

§ 4ª A frase de que trata o § 3ª deve ser distinta, ostensiva, com caracteres em negrito, de fácil leitura e inserida na horizontal, em condição usual de apresentação ao consumidor.

§ 5ª O aperitivo em cuja composição não predomine um determinado princípio, uma substância aromática ou uma matéria-prima poderá ser denominado genericamente de aperitivo de ervas, aperitivo de frutas ou outras denominações que caracterizem o produto.

Art. 31. A matéria-prima de origem vegetal utilizada na elaboração do aperitivo não poderá ser substituída por aditivo aromatizante sintético.

#### Seção XI

##### Da Aguardente Composta

Art. 32. Aguardente composta é a bebida definida no art. 72 do Decreto nº 6.871, de 2009, elaborada por meio de processo tecnológico adequado que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo.

Parágrafo único. Será denominada de aguardente composta adoçada a bebida definida no caput deste artigo que contenha açúcar em quantidade superior a seis e inferior a trinta gramas por litro.

Art. 33. A composição química da aguardente composta e sua respectiva classificação quanto ao teor de açúcar deverá obedecer aos limites fixados na Tabela 3 constante do Anexo III desta Instrução Normativa.

Art. 34. O coeficiente de congêneres da aguardente composta não poderá exceder ao maior valor mensurado para o mesmo parâmetro no ingrediente alcoólico utilizado na elaboração desta bebida, respeitados os limites estabelecidos nos Anexos desta Instrução Normativa.

Parágrafo único. É permitido o corte com destilados de igual natureza, na proporção necessária, exclusivamente para conduzir o coeficiente de congêneres até os limites admitidos pelos Anexos desta Instrução Normativa.

Art. 35. O rótulo da aguardente composta poderá mencionar a expressão conhaque acrescida do nome da principal substância de origem vegetal ou animal utilizada, de forma visível, e constará no painel principal do rótulo, em caracteres gráficos de mesma dimensão e cor.

Parágrafo único. Quando o rótulo apresentar a expressão conhaque, acrescida do nome da principal substância de origem vegetal ou animal utilizada, a denominação aguardente composta deverá ser declarada em dimensão gráfica não inferior a um terço dessa expressão.

#### Seção XII

##### Das Disposições Transitórias e Finais

Art. 36. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação, estabelecido o prazo de 180 (cento e oitenta) dias para a adequação às alterações estabelecidas.

Art. 37. Ficam revogadas a Portaria nº 880, de 28 de novembro de 1975, a Portaria nº 110, de 30 de abril de 1980, a Portaria nº 114, de 30 de abril de 1981, no que concerne aos produtos constantes desta Instrução Normativa, e a Portaria nº 603, de 10 de novembro de 1993.

WAGNER ROSSI

#### ANEXO I

Tabela 1: Fermentado de frutas misto

Item	---	Limite mínimo	Limite máximo
1	Graduação alcoólica, em % v/v a 20 °C	4	14
2	Acidez total, em mEq/l	50	130
3	Acidez fixa, em mEq/l	30	---
4	Acidez volátil, em mEq/l	---	20
5	Extrato seco reduzido, em g/l	7	---

#### ANEXO II

Tabela 2: Bebida alcoólica composta

Item	---	Limite mínimo	Limite máximo	Classificação
1	Graduação alcoólica, em % v/v a 20 °C	13	18	---
2	Teor de cinzas, em mg/l	250	---	---
3	Acidez Total, em mEq/l	40	---	---
4	Teor de açúcar em g/l	0	6	---
5	Extrato seco reduzido, em g/l	> 6	---	Doce ou Suave
		15	---	Bebida Alcoólica de Jurubeba e outras bebidas alcoólicas compostas
		12	---	Bebida Alcoólica de Gengibre

#### ANEXO III

Tabela 3: Aguardente composta.

Item	---	Limite mínimo	Limite máximo	Classificação
1	Graduação alcoólica, em % v/v a 20 °C	38	54	---
2	Coefficiente de congêneres, em mg/100 ml de álcool anidro	---	650	---
3	Acidez volátil, em ácido acético, em mg/100 ml de álcool anidro	---	150	---
4	Ésteres, em acetato de etila, em mg/100 ml de álcool anidro	---	200	---
5	Aldeídos, em aldeído acético, mg/100 ml de álcool anidro	---	30	---
6	Somatório de Furfural e hidroximetilfurfural, em mg/100 ml de álcool anidro	---	5	---
7	Álcool superior (somatório de álcool n-propílico, álcool iso-butílico e alcoóis iso-amflicos), em mg/100 ml de álcool anidro	---	360	---
8	Teor de açúcar em g/l	---	< 6	Aguardente composta
		---	6	Aguardente Composta Adoçada

## SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

### INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE, 12 DE NOVEMBRO DE 2010

O SECRETÁRIO SUBSTITUTO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso das atribuições que lhe conferem os arts. 10 e 42 do Anexo I do Decreto nº 7.127, de 4 de março de 2010, tendo em vista o disposto no Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, na Instrução Normativa nº 5, de 6 de agosto de 2004, e o que consta do Processo nº 21000.004661/2009-21, resolve:

Art. 1ª Estabelecer os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza na forma desta Instrução Normativa.

Art. 2ª A amostra deverá ser preparada observando os seguintes parâmetros:

I - a abertura das embalagens (pacotes, sachês, bolsas, beixas ou frascos) contendo os micro-organismos deverá ser realizada em capela de fluxo laminar, a