e soluções dos corantes azul de bromotimol (0,5%) ou vermelho congo (0,25%) são adicionadas aos meios para avaliar a modificação do pH ou indicação de bactérias contaminantes, respectivamente. Em meio 79 com azul de bromotimol, espécies do gênero *Bradyrhizobium* geralmente apresentam crescimento lento e alcalinizam o pH do meio (mudando sua cor de verde para azul). O vermelho congo é empregado para diferenciar entre colônias de rizóbios e contaminantes. A absorção do corante promove alteração na cor da colônia, sendo este um dos principais aspectos para diferenciar colônias contaminantes (Figura 3). Contudo, alguns trabalhos demonstraram que essa técnica não pode ser usada como uma contra prova na diferenciação de rizóbios e contaminantes. Kneen e Larue (1983) e Zevenhuizen et al. (1986) observaram que, em espécies de *Rhizobium*, as colônias absorveram vermelho congo em meio 79, e houve variação na cor das colônias. Nas mesmas condições, Bloem et al. (2002) estudaram a morfologia de uma cultura de *Sinorhizobium melioli* (estirpe U45) e observaram uma variação entre colônias capazes de absorver o corante (rosa) e

colônias que não absorveram o corante (branca). Para espécies de *B. japonicum* e *B. elkanii* isolados de solos com plantio de soja no cerrado brasileiro (BATISTA et al., 2007), esse fenômeno também foi observado. Para esse gênero, o resultado positivo ou negativo para absorção do corante pode ser substituído pela intensidade de absorção. Colônias de *Bradyrhizobium* que absorvem vermelho congo apresentam uma variação de cor rosa para laranja, não ocorrendo colônias vermelhas intensas (BLOEM et al.; 2002; BOTHA et al., 2004; BATISTA et al., 2007). O mecanismo de ligação do corante ocorre na superfície da célula: a interação com polissacarídeos capsulares (CPS) é fraca, dando à colônia aspecto de cor rosa; com as fibrilas de celulose, é forte, formando colônias com cor vermelha; porém não interage com os exopolissacarídeos extracelulares (EPS) (ZEVENHUIZEN et al., 1986). Dessa forma, diferenças morfológicas em uma mesma estirpe podem ocorrer de acordo com as condições e o tempo de cultivo.

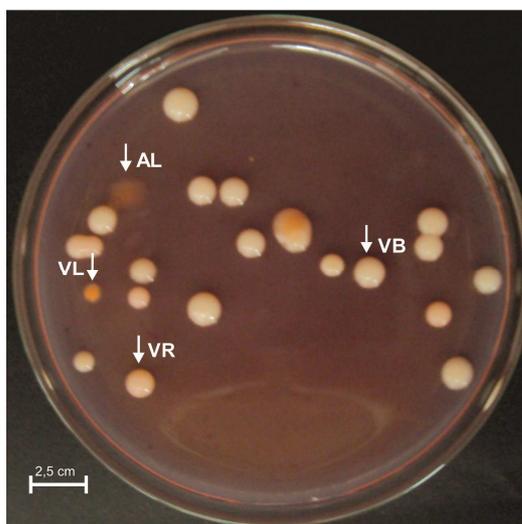


Figura 3 Aspectos culturais de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* em meio 79 com vermelho congo. As setas indicam as variações culturais das colônias inoculantes. Símbolos: AL – aquosa e laranja; VB – viscosa e branca; VR – viscosa e rosa; VL – viscosa e laranja.

2.2.3 CARACTERIZAÇÕES CULTURAIS E GENÉTICAS

Análises morfológicas, fisiológicas e simbióticas são amplamente empregadas na identificação primária de grupos de BFNN. Após as análises morfofisiológicas, testes de nodulação são empregados para identificar a relação simbiótica entre a bactéria e a leguminosa hospedeira. As espécies *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, *B. huanghuaihaiense* e *B. daqingense* são capazes de induzir a formação de nódulos nas raízes de soja (*Glicine max*). A partir da formação dos nódulos são extraídas informações sobre a composição taxonômica das

populações e o grau de especificidade entre estirpes e seus hospedeiros vegetais (MOREIRA, 2010).

A caracterização cultural considera a morfologia da colônia (cor, mucosidade, consistência, diâmetro, transparência, borda e elevação) após 7 dias de crescimento no escuro, a 28 °C, pH 6,8, em meio 79 contendo azul de bromotimol ou vermelho congo (VICENT, 1970). A morfologia das colônias pode sofrer variações com as condições de cultivo e dos solos (BATISTA et al., 2007; FLORENTINO et al., 2010; FERREIRA et al., 2012).

A identificação taxonômica, por técnicas moleculares, de *Bradyrhizobium* isolados dos solos de várias regiões tropicais têm exibido uma alta diversidade genética (MOREIRA; HAUKKA; YOUNG, 1998; LOUREIRO et al., 2007; MELLONI et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2012; RUFINI et al., 2014). O desenvolvimento de técnicas precisas de identificação tem promovido avanços nos estudos filogenéticos e taxonômicos desse gênero. No estudo de Pongsilp e Boonkerd (2007), estão listadas algumas técnicas moleculares para identificação de *Bradyrhizobium* em nível de espécies. Embora essas técnicas sejam ferramentas poderosas, a variação no desenvolvimento e a adaptação metodológica às condições específicas podem inviabilizar seu emprego em programas de controle de qualidade.

O sequenciamento da região 16S rRNA tem sido amplamente usado para definir relações genéticas e caracterizar estirpes ao nível taxonômico de gênero ou, em alguns casos, espécie (WOESE, 1987; YOUNG; HAUKKA, 1996). A análise da sequência desse gene é geralmente mais complexa pelo seu alto grau de conservação, dificultando a diferenciação entre espécies (VAN BERKUM; FUHRMANN, 2000; PERRINEAU et al., 2011). Porém, alguns estudos demonstraram que essa técnica foi capaz de diferenciar taxonomicamente entre *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* (MENNA et al., 2006; BATISTA et al., 2007; GUIMARÃES et al., 2012; RUFINI et al., 2014)

As características fenotípicas e genotípicas de estirpes de *Bradyrhizobium* em condições laboratoriais, além de auxiliar na identificação taxonômica, podem indicar alterações na associação simbiótica com a planta hospedeira. De acordo com a intensidade dessa variação, rizóbios podem perder a capacidade de nodular ou se tornar menos eficientes na fixação de N₂. Alguns estudos têm mostrado que variações naturais na morfologia e no genótipo de colônias de *Bradyrhizobium* podem refletir em alterações nas características simbióticas (FUHRMANN, 1990; MELCHIORRE et al., 2011; TORRES et al., 2012). Experimentos em casa de vegetação indicaram que a variabilidade nas características fenotípicas das estirpes *B. japonicum* ou *B. elkanii* de inoculantes comerciais interferiam na competitividade para formação de nódulos, nodulação e eficiência na fixação de nitrogênio em soja (KOBBER et al., 2004). A identificação por caracterização cultural e genética de variantes de *Bradyrhizobium* com menor eficiência

simbiótica pode auxiliar na seleção, produção e manutenção de estirpes inoculantes pela indústria e por instituições de recomendação e de aprovação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBAREDA, M. et al. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 40, n. 11, p. 2771–2779, Nov. 2008.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, n. 1, p.1–9, May 2003.
- 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**. Berlin: Springer, 2011. p. 97–116.
- ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE PRODUTORES E IMPORTADORES DE INOCULANTES. Disponível em: <www.anpii.org.br/?estatistica/2/>. Acesso em: 20 mar. 2013.
- BATISTA J. S. S. et al. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, n. 2, p. 270–284, Feb. 2007.
- BENINTENDE, S. Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v. 42, n. 2, p. 129–132, Abr./Jun. 2010.
- BLOEM J. F. et al. Colony variation in *Sinorhizobium meliloti* inoculant strain U 45. **Microbiological Research**, Jena, v. 157, n. 4, p. 283–292, 2002.
- BOTHA, W. J. et al. Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809. **Microbiological Research**, Jena, v. 159, n. 3, p. 219–231, 2004.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 13 de 24 de março de 2011. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 58, 25 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=3&data=25/03/2011>>. Acesso em: 13 ago. 2013.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 30 de 12 de novembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 4, 17 nov. 2010. Disponível em: <www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=17/11/2010&jornal=1&pagina=4&totalArquivo=180>. Acesso em: 13 ago. 2013.
- CATROUX, G.; HARTMANN, A.; REVELLIN, C. Trends in rhizobial inoculant production and use. **Plant and Soil**, The Hague, v. 230, n. 1, p. 21–30, Mar. 2001.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: sexto levantamento: volume 1. Brasília: Conab, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_03_12_08_41_24_boletim_graos_marco_2014.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2014.
- DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 8, p. 1275–1288, Aug. 2004.

FERREIRA, P. A. A. et al. Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 12, May 2012.

FLORENTINO, L. A. et al. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 4, p. 1113-1123, jul./ago. 2010.

FRANCO, A. A. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja no Brasil: uma lição para o futuro. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 1, p. 23-24, jan./abr. 2009.

FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 7, p. 1365-1380, Apr. 2003.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928.

FUHRMANN, J. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 1, p. 224-229, Jan. 1990.

GOMEZ, M. et al. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. **Journal of Microbiology**, London, v. 13, n. 2, p. 167-173, 1997.

GUIMARÃES, A. A. et al. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the Western Amazon by using cowpea as the trap plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 8, p. 6726-6733, Sept. 2012.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 44, n. 2, p. 121-129, Mar. 2001.

HERRIDGE, D. F. Inoculation technology for legumes. In: DILWORTH, M. J. et al. (Ed.). **Leguminous nitrogen-fixing symbioses**. Netherlands: Kluwer, 2008. p. 77-115.

HERRIDGE, D. F.; GEMELL, G.; HARTLEY, E. Legume inoculants and quality control. In HERRIDGE, D. (Ed.). **Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam**. Australia: ACIAR, 2002. p. 105-115.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 20, p. 8859-8873, Oct. 2013.

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006.

HUNGRIA, M. et al. Inoculant preparation, production and application. In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (ed.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment**. Netherlands: Springer, 2005. p. 223-253.

JARDIM-FREIRE, J. R.; VERNETTI, F. J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Rio Grande do Sul, v. 5, p. 117-126, 1999.

KHAVAZI, K. et al. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 41, n. 6-7, p. 780-784, Nov. 2007.

KNEEN, B. A.; LARUE, T. A. Congo red absorption by *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n. 1, p. 340-342, Jan. 1983.

KOBER, M. V. et al. Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkani* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1459-1464, set./out. 2004.

KUYKENDALL, L. D. et al. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 358-361, Oct. 1988.

LOUREIRO, M. D. et al. Soybean *Glycine max* (L.) Merrill rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, n. 6, p. 665-674, Aug. 2007.

LUPWAYI N. Z. et al. Inoculant quality and its evaluation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 259-270, Mar. 2000.

MELCHIORRE, M. et al. Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 47, n. 1, p. 81-89, Jan. 2011.

MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, mar./abr. 2006.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MENYAH, M.K.; SATO, K. A proposal for re-evaluating the most probable number procedure for estimating numbers of *Bradyrhizobium* spp. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 23, n. 2, p. 110-112, Aug. 1996.

_____. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: Editora da UFLA, 2008. p. 645-706.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam espécies de Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais**. Lavras: Editora da UFLA, 2010. p. 279-311.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, Mar. 1993.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 889-895, July 1998.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora da UFLA, 2006.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 29, n. 5-6, p. 889-895, May/June 1997.

OLSEN, P. E. et al. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: The need for an increase in standards. **Plant and Soil**, The Hague, v. 161, n. 1, p. 127-134, Apr. 1994.

PENNA, C. et al. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. **AMB Express**, Heidelberg, v. 1, n. 1, p. 1-21, July 2011.

PERRINEAU, M. M. et al. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 34, n. 5, p. 376-384, July 2011.

PONGSILP, N.; BOONKERD, N. Research techniques for estimating phenotypic and genotypic diversity of root- and stem-nodule bacteria. **Suranaree Journal of Science Technology**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 297-308, 2007.

RUFINI, M. et al. Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 50, n. 1, p. 115-122, Jan. 2014.

SCOTT, J. M.; PORTER, F. E. An analysis of the accuracy of the plant infection technique for counting rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Berlin, v. 18, n. 5, p. 355-362, Sept. 1986.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 249-25, Mar. 2000.

TORRES, A. R. et al. Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 1831-1835, Apr. 2012.

VAN BERKUM, P.; FUHRMANN, J. J. Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 6, p. 2165-2172, Nov. 2000.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, Aug. 2003.

VICENT, J. M. **A manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria**. Oxford: International Biological Programme Handbook, 1970.

WILSON, D. O.; TRANG, K. M. Effects of storage temperature and enumeration method on *Rhizobium* spp. numbers in peat inoculants. **Tropical Agricultural**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 233–238, 1980.

WOESE, C. R. Bacteria evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221–271, June 1987.

YOUNG, J. P. W.; HAUKKA, K. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, Cambridge, v. 133, p. 87–94, 1996.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. et al. Congo red absorption and cellulose synthesis by Rhizobiaceae. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 52, n. 5, p. 381–386, 1986.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1EVALUATING METHODS FOR QUALITY CONTROL OF COMMERCIAL SOYBEAN
INOCULANTS**Evaluación de métodos para el control de calidad de inoculantes comerciales para soja****Normas da Revista Argentina de Microbiologia**

Leonardo P. Barbosa^(a,b), Márcia Rufini^(a,c), Paula R.A. Ribeiro^(a,b), Ricardo H. Barbosa^(a), Isaac C. Soares^(a), Bruna M. Freitas^(a) and Fatima M.S. Moreira^{(a,b,c)*}

^(a)Department of Soil Science, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil. CEP 37200-000.

^(b)Graduate Programme in Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. CEP 37200-000.

^(c)Graduate Programme in Soil Science, Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil. CEP 37200-000.

*Corresponding author – Federal University of Lavras, Campus Universitário, Lavras, MG, Brazil. CEP 37200-000, telephone: 55 XX 35 38291254, E-mail address: fmoreira@dcs.ufla.br.

Short title: Evaluation of rhizobia inoculants.

Título abreviado: Evaluación de inoculantes para rizhobia.

Evaluating methods for quality control of commercial soybean inoculants

Abstract

The success of inoculation in legumes is associated with an effective quality control program. Although there is an official control programme of inoculants in Brazil, some operating procedures should be enhanced to clearly define the quality standards of these products. This study aimed to test the official methods established by Brazilian legislation and other techniques to evaluate the quality of commercial soybean inoculants that purport to reduce the time and cost of performing the analyses. We evaluated the media and techniques for counting viable cells and the error amplitude introduced by analysts of 11 inoculants with different substrates containing strains approved for soybeans registered with the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). All inoculants met the criteria for the minimum levels of colony-forming units (CFU) and the maximum number of contaminant CFU established by legislation. Our results indicate that the microdrop technique was superior to the spreading technique in operating procedure, experimental cost, and estimated CFU count. Culture medium 79 with Congo red or bromothymol blue was effective for counting bacterial colonies. However, bacterial contaminants remained uninhibited after vancomycin addition. There was no difference in the cell counts between analysts, but all materials and procedures were strictly standardized. The methods showed here may also be useful for experiments where CFU count is considered an evaluation criterion.

Keywords - *Bradyrhizobium*, biological nitrogen fixation, counting techniques, antimicrobial products, agriculture.

Evaluación de métodos para el control de calidad de inoculantes comerciales para soja

Resumen

El éxito de la inoculación en leguminosas se asocia con un efectivo programa de control de calidad. Aunque existe un programa oficial en Brasil, algunos de los procedimientos de operación deben ser mejorados para definir con claridad los estándares de calidad de estos productos. El objetivo de este estudio fue poner a prueba los métodos oficiales establecidos por la legislación brasileña y otras técnicas para evaluar la calidad de los inoculantes comerciales para soja que pretenden reducir el tiempo y los costos de los análisis. Fueron evaluado medios y técnicas para el conteo de células viables y la amplitud del error derivado de los analistas en 11 inoculantes que contenían cepas aprobadas para soja, registradas en el Ministerio de la Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) de Brasil. Todos los inoculantes cumplieron los criterios acerca de la concentración de rizobios viables y la presencia de contaminantes. La técnica de microgota fue superior a la técnica de difusión en el procedimiento de operación, costo experimental y recuento estimado de UFC. El medio de cultivo 79 con azul de bromotimol o rojo Congo fue eficaz para el recuento de colonias. Sin embargo, la adición de vancomicina no fue eficiente para inhibir el crecimiento de los contaminantes. No hubo diferencias en los recuentos de células entre los analistas, pero los materiales y procedimientos fueron estrictamente estandarizados. Los métodos descritos en ese estudio podrían ser empleados por programas de control de calidad de inoculantes comerciales para soja.

Palabras clave - *Bradyrhizobium*, fijación biológica de nitrógeno, técnicas de conteo, productos antimicrobianos, agricultura.

Introduction

The productive potential of a plant culture or even of a natural ecosystem is associated with soil nutrient availability and cycling. Nitrogen (N) is essential for plant development, and soil organic matter, industrial fertilizers, and biological N fixation (BNF) are its main sources. Soil N reserves are limited, and N fertilizers, aside from their high cost and low efficiency, can be harmful to the environment when applied in excess or mismanaged. Thus, the use of nodulating N₂-fixing bacteria (NNFB) capable of establishing mutualistic symbiosis with legumes can meet plant N needs in an economic and environmentally sound way²². Inoculation technology using NNFB in legume seeds can increase plant yield, reduce agricultural production cost and fossil fuel use, and mitigate pollution of the soil, water, and atmosphere, thus contributing to more sustainable agricultural practices.

In Brazil, the best example of BNF use is the NNFB inoculation process with the genus *Bradyrhizobium* in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) cultivation, where, as a result of the joint improvement of both the plant and bacteria, chemical N fertilizer was completely replaced and billions of dollars are saved annually^{13,27,30}.

An inoculant is a product containing bacteria selected to promote plant growth by increasing the nutrient supply or availability. Strains are selected based on their potential for increased plant yield, degree of competitiveness with native microbial communities, and adaptability to local climatic conditions^{5,34}. According to the National Association of Inoculant Producers and Importers (Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes – ANPII²), more than 19 million doses of inoculant products were sold in Brazil in 2011, with 99% destined for soybean cultivation. Most producers prefer liquid inoculants (61%), with the remaining 39% divided between peat (19%) and a mixture of both (19%). Legislation regarding the sale of agricultural inoculants and combinations of microbes authorized for use in producing inoculants in Brazil are under the responsibility of the Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA).

The success of inoculation in legumes is related to effective quality control programs. Quality controls are performed by independent laboratories that evaluate whether the products ready to be sold to meet quality standards³². It is essential to establish parameters and analytical methods to evaluate inoculant quality for monitoring products. In Brazil, the MAPA, in partnership with companies and educational and research institutions, has adopted specific standards for quality control of agricultural inoculants⁸. Selling low-quality inoculants can compromise and derail the use of inoculation technology. For an inoculant to be considered potentially effective, it must contain an adequate NNFB number ($\geq 10^9$ colony-forming units CFU/g or /ml) at the time of inoculation, have no or a low concentration of contaminating microorganisms (free in dilution factor $\geq 1.0 \times 10^{-5}$), ensure effective nodulation, and be prepared with a substrate adequate for NNFB survival⁷, criteria similar to those adopted in other countries^{10,19}.

As a result of the sharp increase in soybean production and the success of inoculation biotechnology, quality control of inoculants should be intensified with fast and efficient methods. This study aimed to test official methods established by Brazilian legislation and other techniques to evaluate the quality of commercial soybean inoculants that reduce the time and cost of performing the analyses. To this end, we evaluated the following: different culture media for counting and characterizing colonies of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* in soybean inoculants; experimental errors resulting from the handling, pipetting, and counting of colonies by different analysts; CFU counting on solid media (in Petri dishes) using spreading or microdrop techniques; and the indirect counting method of nodulation in plants.

Materials and methods

The criteria established in normative instructions n.º 30 from November 12, 2010 and n.º 13 from March 24, 2011 of the MAPA^{7,8} followed for the methods of evaluating inoculant quality, with some modifications specified below. Among other criteria, the normative instructions established that the products containing NNFB for symbiosis with legumes are to be

quantified by CFU counting on Petri dishes using the spreading technique in culture medium 79 and to contain a minimum concentration of 1.0×10^9 CFU/ml or /g of product until the expiration date. The indirect counting method by the most probable number (MPN) in plants also may be used to evaluate cell concentration in the inoculants. Inoculants should be free of contaminant microorganisms starting at the dilution factor of 10^{-5} , and in the case of evaluating products containing an elevated number of contaminants, the CFU may be counted in medium 79 plus actidione/cycloheximide antimicrobials, which allows rhizobial growth and inhibits contaminant growth. However, these normative instructions do not officially adopt solid medium (in Petri dish) counting using the microdrop technique and pentachloronitrobenzene (PCNB) and vancomycin (VAN) antimicrobials in evaluating quality parameters.

Origin of the inoculants evaluated

Among the inoculants evaluated, two inoculants were directly acquired from the manufacturer, and nine were acquired from local businesses. Products from six companies were evaluated, three from Brazil and three from Argentina, two of which per manufacturer were from the same batch, except for the one manufacturer that only had one product evaluated. In total, eight liquid and three peat inoculants were evaluated, of which one liquid inoculant had peat incorporated. Of these, nine inoculants consisted of *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 and SEMIA 5080) alone, and two inoculants consisted of *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) and *B. japonicum* (SEMIA 5079). The specifications in the product packaging were in accordance with the MAPA standards⁸.

All of the products evaluated were in sealed packages and within the expiration date. The inoculants were stored under proper lighting and temperature conditions according to the manufacturer's specifications. Analyses were performed within at most 30 days from the expiration date indicated on the product packaging.

Composition of culture media

The culture medium yeast extract mannitol agar (medium 79)¹⁴ was used for viable cell counting and characterization of the *B. japonicum* and *B. elkanii* colonies in the inoculants. A solution of bromothymol blue (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) (0.5%) or Congo red (Sigma, St. Louis, USA) (0.25%) was added to the culture medium to evaluate the change in pH or the presence of contaminant bacteria, respectively. To analyze the *Bradyrhizobium* cells without interference from contaminants, 40 mg/L of PCNB (Sigma, St. Louis, USA) and 1.0 mg/L of VAN (Sigma, St. Louis, USA) antimicrobials were added to the culture medium after sterilization by filtration with a 0.2 µm membrane (Millipore, São Paulo, Brazil) according to Penna *et al.*²⁹ and to SDA/MAPA normative instruction no. 30⁷.

Counts were performed on Petri dishes using the spreading and microdrop techniques in medium 79 for four different compositions: 1) medium 79 containing bromothymol blue; 2) modified medium 79 containing bromothymol blue plus VAN (1.0 mg/L) and PCNB (40 mg/L) to inhibit contaminant growth; 3) medium 79 containing Congo red; and 4) modified medium 79 containing Congo red plus VAN (1.0 mg/L) and PCNB (40 mg/L) to inhibit contaminant growth.

Standardization of methods for CFU counting on Petri dishes

To minimize the error associated with handling, pipetting, and CFU counting, the consumable material and equipment used in the evaluations had the same features and specifications, and whenever appropriate, all were in accordance with the manufacturer's recommendations. The procedures for sample handling and counting were performed at the same time by the analysts using standard glassware and consumable material. To maintain the accuracy and precision of pipetting volume during the analysis, each analyst used automatic calibrated micro-volume pipettes (Gilson, Middleton, USA) and disposable tips (Axygen Scientific, Union city, USA). All analyses were performed on the premises at the laboratory of Biology, Microbiology, and Soil Biological Processes, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras - UFLA).

Three samples were taken from each of the 11 products evaluated, with special attention paid to aseptic conditions during manipulation. Each sample was evaluated by an independent analyst, totaling three analysts per product.

CFU counting using the spreading technique

For peat inoculants, 10 g of inoculant was weighed under laminar flow and added to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 90 ml of saline solution (0.85% NaCl). Next, the suspension was homogenized in a table agitator (Tecnal, Piracicaba, Brazil) at 110 r.p.m for 20 min, forming the 10^{-1} dilution. Next, a 1.0 ml aliquot was transferred to a test tube containing 9.0 ml of saline, forming a 10^{-2} dilution, and so on, up to a 10^{-9} dilution. Test tubes were vortexed (LabScience, Belo Horizonte, Brasil) for 30 s at each 1.0 ml aliquot transferring step.

For liquid inoculants, the packages were manually homogenized, and a 1.0 ml aliquot was aseptically withdrawn and transferred to a test tube containing 9.0 ml of saline to form the 10^{-1} dilution. The next steps were the same as described for peat inoculants until obtaining the 10^{-9} dilution.

For liquid inoculants with peat incorporated, a 10 ml aliquot from each sample was taken under laminar flow and added to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 90 ml of saline. Next, the same steps were performed as described for peat inoculants until obtaining the 10^{-9} dilution.

After the serial decimal dilutions, 100 μ l aliquots of the solutions were inoculated on the culture medium surfaces in Petri dishes. The inoculations began in a 10^{-4} dilution, in duplicate for each dilution, totaling 48 Petri dishes per analyst and inoculant. Next, the aliquots were uniformly distributed over the culture medium surfaces in Petri dishes and spread with a glass triangular spreading rod (Drigalski spatula) until totally absorbed by the medium. Then, they were incubated inverted in an oven at 28 °C. Test tubes were vortexed for 30 s before each aliquot inoculating step.

Bradyrhizobium CFU counting and contaminant microorganism observation were performed daily starting from the date of inoculation. The evaluations occurred during a 10 day period starting at the appearance of the first colonies. Our choice of this period took into account the growth rate of *Bradyrhizobium* strains present in the inoculants evaluated.

For CFU counting, the dilution with a mean of two Petri dishes between 30 and 300 colonies was used. The number of bacteria was calculated from the following formula:

$$\text{Number of cells/gram or milliliter of inoculant} = f \times n,$$

where f = dilution factor and n = mean number of colonies on the two Petri dishes in the selected dilution. The dilution factor was given by the reciprocal of the dilution in the Petri dish (i.e., 10^{-6} dilution, thus 10^6) multiplied by 10 because we inoculated 100 μl . Thus, it is cited as $f = 10^7$ in the example.

CFU counting using the microdrop technique²⁶

To perform the serial decimal dilutions, the same procedures described for the spreading counting technique were performed. After performing the serial decimal dilutions, starting at the 10^{-4} dilution, 20 μl aliquots of the solutions were inoculated on the culture medium surfaces in Petri dishes and incubated inverted in an oven at 28 °C after the volume inoculated was absorbed by the medium. Three dilutions and three replicates per dilution were inoculated on each Petri dish, totaling eight Petri dishes per analyst and inoculant. Before each aliquot inoculation step, the test tubes were vortexed for 30 s.

Bradyrhizobium CFU counting and observation of contaminant microorganisms were performed as described for the spreading technique. For CFU counting, the dilution with a mean between 3 and 30 colonies in three replicates on Petri dishes was used. The number of bacteria was calculated from the following formula:

$$\text{Number of cells/gram or milliliter of inoculant} = f \times n,$$

where f = dilution factor and n = mean number of colonies from three replicates on Petri dishes in the selected dilution. Any replicate that exhibited 50% discrepancy from the mean of the

other two replicates was disregarded when calculating the mean. The dilution factor was given by the reciprocal of the dilution on the Petri dish multiplied by 50 because we inoculated 20 μ l.

The procedures for counting by the spreading and microdrop techniques were performed simultaneously.

NNFB cell count by the indirect method of nodulation in soybean plants

Indirect counting by the most probable number (MPN) was determined by the bacterial infection technique in plant roots and nodule formation. The test plant species used in the experiments was *Glycine max* (cv. COODETEC 5G 830 RR). The soybean seeds were immersed in alcohol for 30 s, the surface sterilized with sodium hypochlorite solution (2-3%) (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) for two min and washed six times with sterile distilled water. The seeds were pre-germinated in Petri dishes with cotton and moistened sterile filter paper and incubated at 28 °C for two days. After germination, the seedlings were transferred to long-neck glass flasks (500 ml) filled with 450 ml of sterile nutrient solution¹⁶ with low N concentration (5.25 mg/L). Strips of filter paper were used as support for the development of soybean plant roots inside the glass flasks¹². The serial dilutions were performed as described for Petri dish counting, and there were three replicates per dilution for each product evaluated. In all of the experiments, positive controls for nodulation were used, with the *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019 or SEMIA 587) and *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 or SEMIA 5080) strains approved for soybeans by the MAPA⁸. To test for contamination, we used a non-inoculated negative control containing the same nutrient solution used in the treatments with plants inoculated with the suspended inoculants. The inoculated flasks were kept in a greenhouse for 30 days under optimal temperature, light, and moisture conditions. After the 30th day, the roots of the plants were evaluated for the presence and absence of nodules. The estimated number of *Bradyrhizobium* cells by the MPN in plants was calculated according to normative instruction no. 30⁷.

Statistical analyses

The CFU count on Petri dishes was transformed to \log_{10} (number of cells), subject to the assumptions of normal distribution of residues and homoscedasticity. Data from the CFU counts were evaluated by analysis of variance (ANOVA) using the SISVAR program version 4.3¹¹, with the difference among treatments determined by one-factor ANOVA and the *post hoc* effect of the treatments evaluated by the Scott-Knott test at 5% significance. To assess the statistical independence between the categorical variables ("cell number" and "counting technique"), Fisher's exact test was used, and the effect of the treatments was evaluated at 5% significance.

Results

The inoculants containing soybean NNFB exhibited adequate results for the minimum number of CFU per milliliter or gram of product (Fig. 1). Among the 11 inoculants evaluated using the spreading counting technique, 82% exhibited a *Bradyrhizobium* concentration equal to or greater than 8.0×10^8 CFU/ml or /g of product (Fig. 1a), a value corresponding to the minimum acceptable limit of 20% (compared to 1.0×10^9 CFU/ ml or /g) proposed in the legislation. Under these conditions, products C and D exhibited *Bradyrhizobium* levels below the recommended minimum. However, when the inoculants were evaluated using the microdrop counting technique, all of the products exhibited higher cell concentrations than the minimum values specified in the legislation (Fig. 1b).

The physical nature of the substrate for making the products did not interfere with inoculant quality (Fig. 1). Some products made in liquid substrate exhibited higher viable cell concentrations than described on the packaging labels (inoculants A, B, F, G, and H), whereas others exhibited lower cell numbers than indicated by the manufacturer (inoculants C and D). For peat products (inoculants I, J, and K), the mean CFU number was higher than 8.0×10^8 cells/g of inoculant (in accordance with legislation) but lower than 5.0×10^9 cells/g, as described on the product labels. Furthermore, the CFU number found varied according to inoculant manufacturer origin.

The composition of the culture medium for counting on Petri dishes did not interfere with the CFU number of *Bradyrhizobium* in the inoculants (Table 1). For the same counting technique and product, the viable cell concentration was similar ($p > 0.05$) in culture medium 79 and in culture medium 79 with antimicrobials and with either bromothymol blue or Congo red (Table 1).

Evaluation by counting with culture medium 79 with Congo red facilitated the differentiation of contaminant colonies and *Bradyrhizobium* colonies on the surface of Petri dishes in dilution factors less than 10^{-5} . Under these conditions, the colonies able to completely absorb Congo red and with morphological traits distinct from *B. japonicum* and *B. elkanii* grew, even when VAN was added to the culture medium. The culture media with bromothymol blue were alkalized, and inoculant and contaminant strain colonies were differentiated by morphological traits. The media with bromothymol blue plus VAN did not inhibit contaminant growth. In one peat inoculant, growth of actinobacteria colonies in dilutions of 10^{-4} was observed in all culture media. It was not possible to evaluate the antimicrobial effect of PCNB on inhibiting fungal growth due to the absence of these microorganisms under the conditions studied.

The purity characteristics of the inoculants were within the parameters recommended for product quality, i.e., there was no growth of contaminant microorganisms in Petri dishes with culture medium 79 with bromothymol blue or Congo red at dilutions higher than 10^{-5} , which were used for *Bradyrhizobium* CFU counting.

The methods for counting *Bradyrhizobium* on Petri dishes established by normative instruction no. 30⁷ and by the methods evaluated in this study showed similar results between the three independent analysts. The number of cells on Petri dishes quantified by the analysts did not exhibit significant variation ($p > 0.05$) for the same method, culture medium, counting technique, and inoculant product (Table 2).

The techniques for *Bradyrhizobium* CFU counting on Petri dishes interfered with the final number of bacterial cells per milliliter or gram of product evaluated (Table 1). Counting using the spreading technique exhibited similar data ($p > 0.05$) for the different culture media evaluated with the same product. This pattern was also observed for the microdrop counting technique data. However, the counting data differed significantly ($p < 0.05$) between the spreading and microdrop techniques in evaluating the same products. Fisher's exact test was applied to test the relationship between cell number and counting technique. When the viable cell numbers (CFU/ml or /g) were categorized, there was statistical dependence (Fisher's test, $p < 0.05$) regarding the Petri dish counting technique (microdrop or spreading) (Table 3). Under the 44 conditions studied, the cell number by the microdrop technique was higher than 1.0×10^9 CFU/ml or /g in 43 conditions. This same cell number was observed under 32 conditions evaluated using the spreading technique.

The mean number of cells in all of the inoculants evaluated using the Petri dish counting techniques (microdrop and spreading) were compared to the cell numbers specified on the inoculant packaging labels. There was no significant difference ($p > 0.05$) between samples in the mean number of cells quantified using the microdrop technique and the number of cells described on product packaging. For the mean count values using spreading technique, the mean cell number quantified was lower ($p < 0.05$) than that specified by the manufacturer.

The viable cell concentration in the inoculants was also evaluated by the MPN method in plants. There was nodulation until the last dilution, so we inferred that the number of infective rhizobia was $\geq 1.0 \times 10^{10}$ cells/ml or /g of inoculant in all of the samples. The plants inoculated with commercial inoculants exhibited an intense green color similar to the positive controls, tested separately in pure culture. The control without inoculation and with low applied mineral N concentration exhibited yellowish leaves and less growth than the other treatments.

Discussion

The commercial inoculants evaluated in this study exhibited biological traits adequate for Brazilian legislation and also met the quality standards of other countries (Australia, Argentina, Canada, England, Uruguay). In general, the inoculants evaluated exhibited a *Bradyrhizobium* viable cell concentration higher than 8.0×10^8 CFU/ml or /g, and 88% of the products had a cell concentration higher than 1.0×10^9 CFU/ml or /g. Thus, at inoculation, the number of *B. japonicum* and *B. elkanii* varied from 3.2×10^5 to 7.0×10^6 cells per soybean seed. These results contrast with some studies that predicted a pessimistic scenario for selling and using agricultural inoculants^{9,10,24}. The results of Gomez *et al.*¹⁵ from the evaluation of 18 commercial soybean inoculants in Argentina showed that 17 were contaminated and that the contaminant concentration was higher than the *B. japonicum* concentration in 14 inoculants. In the study by Herrmann *et al.*¹⁸, of the 65 commercial biofertilizer evaluated, 37% of the products could be considered as “pure” and 63% were contaminated. However, in the study by Benintente⁴ showed that among 128 analyzed products, 76% were above the minimum concentration recommended for NNFB (1.0×10^8 CFU/ml or /g), and the contaminant concentration was higher than the NNFB concentration in 30%. The improved quality of the industrial inoculants produced is certainly related to improved techniques for inoculant processing, purification, and composition^{1,3,33} and to the development of government regulations that define inoculant quality standards^{28,7,8}.

The effectiveness of the Petri dish counting techniques was associated with the development of a culture medium adequate for the growth of strains of interest. Evaluation by counting with culture medium 79 with Congo red facilitated the differentiation of contaminant colonies from *Bradyrhizobium* colonies on the surface of the Petri dishes in dilution factors less than 10^{-5} . Specifically for the *Bradyrhizobium* strains of the inoculants in question, which do not absorb the dye, the appearance of reddish colonies was indicative of contamination. It is commonly accepted that the rhizobial colonies weakly absorb the indicator, while contaminants absorb it more strongly⁶. In the case of the strains present in the soybean inoculants that do not

absorb this indicator, this convention can be applied. However, this characteristic should be tested beforehand in other *Rhizobium* strains because it does not occur in all strains of this group and contaminant strains that do not absorb Congo red also exist^{20,35}. For the culture media with bromothymol blue, there were alkalization, and the inoculant and contaminant strain colonies were differentiated by morphological traits.

Adding antibiotics to the culture medium for *Bradyrhizobium* growth facilitates the evaluation of inoculant quality because they inhibit the growth of fungal and Gram-positive bacteria contaminants on the surface of the Petri dish^{10,18,24}. In this study, the purity characteristics of the inoculants were within the recommended quality parameters. Thus, it was not possible to verify the advantages of using antimicrobials in inhibiting contaminants that may negatively affect the inoculant CFU count. However, adding 1.0 mg/L of VAN did not inhibit the growth of contaminant colonies in dilutions less than 10^{-5} . The contaminants were most likely Gram-negative or the VAN was not within the minimum inhibitory concentration for these bacteria, although the concentration recommended in the scientific literature was used²⁹. The presence of actinobacteria colonies in dilutions of 10^{-4} in all culture media when a peat inoculant was evaluated contradicted the results of Louvrier *et al.*²³, who observed that adding PCNB to the culture medium inhibited actinobacteria growth.

The *Bradyrhizobium* counting on Petri dishes by independent analysts did not interfere with the final number of cells. The viable cell count of the 11 inoculants evaluated by the three independent analysts exhibited no significant variation ($p > 0.05$) within the same product and Petri dish counting technique. Thus, the success of a quality control program is also related to hiring a qualified technical staff and standardizing methods. The Petri dish counting techniques described in this study showed significant reproducibility and may be used as tools to aid in operational procedures to standardize inoculant quality evaluation.

Although the concentrations of cells in inoculants were in accordance with standards established by legislation, there was significant variation in the concentration of cells and

counting techniques. In microdrop counting, the number of cells was $\geq 1.0 \times 10^9$ CFU/ml or /g of inoculant in 98% of the Petri dishes, in comparison to 73% for the spreading technique. The difference in the concentration of cells between the Petri dish counting techniques cannot be explained by the volume of plated inoculant (20 μ l in the microdrop technique and 100 μ l in the spreading technique). The area occupied by CFU on the Petri dish surface can vary according to the inoculated volume, influencing the final count of the number of colonies and thus the accuracy of the techniques. According to Herigstad *et al.*¹⁷, in the microdrop technique, 10 drops with a volume of 10 μ l/drop of inoculant occupied an area equivalent to 10 cm^2 on the surface of the Petri dish, and in the spreading technique, the volume occupied an area of 64 cm^2 . Thus, the smaller area would imply less dispersion of cells and, consequently, underestimation of the CFU number, which was not the case in our study, where the distribution of the samples into smaller droplets allowed for higher accuracy in counting the colonies.

Therefore, the absence of standardized methodological parameters for counting using the microdrop technique and the variation in the results compared to the other counting techniques could interfere with the adoption of this technique by inoculant quality programs. Other studies, as well as the Brazilian normative instructions, employ the spreading counting technique for evaluating inoculant quality^{7,21,29}. In this study, counting using the microdrop technique more closely approximated the concentration of cells of *Bradyrhizobium* specified on the inoculant packaging label. Furthermore, the microdrop counting technique required less time to evaluate the samples and used less consumable material (glassware and reagents). To evaluate the inoculants using the spreading technique, 12 Petri dishes were used (for analysis of one packet of inoculant per analyst for each culture medium) with a mean volume of 240 ml of culture medium. For the microdrop technique, two Petri dishes were used (for analysis of one packet of inoculant per analyst for each culture medium) with a mean volume of 40 ml of culture medium. This translated to a reduction of approximately 83% in the consumption of Petri dishes and culture medium when the microdrop technique was used.

The estimated density of viable NNFB using the MPN technique in plants is usually associated with Petri dish counting techniques in evaluating inoculant quality. The MPN technique in plants does not have standardized methods capable of reproducing results that are accurate and in accordance with the other counting techniques. Scott and Porter³¹ observed that increasing the incubation period of the inoculant dilutions before plant inoculation resulted in increased counts of 37-97% using the MPN technique in plants compared to counts detected by Petri dish counting. Menyah and Sato²⁵ highlighted an increase in the period between inoculation and nodulation as responsible for the variation in the estimate of the MPN for *B. japonicum*. To avoid these problems, we inoculated the plants immediately after preparing the suspensions and evaluated the presence of nodules 30 days after inoculation. Although the MPN technique in plants is laborious, it is useful for not only detecting infective rhizobial cells but also for confirming their symbiotic efficiency, which is essential to promote plant growth in the case of inoculants.

The methods used in the present study may be considered how evaluation criterions in programme of inoculant control quality. It was observed that the use of culture medium 79 with Congo red or bromothymol blue was effective in CFU counting and the use of the antimicrobials PCNB and VAN does not interfered with the growth of *Bradyrhizobium* colonies in Petri dishes. The use of consumable material and standard equipment, calibrated pipettes, and trained technical staff minimized handling errors and promoted efficient reproducibility of the analyses. Furthermore, Petri dish counting using the microdrop technique was advantageous over the spreading technique because of reduced experimentation, evaluation, and counting times; reduced material consumption (reagents and glassware); accuracy similar to the spreading technique; less difficulty in counting the number of colonies; and a similar number of cells counted to that described by inoculant manufacturers. However, the method of most probable number in plant not reproduced results that were in accordance with the microdrop and

spreading technique, but this method allowed observing infective rhizobial cells and confirmed their symbiotic efficiency.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The financial support for this work provided by CNPq/MAPA (578635/2008-9) is gratefully appreciated. CNPq and CAPES for grants to graduate students and CNPq of productivity in research of F.M.S Moreira.

References

1. Albareda M, Rodriguez-Navarro DN, Camacho M, Temprano, FJ. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. *Soil Biol Biochem.* 2008; 40: 2771–2779.
2. ANPII. Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes. Available in: www.anpii.org.br/?estatistica/2/. Access in: march, 20, 2013.
3. Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil.* 2013; 1-33
4. Benitende S. Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. *Rev Arg Microbiol.* 2010; 42: 129–132.
5. Bogino P, Banchio E, Bonfiglio C, Giordano W. Competitiveness of a *Bradyrhizobium* sp. strain in soils containing indigenous rhizobia. *Curr Microbiol.* 2008; 56:66–72.
6. Botha WJ, Jaftha JB, Bloem JF, Habig JH, Law IJ. Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809. *Microbiol Res.* 2004; 159: 219–231.
7. Brasil. Instrução Normativa n.º 30 de 12 de novembro de 2010. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n.º 4 de 17 de novembro de 2010. Available in: www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=17/11/2010&jornal=1&pagina=4&totalArquivos=180.
8. Brasil. Instrução Normativa n.º 13 de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n.º 58 de 25 de março de 2011. Available in: <http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=3&data=25/03/2011>.
9. Bullard GK, Roughley RJ, Pulsford DJ. The legume inoculant industry and inoculant quality control in Australia: 1953-2003. *Aust J Exp Agr.* 2005; 45(3): 127-140.

10. Deaker R, Roughley RJ, Kennedy IR. Legume seed inoculation technology - a review. *Soil Biol Biochem.* 2004; 36: 1275-1288.
11. Ferreira DF. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Cien Agrotecnol.* 2011; 35(6): 1039–1042.
12. Florentino LA, Guimarães AP, Rufini M, Silva KB, Moreira FMS. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci Agric.* 2009; 66(5): 667–676.
13. Franco AA. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja no Brasil: uma lição para o futuro. *Bol Soc Bras Cien Sol.* 2009; 34(1): 23-24.
14. Fred EB, Waksman SA. *Laboratory Manual of General Microbiology.* New York, McGraw-Hill Book, 1928.
15. Gomez M, Silva N, Hartmann A, Sagardoy M, Catroux G. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World J Microbiol Biotechnol.* 1997; 13: 167–173.
16. Guimarães AA, Jaramillo PMD, Nóbrega RSA, Florentino LA, Silva KB, Moreira FMS. Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from soils under agriculture use in the Western Amazon using cowpea as the trap plant. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(18): 6726-6733.
17. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods.* 2001; 44(2): 121–129.
18. Herrmann L, Lesueur D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 15: 1-15.
19. Hungria M, Loureiro MF, Mendes IC, Campo RJ, Graham, PH. Inoculant preparation, production and application. En: Werner D, Newton WE, editors. *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment.* Dordrecht, Springer, 2005, p. 223-253.

20. Kalita M, Malek W. Phenotypic and genomic characteristics of rhizobia isolated from *Genista tinctoria* root nodules. *System Appl Microbiol.* 2004; 27: 707–715.
21. Khavazi K, Rejali F, Seguin P, Miransari M. Effects of carrier, sterilisation method, and incubation on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L.) inoculants. *Enzyme Microb Technol.* 2007; 41: 780-784.
22. Lindstrom K, Murwira M, Willems A, Altier N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol.* 2010; 161: 453-463.
23. Louvrier P, Laguerre G, Amarger N. Semiselective medium for isolation of *Rhizobium leguminosarum* from soils. *Soil Biol Biochem.* 1995; 27(7): 919–924.
24. Lupwayi NZ, Clayton GW, Rice WA. Rhizobial Inoculants for Legume Crops. *J Crop Improv.* 2006; 15(2): 289-321.
25. Menyah MK, Sato K. A proposal for re-evaluating the most probable number procedure for estimating numbers of *Bradyrhizobium spp.* *Biol Fertil Soils.* 1996; 23(2): 110–112.
26. Miles AA, Misra SS. The estimations of the bacteriocidal power of the blood. *J Hyg.* 1938; 38: 732–749.
27. Moreira FMS, Siqueira JO. *Microbiologia e bioquímica do solo*, 2th edition. Lavras, UFLA, 2006, p.729.
28. Olsen PE, Rice WA, Bordeleau LM, Biederbeck VO. Analysis and regulation of legume inoculants in Canada: The need for an increase in standards. *Plant Soil.* 1994; 161(1): 127–134.
29. Penna C, Massa R, Olivieri F, Gutkind G, Cassan F. A simple method to evaluate the number of *Bradyrhizobia* on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express.* 2011; 1 (1): 1–21.
30. Salvagiotti F, Cassman KG, Specht JE, Walters DT, Weiss A, Dobermann A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Res.* 2008; 108: 1–13.

31. Scott JM, Porter FE. An analysis of the accuracy of the plant infection technique for counting rhizobia. *Soil Biol Biochem.* 1986; 18: 355–362.
32. Stephens JHG, Rask HM. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.* 2000; 65: 249–258.
33. Tittabutr P, Teamthisong K, Buranabanyat B, Teaumroong N, Boonkerd N. Gamma irradiation and autoclave sterilization peat and compost as the carrier for rhizobial inoculant production. *J Agric Sci.* 2012; 4(12):59-67.
34. Trabelsi D, Mhamdi R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: a review. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 1-11.
35. Zevenhuizen LPTM, Bertocchi C, Van Neerven ARW. Congo red absorption and cellulose synthesis by Rhizobiaceae. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1986; 52: 381–386.

Table 1. Evaluation of culture media and techniques for counting cells in Petri dishes of *B. japonicum* and *B. elkanii* in commercial soybean inoculants.

Number of cells viable by colony-forming units (\log_{10} CFU/ml or /g)										
Products	Medium 79- bromothymol blue		Modified medium 79- bromothymol blue		Medium 79- Congo red		Modified medium 79- Congo red		Means	VC(%)
	Spread.	Microd.	Spread.	Microd.	Spread.	Microd.	Spread	Microd.		
	Liquid									
Inoculants										
A	9.94 bA	10.20 aA	9.98 bA	10.22 aA	9.99 bA	10.18 aA	10.11 aA	10.18 aA	10.11	1.12
B	9.83 bA	10.04 aA	9.80 bB	10.13 aA	9.69 bB	10.04 aB	9.76 bB	10.07 aA	9.92	1.09
C	8.72 bD	9.05 aD	8.83 bF	9.06 aE	8.52 bF	9.02 aF	8.86 bD	9.06 aD	8.89	1.90
D	8.57 bD	9.02 aD	8.66 bG	9.04 aE	8.41 cF	9.11 aF	8.61 bE	9.01 aD	8.80	1.12
E	9.45 bB	9.74 aB	9.27 bE	9.67 aC	9.30 bC	9.75aC	9.36 bC	9.74 aB	9.54	1.07
F	9.44 bB	9.79 aB	9.40 bD	9.72 aC	9.37 bC	9.75aC	9.39 bC	9.79 aB	9.58	0.65
G	9.83 aA	9.86 aB	9.85 aB	9.84 aB	9.80 aB	9.85aC	9.80 aB	9.86 aB	9.84	0.46
H	9.70 bA	9.72 bB	9.67 bC	9.84 aB	9.72 bB	9.78aC	9.63 bC	9.83 aB	9.74	0.71
Peat										
Inoculants										
I	8.90 bC	9.12 aD	8.95 bF	9.00 bE	8.91 bE	9.07 aF	8.97 bD	8.98 bD	8.98	0.52
J	9.10 aC	9.24 aD	9.16 aE	9.25 aD	9.13 aD	9.22 aE	9.14 aD	9.50 aC	9.21	2.19
K	9.34 aB	9.54 aC	9.22 aE	9.35 aD	9.47 aC	9.42aD	9.38 aC	9.30 aC	9.38	0.90
VC(%)	1.53	1.04	0.93	0.93	1.16	0.81	1.51	1.01		
Mean	9.35	9.57	9.35	9.55	9.30	9.56	9.36	9.54		

The mean cells concentration of *Bradyrhizobium* indicated by inoculants manufacturers was 9.70 \log_{10} CFU/ml or /g (5.0×10^9 cells/ml or /g) for liquids and peat inoculants.

Means in three replicates and followed by same letter (lowercase in the same row or uppercase in the same column) are not statistically different, according to the Scott–Knott test at 5% probability

Legend: Spread – counting by spreading technique; Microd. – counting by microdrop technique; VC – variation coefficient.

Table 2. Evaluation of methods for *B. japonicum* and *B. elkanii* counting using the spreading and microdrop techniques in commercial soybean inoculants.

		Number of cells viable by colony-forming units (log ₁₀ CFU/ml or /g)							
Products	Analysts	Medium 79 – bromothymol blue		Modified medium 79 - bromothymol blue		Medium 79 – Congo red		Modified medium79 - Congo red	
		Spread.	Microd.	Spread.	Microd.	Spread.	Microd.	Spread	Microd.
Liquid inoculants									
A	1	9.79	10.14	10.18	10.19	10.04	10.10	10.20	10.17
	2	9.89	10.44	9.91	10.35	9.89	10.17	10.06	10.24
	3	10.07	10.12	10.05	10.08	10.01	10.19	10.07	10.19
B	1	9.59	10.07	9.72	10.07	9.77	10.01	9.79	10.09
	2	9.99	9.93	9.85	10.12	9.61	10.04	9.88	10.02
	3	9.92	10.10	9.80	10.14	9.66	10.10	9.59	10.10
C	1	8.82	9.08	8.72	9.03	8.77	9.01	8.76	9.09
	2	8.76	9.14	8.82	9.10	8.52	9.04	8.60	9.02
	3	8.56	8.94	8.93	9.14	8.27	8.96	9.08	8.94
D	1	8.56	9.15	8.81	9.07	8.35	9.16	8.76	9.09
	2	8.52	8.95	8.62	8.95	8.52	9.10	8.62	9.05
	3	8.61	9.04	8.51	9.09	8.33	9.03	8.43	9.00
E	1	9.36	9.86	9.25	9.74	9.23	9.82	9.40	9.86
	2	9.72	9.71	9.36	9.79	9.44	9.81	9.36	9.82
	3	9.19	9.67	9.19	9.67	9.23	9.76	9.32	9.57
F	1	9.51	9.76	9.52	9.64	9.36	9.77	9.27	9.63
	2	9.45	9.76	10.44	9.93	9.29	9.74	10.44	9.76
	3	9.37	9.89	9.33	9.69	10.44	9.74	9.44	9.87
G	1	9.84	9.83	9.87	9.84	9.81	9.82	9.85	9.91
	2	9.79	9.89	9.87	9.94	9.74	9.69	9.84	9.95
	3	9.86	9.83	9.53	9.84	9.84	9.91	9.71	9.81
H	1	9.82	9.74	9.59	9.70	9.69	9.81	9.61	9.89
	2	9.62	9.71	9.67	9.84	9.70	9.77	9.62	9.88
	3	9.65	9.92	9.73	9.88	9.78	9.76	9.65	9.79
Peat inoculants									

I	1	8.94	9.10	8.98	9.05	8.86	9.16	8.92	9.10
	2	9.00	9.20	9.02	9.13	9.02	9.10	9.11	9.02
	3	8.75	9.04	8.83	9.00	8.85	9.01	8.87	8.86
J	1	9.10	9.14	9.07	9.15	9.03	9.13	9.13	9.07
	2	9.19	9.30	9.20	9.44	9.19	9.35	9.16	9.24
	3	8.99	9.40	9.19	9.25	9.16	9.17	9.11	9.10
K	1	9.40	9.70	9.34	9.55	9.40	9.62	9.41	9.56
	2	9.16	9.27	8.83	10.21	9.47	9.30	9.44	10.12
	3	9.46	9.54	9.20	9.48	9.53	9.51	10.28	9.40

Means of the analysts in duplicate.

Legend: Spread – counting by spreading technique; Microd. – counting by microdrop technique.

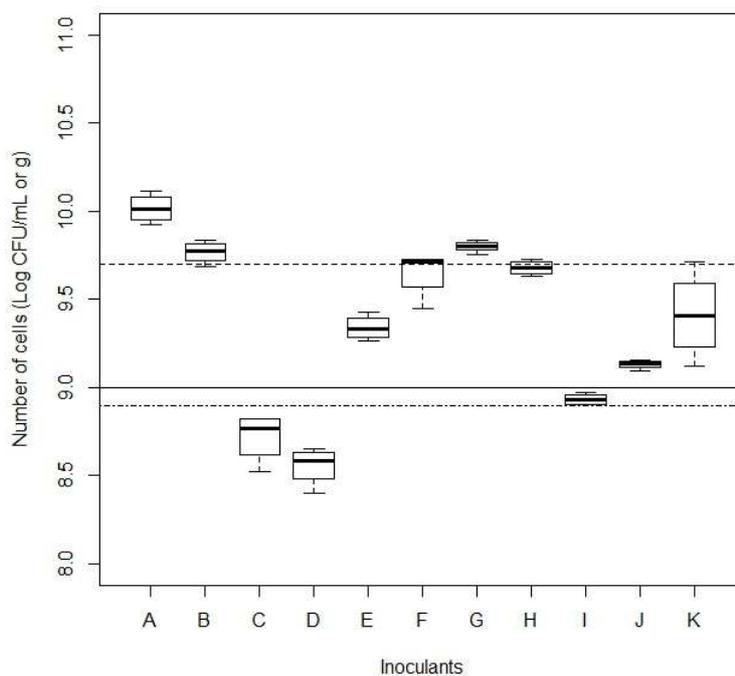
Table 3. Contingency table for categorical variables “Number of viable cells” of *Bradyrhizobium* and “Count techniques” in commercial soybean inoculants.

Number of viable cells (CFU/ml or /g)	Count techniques		Total
	Spreading	Microdrop	
> 1.0 x10 ⁹ cells	0.73 (32)	0.98 (43)	0.85(75)
10 ⁸ - 10 ⁹ cells	0.27 (12)	0.2 (1)	0.15 (13)
Total	1 (44)	1 (44)	1 (88)

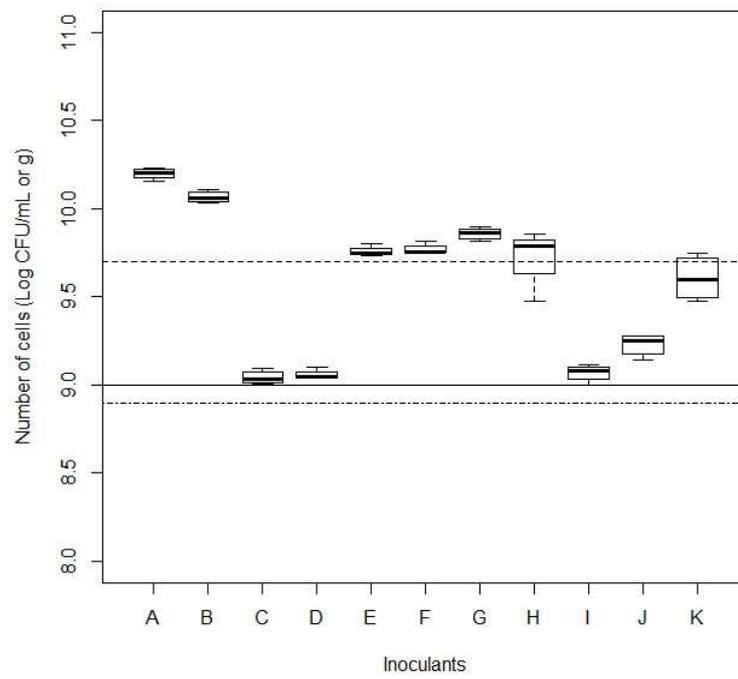
Fisher's test – p=0.001632

Figure 1. Boxplot of mean the number of CFU of *Bradyrhizobium* in culture media "79" with bromothymol blue and Congo red, the assessed commercial inoculants. a) Count by spreading technique and b) count by microdrop technique. Legend: (---) cell concentration indicated by the manufacturer, (-) cell concentration specified in the legislation, (- • -) minimum acceptable concentration of cells by legislation. Liquid inoculants: A, B, C, D, E, F, G and H; Peat inoculants: I, J and K. Inoculants manufactured by Argentine companies: A, B, E, F, G, H; inoculants manufactured by Brazilian companies: C, D, I, J, K. Means of 24 replications per counting technique, and each sample evaluated by three analysts in four culture media. Dilution was performed in duplicate.

a)



b)



ARTIGO 2

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE VARIANTES DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* spp. EM INOCULANTES COMERCIAIS PARA A SOJA.

Normas da revista Scientia Agricola Journal

Leonardo de Paiva Barbosa¹, Patrícia Freitas Costa¹, Paula Rose Almeida Ribeiro¹, Marcia Rufini² e Fatima M. S. Moreira^{2*}.

¹UFLA – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, C.P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – Brasil.

²UFLA – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, C.P. 3037 – 37200-000 – Lavras, MG – Brasil.

*Corresponding author <fmoreira@dcs.ufla.br>

Resumo: O sucesso na produtividade de soja (*Glicine max* (L.) Merrill) está relacionada com sua eficiente associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Bradyrhizobium*. A inoculação com estirpes *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* é uma prática comum para essa cultura agrícola, sendo que variações na composição dos inoculantes podem alterar a qualidade do produto. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficiência simbiótica de isolados com características culturais distintas das estirpes *B. japonicum* e *B. elkanii* presentes em inoculantes comerciais para soja. A caracterização cultural e o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram utilizados na identificação dos isolados. Os isolados e as estirpes recomendadas SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 foram testados separadamente para a mesma cultivar de soja (COODETEC 5G 830 RR), em condições controladas em casa de vegetação e caracterizados em grupos culturais distintos. A identificação pelo sequenciamento do gene 16S rRNA mostrou que alguns isolados não apresentavam similaridade com as estirpes inoculantes presentes na formulação do produto. Não houve perda na capacidade de nodulação dos isolados estudados. Contudo, houve significativa diferença na eficiência simbiótica entre os isolados e as estirpes inoculantes. Porém, a presença de variantes morfológicas não influenciou na eficiência agrônômica dos produtos inoculantes.

Palavras chave: *Glicine max*, gene 16S rRNA, caracterização cultural, rizóbios.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de soja (*Glicine max* (L.) Merrill), com uma produtividade estimada para a safra de 2013/14 de 50 sacas por ha, em uma área plantada de aproximadamente 29 milhões de ha (CONAB, 2013). A simbiose entre bactérias fixadoras de N₂ (BFN) do gênero *Bradyrhizobium* e a soja pode ser uma das responsáveis pelo sucesso na produtividade. Estirpes desse gênero, recomendadas como inoculantes comerciais, são encontradas em mais de 90% dos solos com plantio de soja no país (Ferreira e Hungria, 2002). Em áreas cujas populações de *Bradyrhizobium* nos solos são baixas ou simbioticamente ineficientes a inoculação das sementes antes do plantio é aconselhável. Dessa forma, a produção industrial de inoculantes comerciais tem encontrado um mercado promissor. Porém, o potencial agrícola dos inoculantes pode ser menor caso haja fertilização nitrogenada no solo, inoculação inadequada das sementes e produção de inoculantes comerciais com baixa qualidade.

Os inoculantes comercializados no país para o cultivo de soja são formulados com estirpes das espécies *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e 5019). Essas espécies apresentam características desejáveis para inoculação como estabilidade genética, efeito sobre a cultura agrícola, competição com populações nativas e persistência em ambientes adversos do solo na ausência da planta hospedeira (Stephens e Rask, 2000). Ainda, as estirpes inoculantes são capazes de suprir completamente a demanda da planta por nitrogênio (Hungria et al., 2006). Contudo, toda a cadeia da inoculação pode ficar comprometida caso os produtos inoculantes não estejam de acordo com critérios de controle de qualidade. Por isso, o estabelecimento de parâmetros que definam a qualidade dos inoculantes é primordial para padronização dos produtos (Castroux et al., 2001; Herridge et al. 2002).

Dentre as características de um inoculante ideal, a estabilidade genética e integridade de *Bradyrhizobium* ainda são questionadas. Vários estudos têm abordado variações nas

características morfológicas, fisiológicas, genéticas e simbióticas de *Bradyrhizobium* isolados de solos inoculados com estirpes inoculantes, atribuindo a essas variações os processos de adaptação e recombinação genética com microrganismos nativos (Ferreira e Hungria, 2002; Galli-Terasawa et al., 2003; Batista et al., 2007; Giongo et al., 2008; Barcellos et al., 2007). Porém, estirpes inoculantes de *B. japonicum* ou *B. elkanii*, cultivadas em condições laboratoriais, também produzem colônias com morfologias e genótipos distintos (Sylvester-Bradley, 1988; Basit et al., 1991; Kober, 2004). A variação genética de *Bradyrhizobium* em condições laboratoriais pode alterar as relações simbióticas com a planta hospedeira (Torres et al., 2012). Este pode ser um importante fator a ser considerado na seleção e recomendação de estirpes inoculantes, assim como no seu controle de qualidade.

Técnicas moleculares, associadas à caracterização cultural, têm sido utilizadas em estudos filogenéticos e na identificação taxonômica de rizóbios. O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA é amplamente usado para definir relações genéticas e caracterizar estirpes ao nível taxonômico de gênero ou, em alguns casos, espécie (Woese, 1987; Young e Haukka, 1996). A sequência desse gene é altamente conservada, podendo dificultar na diferenciação entre espécies (van Berkum e Fuhrmann, 2000; Perrineau et al., 2011). Porém, alguns estudos demonstraram que essa técnica foi capaz de diferenciar taxonomicamente entre *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* (Menna, et al. 2006; Batista et al., 2007; Aserse et al. 2012; Guimarães et al. 2012; Rufini et al., 2014). Para análises de inoculantes comerciais, o sequenciamento desse gene pode disponibilizar informações que permitem discriminar entre as estirpes referência do produto e possíveis contaminantes.

Variações fenotípicas e genotípicas em estirpes de *Bradyrhizobium* em condições laboratoriais, além de comprometer a análise do produto inoculante, podem influenciar a associação simbiótica com a planta hospedeira. De acordo com a intensidade dessa variação, rizóbios podem perder a capacidade de nodular ou se tornar menos eficientes na fixação de N₂. Alguns estudos têm exibido que variações naturais na morfologia e no genótipo de colônias de

Bradyrhizobium podem refletir em alterações nas características simbióticas (Fuhrmann, 1990; Melchiorre et al., 2011; Torres et al., 2012).

Experimentos em casa de vegetação indicaram que a variabilidade nas características fenotípicas das estirpes *B. japonicum* ou *B. elkanii* de inoculantes comerciais interferiam na competitividade para formação de nódulos, nodulação e eficiência na fixação de nitrogênio em soja (Kober et al., 2004). A identificação por caracterização cultural e genética de variantes de *Bradyrhizobium* com menor eficiência simbiótica pode auxiliar na seleção, produção e manutenção de estirpes inoculantes pela indústria e por instituições de recomendação e de aprovação.

Programas de controle de qualidade de inoculantes adotam a contagem de células viáveis e a presença de contaminantes como os principais critérios de avaliação (Brasil, 2011; Herrmann e Lesueur, 2013). Além desses, a caracterização cultural e genética das estirpes dos inoculantes pode auxiliar na descrição e na análise dos produtos. Assim, os objetivos do nosso estudo foram caracterizar morfológica e geneticamente as colônias com características culturais distintas das estirpes *B. japonicum* e *B. elkanii* presentes em inoculantes comerciais para soja e avaliar a eficiência simbiótica com soja em casa de vegetação.

Material e métodos

Origem dos isolados e condições de cultivo

Durante os procedimentos de avaliação da qualidade de 11 produtos inoculantes comerciais para soja foram observadas colônias bacterianas com características culturais diferentes das estirpes relacionadas nos rótulos. A absorção do corante vermelho Congo e as características culturais foram os critérios utilizados para diferenciar os isolados das estirpes inoculantes. Destes inoculantes comerciais, nove apresentavam em sua constituição apenas *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e dois apresentavam *B. elkanii* (SEMIA 587) e *B. japonicum* (SEMIA 5079). As informações sobre origem, frequência das colônias distintas nos inoculantes e características dos produtos inoculantes estão descritas na

tabela 1. No total, 12 isolados foram selecionados de amostras de inoculantes em diluições iguais ou maiores que 10^{-5} . De acordo com a Instrução Normativa nº 13 (Brasil, 2011), inoculantes comerciais podem apresentar microrganismos não especificados em diluições menores que 10^{-5} , por isso essas condições não foram avaliadas.

Caracterização cultural

A caracterização cultural das bactérias foi realizada em meio de cultura 79 (Fred e Waksman, 1928), também conhecido como YMA (Vicent, 1970), com pH 6,8. Soluções dos corantes azul de bromotimol (0.5%) ou vermelho congo (0.25%) foram adicionados aos meios de cultura para avaliação da modificação de pH ou indicação de bactérias contaminantes, respectivamente.

As colônias foram avaliadas com relação ao diâmetro, cor, produção e consistência do muco, tempo de aparecimento das primeiras colônias isoladas, reação alcalina/ácida e absorção de corante, durante 15 dias de cultivo no escuro a 28°C, em pH 6,8. As análises foram realizadas diariamente a partir do aparecimento das primeiras colônias isoladas. Para confirmar as características morfológicas da colônia original, os isolados foram cultivados cinco vezes sucessivas em placa com meio 79.

As estirpes utilizadas no Brasil como inoculantes comerciais para a soja, *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram também incluídas para caracterização cultural, para verificar a semelhança destas com as estirpes analisadas no presente estudo.

Identificação dos isolados e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Os 12 isolados foram selecionados para o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A extração de DNA foi realizada pelo método de lise alcalina de acordo com Niemann et al. (1997), de células crescidas por cinco dias em meio 79 sólido a 28°C.

A amplificação parcial do gene 16S rRNA foi realizada com volume final da reação de 50 μL , com as seguintes concentrações: 5 μL DNA, 5 μL dNTP (2 mmol L^{-1}), 5 μL tampão 10x, 4 μL MgCl_2 (2.5 mmol L^{-1}), 1 μL de cada primer iniciador (10 mmol L^{-1}) – 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), 0.4 μL Taq DNA polimerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) e água ultra pura estéril. A reação foi realizada no Eppendorf Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), com os seguintes ciclos: desnaturação inicial (94°C por 5 min), 35 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s), extensão (72°C por 1.5 min) e extensão final (72°C por 7 min). A amplificação do produto da PCR e as suas concentrações foram verificadas por electroforese com 5 μl de produto da PCR em gel de agarose a 1% e coloração com SYBR (Invitrogen). Um marcador molecular (SmartLadder-Eurogentec) foi incluído para estimar os comprimentos dos produtos de amplificação. Os produtos da PCR foram enviados ao laboratório da Macrogen Inc. (Macrogen Inc., Seul, Coreia), para o sequenciamento.

A qualidade das seqüências foi verificada usando o programa Bionumerics (Applied Applied Maths, Austin, TX, EUA versão 7.1) e submetidas ao BLAST para comparação com as seqüências do GenBank (National Center for Biotechnology Information, 2010) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Todas as seqüências analisadas apresentaram número de pares de bases igual ou superior a 470.

Testes de autenticação do isolados e fixação de N_2

Os 12 isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de nodular e fixar N_2 em soja. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no Laboratório de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos do Solo - LBMPBS da Universidade Federal de Lavras, por um período de 30 dias, entre os meses de outubro e novembro/2012, em condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade. O experimento foi conduzido em garrafas de vidro do tipo *long neck* (500 mL) recicláveis e esterilizadas, utilizando-se papel filtro como suporte para o desenvolvimento das raízes das plantas (Florentino et al., 2009). As garrafas

foram revestidas com papel alumínio e preenchidas com solução de Hoagland e Arnon (1950) diluída quatro vezes. Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação foi utilizada solução de Hoagland e Arnon (1950) com baixa concentração de nitrogênio (5.25 mg L^{-1}), considerada dose arranque para o processo de fixação biológica de nitrogênio. No controle sem inoculação e com nitrogênio, foi utilizado solução de Hoagland e Arnon (1950) completa, com 52.5 mg L^{-1} de nitrogênio. Em todos os experimentos também foram utilizados controles positivos, inoculados com as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019 ou SEMIA 587) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 ou SEMIA 5080), separadamente, aprovadas para soja pelo MAPA (Brasil, 2011).

A espécie de planta teste utilizada nos experimentos foi *Glycine max* (cv. COODETEC 5G 830 RR). As sementes de soja foram previamente desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 30 segundos, transferidas para solução de hipoclorito de sódio 2% durante 2 minutos e lavadas seis vezes em água destilada estéril. Em seguida, as sementes foram pré-geminadas em placa de Petri contendo papel filtro e algodão umedecido e estéril e incubadas a 28°C , por um período de 2 dias. Cada tratamento recebeu uma plântula e os tratamentos inoculados receberam 1,0 mL de inoculo. O inoculo apresentava o isolado bacteriano em meio 79 líquido, em um número de células de aproximadamente 10^9 por mL. Em todos os experimentos foram utilizados controles positivos, inoculados com as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019 ou SEMIA 587) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 ou SEMIA 5080). Amostras de inoculantes comerciais provenientes do produto D e do produto E (inoculantes de origem dos isolados) foram utilizadas para determinar se a presença do isolado no produto alterava sua eficiência. Foram utilizados dois controles negativos não inoculados, sendo um controle com solução nutritiva formulada com $52,5 \text{ mg L}^{-1}$ de N mineral (como $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e KNO_3) e o outro com baixa concentração de N ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$). Os frascos inoculados foram mantidos em casa de vegetação no LBMPBS da Universidade Federal de Lavras por um período de 30 dias, em condições ideais de temperatura, luminosidade e umidade.

Ao final do trigésimo dia, as plantas foram colhidas e analisadas com relação às variáveis, número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST) e eficiência em relação ao controle com N mineral (EFCN). A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada pela fórmula: $EFCN = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$.

Testes de nodulação e fixação de N₂ em vasos de Leonard

A partir dos resultados de nodulação e fixação de N₂ em frascos de vidro, os 12 isolados foram avaliados quanto a eficiência simbiótica em soja em vasos de Leonard, por um maior período de tempo. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no LBMPBS da Universidade Federal de Lavras, durante 55 dias (Janeiro a Março de 2014). A planta teste e as condições de germinação foram as mesmas descritas anteriormente. Após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos de Leonard estéreis (Vincent, 1970), com uma mistura de areia e vermiculita (1:1) na parte superior, suplementada com solução nutritiva esterilizada (Hoagland e Arnon, 1950) diluída quatro vezes, na parte inferior. Cada vaso recebeu quatro plântulas que foram inoculadas com 1,0 mL de inoculo por planta. Cinco dias após o plantio, duas plantas por vaso foram cortadas. Os vasos foram distribuídos aleatoriamente com três repetições na casa de vegetação.

Nos experimentos foram utilizados controles positivos para nodulação e eficiência, com as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 5019 ou SEMIA 587) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 ou SEMIA 5080). Foram utilizados dois controles negativos não inoculados, sendo um controle com solução nutritiva formulada com 52,5 mg.L⁻¹ de N mineral (como NH₄H₂PO₄ e KNO₃) e o outro com baixa concentração de N (5,25 mg.L⁻¹). O conteúdo dos vasos foi periodicamente completado com solução nutritiva autoclavada. As plantas foram colhidas no início do florescimento, e as variáveis, número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca total (MST) e eficiência relativa (EFCN) foram determinadas.

Analises estatísticas

Os dados de nodulação e os testes de fixação de N_2 dos isolados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), respeitando as premissas de distribuição normal dos resíduos e homocedasticidade, usando o programa SISVAR versão 4.3 (Ferreira, 2011). As médias dos tratamentos foram avaliadas pelo teste de Scott-Knott, com 5% de significância.

Resultados

Características culturais dos isolados

Durante as análises de qualidade de 11 inoculantes comerciais para soja, foram obtidos 12 isolados com características culturais diferentes das estirpes inoculantes *B. japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 5019 e 587) (Tabela 2). Após cinco cultivos sucessivos em meio de cultura 79, os isolados mantiveram as características das colônias parentais. Todos os isolados apresentaram crescimento lento (5 – 7 dias), colônias brancas em meio de cultura 79 com azul de bromotimol e alcalinizaram o pH do meio, características típicas de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Dentre os isolados, aproximadamente 41% formavam colônias pequenas (diâmetro < 2,0 mm), em 25% as colônias foram puntiformes e 50% produziram pouco muco (Tabela 2 e Figura 1). Todos os isolados absorveram o corante vermelho Congo (colônias com coloração rosa), exceto o isolado CJP4 que apresentou colônias brancas nessas condições de cultivo (Figura 1).

Identificação dos isolados baseada no sequenciamento parcial do 16S rRNA

Os dados obtidos a partir das análises das sequências do gene 16S rRNA mostraram que os 12 isolados apresentaram alta similaridade com as espécies *Bradyrhizobium japonicum* ou *Bradyrhizobium elkanii* (Tabela 3). A similaridade entre os isolados e a sequência de acesso no GenBank foi de 99 ou 100%. Os isolados que apresentaram sequências com 100% de similaridade com a estirpe referência, mas com características fenotípicas distintas, foram determinados variantes. Os isolados que não apresentaram sequências com 100% de similaridade com as estirpes referência e com características fenotípicas distintas foram determinados rizóbios exóticos.

A identificação taxonômica dos isolados não estava de acordo com as estirpes inoculantes presentes na composição do produto (Tabela 3). Os isolados do produto D não apresentaram sequências similares às estirpes aprovadas como inoculantes no Brasil e indicadas nos rótulos dos produtos, sendo consideradas rizóbios exóticos. Os isolados CGP4, CG1P4 e CEP4 apresentaram alta similaridade com as estirpes USDA 4348 e USDA 4349. Os isolados CJP4 e CFP4 foram similares à USDA 6. As estirpes com código USDA foram aprovadas pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. As estirpes inoculantes presentes na formulação do produto E apresentaram sequências com alta similaridade à estirpe SEMIA 5079, de acordo com o inoculante do produto, sendo consideradas variantes culturais de *B. japonicum*. Assim, os isolados presentes nos inoculantes foram identificados como estirpes diferentes das especificações do fabricante ou como variantes culturais das estirpes *B. japonicum*, excluindo, neste último caso, sua possível classificação como contaminante.

Testes de autenticação do isolados e fixação de N₂

Os isolados variantes e de rizóbios exóticos foram avaliados quanto a eficiência simbiótica em soja. Nos testes de eficiência em casa de vegetação não foi observado nodulação no controle sem inoculação e com baixo conteúdo de N mineral e no controle sem inoculação e com N mineral, indicando condições ideais de assepsia na condução dos experimentos. Os controles positivos inoculados com *B. elkanii* (SEMIA 587 e 5019) e *B. japonicum* (SEMIA 5079 e 5080), estirpes aprovadas pelo MAPA, como inoculantes para a cultura da soja no Brasil, assim como os produtos inoculantes D e E, nodularam eficientemente, evidenciando que as condições de cultivo foram favoráveis à ocorrência da nodulação e fixação de N₂.

Todos os isolados estudados foram capazes de nodular a soja (Tabela 4). Os inoculantes dos produtos D e E, além de 58,3% dos isolados, apresentaram número de nódulos similares ($p > 0,05$) às estirpes inoculantes. Apesar de estimular a nodulação, o peso seco dos nódulos para os isolados CH1P5, CGP4 e CDP5 foram similares ($p > 0,05$) aos controles sem inoculação.

Quanto a fixação biológica de N_2 em soja, todos os isolados e as estirpes inoculantes foram menos eficientes ($p < 0,05$) que o controle positivo (com N mineral) e os produtos inoculantes D e E (Tabela 4). Para matéria seca da parte aérea (MSPA), 50% dos isolados apresentaram valores menores e diferentes ($p < 0,05$) das estirpes e dos produtos inoculantes. Para matéria seca da raiz (MSR), essa proporção reduziu para 25% dos isolados. Os valores de matéria seca total (MST) e eficiência relativa (EFCN) mostraram que cinco dos isolados variantes e dois rizóbios exóticos foram similares ($p > 0,05$) a alguma estirpe inoculante. Para essas variáveis, o rizóbio exótico CG1P4 apresentou os maiores valores dentre todos os isolados, sendo menores e estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) apenas para o controle com N mineral e para os produtos D e E.

Os produtos inoculantes D e E apresentaram os maiores valores de MSPA, MSR, MST e EFCN dentre todos os isolados e estirpes inoculantes avaliados. Esses valores indicam que a presença de isolados com baixa eficiência simbiótica nos produtos inoculantes não interferiu na eficiência do produto.

Testes de nodulação e fixação de N_2 em vasos de Leonard

Os dados de eficiência simbiótica em soja nos experimentos com frascos de vidro mostraram que, apesar de apresentar capacidade de nodulação, 40% dos isolados foram ineficientes na fixação biológica de N_2 . Para determinar se o tempo de cultivo influenciou na eficiência simbiótica, os isolados também foram avaliados em vasos de Leonard (tabela5). Nos testes de eficiência em casa de vegetação não foi observado nodulação nos controles sem inoculação e com baixo conteúdo de N mineral e no controle sem inoculação e com N mineral, indicando condições ideais de assepsia nos experimentos. Os controles positivos inoculados com as estirpes *B. elkanii* (SEMIA 587 e 5019) e *B. japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) foram eficientes na nodulação e na fixação de N_2 , demonstrando que as condições de cultivo foram favoráveis para simbiose.

Dentre os isolados estudados, 67% apresentaram número de nódulos similares ($p > 0,05$) a pelo menos uma estirpe inoculante. Para os valores de MSN, apenas o rizóbio exótico CG1P4 apresentou resultados similares às estirpes inoculantes. Embora tenham estimulado a produção de nódulos na raiz da soja, os valores de MSN para os isolados variantes CDP5 e CFP4 foram muito baixo e estatisticamente similar ($p > 0,05$) aos controles sem nodulação.

Os dados referentes às características de eficiência de fixação de N_2 dos isolados desse estudo foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) das estirpes inoculantes e do controle com N mineral (Tabela 5). Para as variáveis MSPA, MSR, MST e EFCN, 83% dos isolados exibiram valores iguais ($p > 0,05$) ou menores ($p < 0,05$) que o controle com baixo N mineral, exceto a CGP4 e CG1P4 e as estirpes inoculantes que apresentaram valores maiores. Apenas o isolado CG1P4 apresentou valores de MSPA, MSR, MST e EFCN significativamente maiores ($p < 0,05$) que os demais isolados e estatisticamente similares ($p > 0,05$) às estirpes inoculantes.

Discussão

O isolamento de estirpes de rizóbios com alto potencial agrícola exige uma série de medidas experimentais para sua recomendação como produtos inoculantes comerciais. Embora vários países possuam uma legislação específica para recomendação, produção e comercialização de inoculantes, a baixa qualidade desses produtos pode comprometer a tecnologia da inoculação (Herrmann e Lesueur, 2013). A melhoria dos inoculantes comerciais está relacionada com a definição de parâmetros claros e concisos por programas de controle da qualidade. Dentre eles, podemos destacar a caracterização morfológica e genética das estirpes referências nos produtos. Variações nessas características, além de dificultar a avaliação do inoculante, podem interferir nos processos simbióticos de nodulação e eficiência de fixação de N_2 na planta hospedeira (Bloem et al., 2002; McInnes et al., 2005).

Nesse estudo foram selecionados 12 isolados de inoculantes comerciais para a soja com características culturais diferentes das estirpes inoculantes dos produtos. A absorção do corante

vermelho Congo foi o principal critério empregado na diferenciação dos isolados. Atendendo à recomendação da instrução normativa nº 30 (Brasil, 2011), o cultivo em meio 79 com vermelho Congo pode diferenciar entre colônias de *Bradyrhizobium* e contaminantes. Os resultados mostraram que todos os isolados e as estirpes recomendadas absorveram o corante e formaram colônias rosa (Figura 1), sendo questionável o emprego desse critério como um contra indicador para identificação de *Bradyrhizobium*. Esses resultados corroboram com outros estudos (Bloem et al., 2002; Botha et al., 2004; Loureiro et al., 2007), sendo essa variação associada à interação do corante com estruturas na superfície da célula de rizóbios, podendo ser: fraca com polissacarídeos capsulares (CPS) (colônia rosa – laranja), forte com as fibrilas de celulose (colônias vermelhas) e, ausente com exopolissacarídeos extracelulares (EPS) (Zevenhuizen et al., 1986). A cor das colônias de *Bradyrhizobium* variou possivelmente pelo aumento na concentração de CPS durante o crescimento da colônia. Para este grupo bacteriano, o CPS forma uma camada aderente e coesiva na superfície da célula, auxiliando os processos de infecção na raiz da planta hospedeira (Laus et al., 2005).

Apesar dos isolados absorverem o corante, todos apresentaram crescimento lento, alcalinizaram o pH do meio 79 com azul de bromotimol e promoveram a nodulação nas raízes de soja, características típicas de membros do gênero *Bradyrhizobium* (Jordan e Allen, 1984). Além disso, foi observada uma alta diversidade fenotípica na morfologia das colônias. Adaptações a diferentes condições do solo e de cultivo podem explicar essas variações (Breedveld et al., 1993; Boddey e Hungria, 1997; Batista et al., 2007). Porém, os inoculantes utilizados no presente estudo foram produzidos em condições industriais e cultivados em condições padronizadas, indicando que as variações culturais ocorreram naturalmente por alterações no genótipo. Colônias de rizóbios podem sofrer o fenômeno de dimorfismo (Sylvester-Bradley et al., 1988; McIness et al., 2005), devido a recombinação ou mutações nos genes reguladores (genes *exo/exs* ou *pss*) da síntese de polissacarídeos (Downie, 2010).

As variações nas características culturais dos isolados refletiram na diversidade do gene 16S rRNA. A comparação das sequências dos isolados estudados com as estirpes inoculante no GenBank mostraram 99 ou 100% de similaridade para a espécie *B. japonicum* ou para *B. elkanii* (Tabela 3). Os isolados do produto D foram identificados ao nível de espécie em *B. japonicum* ou *B. elkanii*, porém não houve homologia com as estirpes inoculantes descritas nos rótulos dos produtos (SEMIA 587 e SEMIA 5079), indicando a presença de rizóbios exóticos. O emprego de inoculantes formulados com rizóbios exóticos pode comprometer a tecnologia da inoculação devido a ausência de informações sobre a estabilidade genética, o efeito sobre a cultura agrícola, a competição com populações microbianas indígenas do solo, a capacidade de migrar do substrato inoculante para a planta hospedeira e o tempo de persistência em ambientes adversos do solo na ausência do hospedeiro. Esses fatores são determinantes na viabilidade e eficiência agronômica do inoculante.

Contudo, os isolados do produto E apresentaram a mesma identificação taxonômica da estirpe inoculante presente na composição original do produto, indicando que as colônias sofreram dimorfismo. Para esses isolados variantes, as colônias foram caracterizadas como pequenas ou médias (diâmetro entre 1,5 – 2,0 mm) e com pouca produção de muco, muito diferentes das estirpes referência caracterizadas com colônias grandes (diâmetro > 2,5 mm), viscosas e com alta produção de muco. Sylvester-Bradley et al. (1988) observaram dois grupos morfológicos distintos, com colônias aquosas ou secas, a partir de culturas originais de *Bradyrhizobium*. No estudo de Torres et al. (2012) foi observado grandes modificações no perfil do DNA entre inoculantes comerciais com *B. japonicum* e seus isolados variantes em nódulos de soja, sob condições experimentais controladas.

Variações culturais e genéticas em populações de *Bradyrhizobium* sob condições controladas de cultivo foram evidentes. A caracterização cultural combinada ao sequenciamento do 16S rRNA permitiu identificar as variações nas estirpes desse gênero. Esses resultados corroboram com outros autores (Moreira et al., 1993; Florentino et al., 2010; Perrineau et al.,

2011). No estudo de diversidade de BFN de solos da Amazônia isoladas de nódulos de caupi, Guimarães et al. (2012) encontraram relação entre características culturais e genéticas para os gêneros de rizóbio. Menna et al. (2006) traçaram o perfil filogenético de 68 estirpes recomendadas como inoculantes comerciais no Brasil por caracterização cultural e pelo sequenciamento da região 16S rRNA e também identificaram grupos bem definidos para gêneros de rizóbio.

Os isolados de rizóbios exóticos do produto D apresentaram capacidade de nodulação e fixação de N₂ em simbiose com a soja. Nos experimentos de autenticação e fixação de N₂, apenas o isolado CGP4 apresentou nodulação menor que as estirpes e aos produtos inoculantes avaliados. Contudo, nenhum isolado apresentou resultados de eficiência similares aos produtos inoculantes. A presença de rizóbios exóticos não comprometeu a eficiência do produto inoculante D (produto de origem dos isolados), que apresentou resultados de NN, MSR, MSPA, MST e EFCN iguais ou maiores que as estirpes inoculantes. Para os experimentos em vasos de Leonard, apenas o isolado CG1P4 apresentou resultados de eficiências simbióticas similares as estirpes inoculantes. De acordo com a comparação das sequências do gene 16S rRNA, esse isolado não foi similar as estirpes inoculantes descrita no rótulo do produto. Embora os resultados de eficiência do produto D em casa de vegetação tenham sido satisfatórios, esses inoculantes podem ser veículos para introdução de rizóbios exóticos nos solos, podendo interferir na estabilidade genética da comunidade microbiana nativa do solo.

Para os isolados variantes de *B. japonicum* do produto E, as modificações culturais não alteraram sua capacidade de nodulação com a soja (Tabela 4 e Tabela 5). Em ambos os experimentos de nodulação e eficiência simbiótica, todos os isolados induziram a formação de nódulos na planta hospedeira, indicando que as características de nodulação se mantiveram estáveis. Mesmo ocorrendo variações culturais nas colônias, esses isolados produziram polissacarídeos ativos que os auxiliaram nos processos de infecção e formação de nódulos na raiz da soja. McInnes et al. (2005) também observaram que, para variantes de *Sinorhizobium*

meliloti isolados de inoculantes comerciais na Austrália, a presença de colônias secas ou com grande produção de muco não interferiu na nodulação da planta hospedeira, quando cultivadas em casa de vegetação. A capacidade de nodulação não estava correlacionada (dados não exibidos) com as características de fixação de N₂ em soja. Embora não tenham alterado a nodulação, diferenças nas características culturais podem ter influenciado a fixação biológica de N₂ com a planta hospedeira (Tabela 4 e Tabela 5). Nos experimentos de autenticação e fixação de N₂, os resultados de eficiência simbiótica do produto E foi maior que os isolados variantes e as estirpes inoculantes, indicando que a presença dos isolados variantes não alterou a qualidade do produto. Não houve evidências conclusivas sobre qual variação morfológica na colônia de *Bradyrhizobium* interferiu nas características simbióticas. Outros autores (Fuhrmann, 1990; Basit et al., 1991; Carvalho et al., 2005; Kober et al., 2004) observaram que variações nas características culturais de *Bradyrhizobium* influenciavam na simbiose com soja, todavia nenhum padrão na morfologia das colônia explicou tal influência. A identificação de variantes com características distintas às estirpes inoculantes ou às colônias parentais pode ser um indício de alterações genéticas que influenciam nas relações simbióticas. Assim, a frequência de colônias variantes ou de rizóbios exóticos são fatores importantes a serem considerados por programas de controle de qualidade e na manutenção de culturas bacterianas em coleções microbianas.

Nesse estudo foi observado que inoculantes comerciais formulados com *Bradyrhizobium* podem apresentar rizóbios exóticos ou variantes com características morfológicas e simbióticas distintas das estirpes referências do produto. A descrição cultural pode ser usada como uma análise prévia na diferenciação de grupos bacterianos distintos. O corante vermelho Congo não pode ser usado como um contra indicador fisiológico para discriminar entre colônias de *Bradyrhizobium* e contaminantes. As análises do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu diferenciar taxonomicamente os isolados entre rizóbios exóticos e variantes culturais. Porém, todos os isolados apresentaram capacidade de nodulação

na planta hospedeira. As características de eficiência na fixação biológica de N₂ dos isolados foram menores que os produtos ou as estirpes inoculantes. Assim, alterações morfológicas e na fixação biológica de N₂ indicaram que a simbiose entre *Bradyrhizobium* e a soja pode ainda não estar bem definida. No entanto, a presença de variantes naturais em *Bradyrhizobium* comerciais não influenciou na eficiência simbiótica dos produtos inoculantes e não comprometeu a qualidade dos produtos. Embora as análises moleculares sejam importantes na identificação taxonômica de *Bradyrhizobium*, triagens morfológicas continuam sendo ferramentas úteis para detectar a variabilidade populacional e a eficiência simbiótica em inoculantes comerciais.

Agradecimentos

Ao CNPq/MAPA (578635/2008-9) pelo suporte financeiro. Ao CNPq e Capes pela concessão de bolsas aos estudantes de pós-graduação e ao CNPq bolsa de produtividade em pesquisa de F.M.S. Moreira.

Referências Bibliográficas

- Aserse, A. A.; Räsänen, L. A.; Aseffa, F.; Hailemariam, A.; Lindström, K. (2012) Phylogenetically diverse groups of *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Crotalaria* spp., *Indigofera* spp., *Erythrina brucei* and *Glycine max* growing in Ethiopia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 595–609.
- Barcellos, F.G.; Menna, P.; Batista, J.S.S; Hungria, M. (2007) Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a brazilian savannah soil. *Applied and Environmental Microbiology* 73(8):2635–2643.
- Basit, H. A.; Angle, A. S.; Salem, S.; Gewaily, E. M.; Kotob, S. I.; Van Berkum, P. (1991) Phenotypic diversity among strains of *Bradyrhizobium japonicum* belonging to serogroup 110. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1570- 1572.
- Batista, J.S.S.; Hungria, M.; Barcellos, F.G.; Ferreira, M.C; Mendes, I.C. (2007) Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial Ecology* 53:270–284.
- Bloem, J. F.; Botha, W. J.; Law, I. J.; Steyn, P. L. (2002) Colony variation in *Sinorhizobium meliloti* inoculant strain U 45. *Microbiological Research* 157: 283–292.
- Boddey, L.H.; Hungria, M. (1997) Determination of characteristics of *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* species in Brazilian strains which nodulate soybean. *Biology and Fertility of Soils* 25:407–415.
- Botha, W.J.; Jaftha, J.B.; Bloem, J.F.; Habig, J.H.; Law, I.J. (2004) Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809. *Microbiological Research* 159: 219–231.
- Brasil, 2011. Instrução Normativa n 13 de 24 de março de 2011. *Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n. 58 de 25 de março de 2011.*, pp.3–4. Available at: www.jusbrasil.com.br/diarios/25585722/dou-secao-1-25-03-2011-pg-3/pdfView.
- Breedveld, M.W.; Zevenhuizen, L.P.T.M.; Canter Cremers, H.C.J.; Zehnder, A.J.B. (1993) Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. *Antoine van Leeuwenhoek* 64: 1-8.

Carvalho, F. G.; Selbach, P. A.; Bizarro, M. J. (2005) Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). Revista Brasileira de Ciências do Solo 29:883-891.

Castroux, G.; Hartmann, A.; Revellin, C. (2001) Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant and Soil 230:21–30

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) (2014). Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_03_12_08_41_24_boletim_graos_marco_2014.pdf.

Downie, J. A. (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiology Reviews 34:150–170.

Ferreira, M.C.; Hungria, M. (2002) Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. Field Crops Research 79:139–152.

Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. Ciência e Agrotecnologia 35:1039–1042.

Florentino, L.A.; Guimarães, A. P.; Rufini, M.; Silva, K.; Moreira, F.M.S. (2009) *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. Scientia Agricola 66(5):667–676.

Florentino, L.A.; Sousa, P. M.; Silva, J. S.; Silva, K.B., Moreira, F.M.S. (2010) Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. Revista Brasileira de Ciências do Solo 34:1113-1123.

Fred, E.B.; Waksman, S.A. (1928) Laboratory Manual of General Microbiology, New York: McGraw-Hill Book.

Fuhrmann, J. (1990) Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. Applied and Environmental Microbiology 56:224–229.

Galli-Terasawa, L.V.; Glienke-Blanco, C.; Hungria, M. (2003) Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19: 933–939.

Giongo, A.; Ambrosini, A.; Vargas, L.K.; Freire, J.R.J.; Bodanese-Zanettini, M.H.; Passaglia, L.M.P. (2008) Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean *Glycine max* (L.) Merrill isolated from South Brazilian fields. *Applied Soil Ecology* 38: 261–269.

Guimarães, A. A.; Jaramillo, P.M. D.; Nóbrega, R. S. A.; Florentino, L. A.; Silva, K. B.; Moreira, F.M.S. (2012) Genetic and Symbiotic Diversity of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Agricultural Soils in the Western Amazon by Using Cowpea as the Trap Plant. *Applied and Environmental Microbiology* 78(18):6726-6733.

Herridge, D.; Gemell, G.; Hartley, E. (2002) Legume Inoculants and Quality Control. In D. Herridge, ed. *Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam*. Australia, pp. 105–115.

Herrmann, L.; Lesueur, D. (2013) Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. *Applied and Microbiological Biotechnology* 15: 1-15.

Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. D. I. Arnon, ed., Berkeley: California Agricultural Experiment Station.

Hungria, M.; Franchini, J.C.; Campo, R.J.; Crispino, C.C.; Moraes, J.Z.; Sibaldelli R.N.R.; Mendes, I.C.; Arihara, J. (2006a) Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science* 86:927–939.

Jordan, D.C.; Allen, O.N. (1984) Rhizobiaceae. In: Buchanan RE, Gibbons NE (eds) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th edn. Williams and Wilkins, Baltimore.

Kober, M.V.; Sá, E.L.S.; Freire, J.R.J.; Giongo, A. (2004) Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans. *Ciência Rural* 34:1459–1464.

Laus, M.C.; Van Brussel, A.A.N.; Kijne, J.W. (2005) Exopolysaccharide structure is not a determinant of host-plant specificity in nodulation of *Vicia sativa* roots. *Molecular plant-microbe interactions* 18:1123-1129.

Loureiro, M.D.; Kaschuk, G.; Alberton, O.; Hungria, M. (2007) Soybean *Glycine max* (L.) Merrill rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biology and Fertility of Soils* 43, 665–674.

McInnes, A.; Holford, P.; Thies, J. E. (2005). Characterisation of dry and mucoid colonies isolated from Australian rhizobial inoculant strains for *Medicago* species. *Aust. Australian Journal of Experimental Agriculture* 45: 151-159.

Melchiorre, M.; de Luca, M. J.; Anta, G. G.; Suarez, P.; Lopez, C.; Lascano, R.; Racca, R. W. (2011) Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils* 47(1):81-89.

Menna, P.; Hungria, M.; Barcellos, F.G.; Bangel, E.V.; Hess, P.N.; Martinez-Romero, E. (2006) Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology* 29:315–332.

Moreira, F.M.S.; Gillis, M.; Pot, B.; Kerskers, K.; Franco, A.A. (1993) Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology* 17:135-146.

Niemann, S.; Puehler, A.; Tichy, H.V.; Simon, R.; Selbitshka, W. (1997). Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Mycrobiology* 82:477-484.

Perrineau, M. M.; Le Roux, C.; de Faria, S. M.; de Carvalho Balieiro, F.; Galiana, A.; Prin, Y.; Béna, G. (2011) Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. *Systematic and Applied Microbiology* 34:376–384.

Rufini, M.; Silva, M.A P.; Ferreira, P.A.A.; Cassetari, A.S.; Soares, B.L.; Andrade, M.J.B.; Moreira, F.M.S. (2014) Symbiotic efficiency and identification of rhizobia that nodulate cowpea in a Rhodic Eutrudox. *Biology and Fertility of Soils* 50 (1): 115-122.

Stephens J.H.G.; Rask H.M. (2000) Inoculant production and formulation. *Field Crop Research* 65:249–258.

Sylvester-Bradley, R.; Thornton, P.; Jones, P. (1988): Colony dimorphism in *Bradyrhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1033–1038.

Torres, A. R.; Kaschuk, G.; Saridakis, G. P.; Hungria, M. (2012) Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 28:1831–1835.

Van Berkum, P.; Fuhrmann, J.J. (2000) Evolutionary relationships among the soybean bradyrhizobia reconstructed from 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequence divergence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50:2165-2172.

Vicent, J.M. (1970) *A manual for the Practical Study of Root-Nodule Bacteria.*, Oxford: International Biological Programme Handbook. Blackwell Scientific.

Woese, C.R. (1987) Bacteria evolution. *Microbiological Reviews* 51:221-271.

Young, J.P.W; Haukka, K. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist* 133:87-94.

Zevenhuizen, L.P.T.M.; Bertocchi, C.; Van Neerven, A.R.W. (1986) Congo red absorption and cellulose synthesis by Rhizobiaceae. *Antonie van Leeuwenhoek* 52: 381–386.

Tabela 1. Origem dos isolados com características culturais diferentes dos inoculantes comerciais para soja.

Isolado	Produto inoculante	Composição do produto ^a	Substrato ^b	Diluição ^c	Células viáveis (cels.g ⁻¹ ou mL ⁻¹) ^d
CH1P5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁹
CH2P5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁹
CCP5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁷	1,2 x 10 ⁹
CGP4	Produto D	SEMIA 587 SEMIA 5079	Líquido	10 ⁻⁶	8,8 x 10 ⁸
CG1P4	Produto D	SEMIA 587 SEMIA 5079	Líquido	10 ⁻⁶	8,8 x 10 ⁸
CEP5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁶	1,2 x 10 ⁹
CE1P5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁷	1,2 x 10 ⁹
CEP4	Produto D	SEMIA 587 SEMIA 5079	Líquido	10 ⁻⁷	8,8 x 10 ⁸
CFP5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁸	1,3 x 10 ⁹
CJP4	Produto D	SEMIA 587 SEMIA 5079	Líquido	10 ⁻⁷	8,8 x 10 ⁸
CFP4	Produto D	SEMIA 587 SEMIA 5079	Líquido	10 ⁻⁶	8,8 x 10 ⁸
CDP5	Produto E	SEMIA 5079 SEMIA 5080	Turfoso	10 ⁻⁸	1,2 x 10 ⁹

^aEstirpes inoculantes na formulação do produto.

^bSubstrato do produto inoculante avaliado.

^cDiluição da amostra do inoculante na qual o isolado estava presente.

^dNúmero de células viáveis de estirpes inoculantes dos produtos.

Tabela 2. Caracterização cultural das estirpes inoculantes e das colônias variantes isoladas de inoculantes comerciais para soja em meio 79 sólido, com azul de bromotimol ou vermelho Congo.

Isolado	Dias ⁽¹⁾	Diâmetro ⁽²⁾	pH ⁽³⁾	Forma ⁽⁴⁾	Const. massa ⁽⁵⁾	Produção goma ⁽⁶⁾	Cor ⁽⁷⁾	Absorção corante ⁽⁸⁾	
								7 dias	8 – 10 dias
CH1P5	7	1,5 - 2,0	Alc	C	G	M	B	B	R
CH2P5	7	2,0 – 2,5	Alc	C	G	M	B	R	R
CCP5	5	2,0 – 2,5	Alc	C	G	P	B	B	R
CGP4	6	< 1,5	Alc	P	G	P	B	B	R
CG1P4	5	< 1,5	Alc	P	G	P	B	R	R
CEP5	5	2,0 – 2,5	Alc	C	G	P	B	B	R
CE1P5	5	2,0 – 2,5	Alc	C	G	M	B	R	R
CEP4	5	1,5 – 2,0	Alc	P	G	E	B	R	R
CFP5	5	1,5 – 2,0	Alc	C	G	P	B	B	R
CJP4	6	2,0 – 2,5	Alc	C	G	P	B	B	R
CFP4	5	2,0 – 2,5	Alc	C	G	A	B	B	R
CDP5	5	2,0 – 2,5	Alc	C	G	M	B	B	B
SEMIA									
587	5	> 2,5	Alc	C	A	A	B	B	R
SEMIA									
5019	5	> 2,5	Alc	I	A	A	B	B	R
SEMIA									
5079	5	> 2,5	Alc	C	G	A	B	B	R
SEMIA									
5080	5	> 2,5	Alc	C	G	M	B	B	R

⁽¹⁾Tempo para aparecimento de colônias isoladas em dias. ⁽²⁾ Diâmetro da colônia em mm.

⁽³⁾Reação do meio de cultivo YMA com azul de bromotimol após crescimento das colônias: (Al) alcalina. ⁽⁴⁾Forma da colônia: (P) puntiforme; (C) circular, (I) irregular. ⁽⁵⁾Constituição da massa da colônia: (G) gomosa, (A) aquosa. ⁽⁶⁾Produção de goma: (E) escasso, (P) pouca, (M) moderada, (A) abundante. ⁽⁷⁾ Cor da colônia em meio YMA com azul de bromotimol: (B) branca. ⁽⁸⁾Cor da colônia em meio YMA com corante vermelho congo em 7 dias de cultivo e entre 8 e 10 dias de cultivo (>7dias): (B) branca; (R) rosa.

Tabela 3. Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de estirpes variantes isoladas de inoculantes comerciais para soja.

Isolado	Composição do inoculante	Comprimento (bp) das sequências do 16S rRNA	Sequências mais similares encontradas no GenBank (NCBI)		
			Espécie	Similaridade (%)	Número de acesso
CH1P5	SEMIA 5079	832	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				
CH2P5	SEMIA 5079	988	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				
CCP5	SEMIA 5079	932	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				
CGP4	SEMIA 587	1070	<i>B. elkanii</i> - USDA 275	99	HQ233242
	SEMIA 5079				
CG1P4	SEMIA 587	899	<i>B. elkanii</i> - USDA 275	100	HQ233242
	SEMIA 5079				
CEP5	SEMIA 5079	820	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				
CE1P5	SEMIA 5079	881	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				
CEP4	SEMIA 587	964	<i>B. elkanii</i> - USDA 275	100	HQ233242
	SEMIA 5079				
CFP5	SEMIA 5079	854	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				
CJP4	SEMIA 587	714	<i>B. japonicum</i> - USDA 6	100	AP012206
	SEMIA 5079				
CFP4	SEMIA 587	646	<i>B. japonicum</i> - USDA 6	100	AP012206
	SEMIA 5079				
CDP5	SEMIA 5079	470	<i>B. japonicum</i> - SEMIA 5079	100	AF234888
	SEMIA 5080				

Tabela 4. Valores médios (em gramas por planta) para as variáveis número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST) e eficiência relativa (EFCN) de plantas de soja, cultivadas em frascos de vidro, com diferentes tratamentos: estirpes isoladas dos produtos inoculantes, produtos inoculantes D e E, dois controles não inoculados, um com N mineral (+N) e outro com baixo N mineral (-N) e quatro controles inoculados com as estirpes recomendadas como inoculante para a soja, *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019).

Tratamentos	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	EFCN
	-	----- g planta ⁻¹ -----				%
CH1P5	6,6 f	0,033 d	0,463 h	0,120 d	0,586 g	35,99 g
CH2P5	18,3 e	0,060 b	0,440 h	0,173 c	0,673 f	34,40 g
CCP5	16,3 e	0,040 c	0,610 e	0,196 c	0,850 d	47,42 e
CGP4	5,3 f	0,020 d	0,176 i	0,093 d	0,293 i	13,60 i
CG1P4	43,3 c	0,070 b	0,713 c	0,236 b	1,020 c	55,40 c
CEP5	39,3 c	0,043 c	0,616 e	0,200 c	0,860 d	47,94 e
CE1P5	55,6 b	0,040 c	0,653 d	0,193 c	0,883 d	50,73 d
CEP4	49,6 b	0,043 c	0,560 f	0,176 c	0,783 e	43,64 f
CFP5	35 c	0,096 e	0,650 d	0,190 c	0,910 d	50,66 d
CJP4	28,6 c	0,073 b	0,656 d	0,206 c	0,926 d	51,08 d
CFP4	56,33 b	0,060 b	0,650 d	0,186 c	0,896 d	50,63 d
CDP5	2,66 f	0,006 d	0,440 h	0,126 a	0,573 g	34,00 g
Produto D	41,6 c	0,076 a	0,770 b	0,276 b	1,120 b	59,86 b
Produto E	41 c	0,083 a	0,803 b	0,270 b	1,156 b	62,45 b
SEMIA 587	41,3 c	0,066 b	0,713 c	0,243 b	1,040 b	56,91 c
SEMIA 5019	65,3 a	0,076 a	0,723 b	0,216 c	1,016 c	56,23 c
SEMIA 5079	29,3 c	0,086 a	0,666 d	0,253 b	1,006 c	51,83 d
SEMIA 5080	35,3 c	0,050 c	0,613 e	0,233 b	0,896 d	47,68 e
+ N	0 f	0 d	1,283 a	0,413 a	1,700 a	100 a
- N	0 f	0 d	0,353 i	0,143 d	0,496 h	27,4 h

*CV (%)	13,77	19,91	4,78	10,24	4,90	4,36
---------	-------	-------	------	-------	------	------

Médias em triplicata. Nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Scott- Knott com 5% de probabilidade.

*CV – coeficiente de variação.

Tabela 5. Valores médios (em gramas por planta) para as variáveis número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST) e eficiência relativa (EFCN) de plantas de soja, cultivadas em vasos de Leonard, com diferentes tratamentos: estirpes isoladas dos produtos inoculantes isolados de inoculantes comerciais, dois controles não inoculados, um com N mineral (+N) e outro com baixo N mineral (-N) e quatro controles inoculados com as estirpes recomendadas como inoculante para a soja, *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019).

Tratamentos	NN	MSN	MSPA	MSR	MST	EFCN
	-	----- g planta ⁻¹ -----				%
CH1P5	10,1 f	0,013 g	1,746 g	0,666c	2,423 e	24,01 h
CH2P5	120 d	0,113 e	1,773 g	0,743 c	2,633 e	24,40 h
CCP5	65,3 e	0,066 f	1,980 g	0,836 c	2,876 e	27,20 h
CGP4	98 d	0,250 c	2,596 e	0,800 c	3,646 d	35,66 f
CG1P4	144 c	0,400 b	3,773 b	1,226 b	5,433 b	52,32 d
CEP5	118,3 d	0,183 d	2,303 f	0,856 c	3,343 e	31,69 g
CE1P5	116,6 d	0,101 e	2,166 f	0,883 c	3,150 e	29,80 g
CEP4	138,6 c	0,083 e	1,860 g	0,810 c	2,753 e	25,58 h
CFP5	102 d	0,096 e	1,883 g	0,750 c	2,726 e	25,87 h
CJP4	142,3 c	0,170 d	2,163 f	0,816 c	3,146 e	29,73 g
CFP4	70,3 e	0,056 f	1,800 g	0,716 c	2,573 e	24,73 h
CDP5	9,6 f	0,01 g	2,040 f	0,803 c	2,846 e	28,06 g
SEMIA 587	118 c	0,396 b	4,160 b	1,113 b	5,666 b	57,200 c
SEMIA 5019	178,3 b	0,563 a	4,480 b	1,016 b	5,833 b	62,96 b
SEMIA 5079	202 a	0,373 b	3,946 b	1,0566 b	5,376 b	54,25 d
SEMIA 5080	169,3 b	0,350 b	3,133 d	0,946 b	4,470 c	43,83 e
+ N	0 f	0 g	7,273 a	2,323 a	9,600 a	100 a
- N	0 f	0 g	2,260 f	0,803 c	3,060 e	31,09 g
*CV (%)	14,38	20,19	7,23	13,23	9,46	4,54

Médias em triplicata. Nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras não são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Scott- Knott com 5% de probabilidade.

*CV – coeficiente de variação.

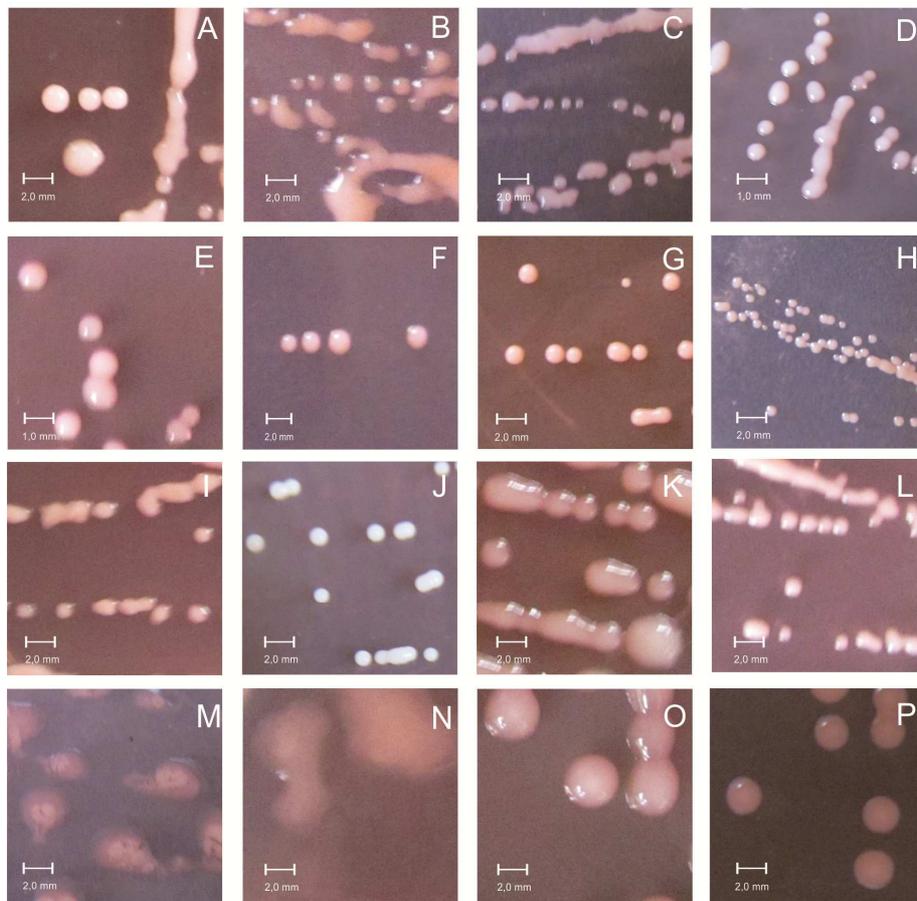


Figura 1. Características morfológicas das colônias em meio 79 com vermelho Congo após 8 dias de cultivo. A) CH1P5; B) CH2P5; C) CCP5; D) CGP4; E) CG1P4; F) CEP5; G) CE1P5; H) CEP4; I) CFP5; J) CJP4; K) CFP4; L) CDP5, M) SEMIA 5019; N) SEMIA 587; O) SEMIA 5079 e; P) SEMIA 5080.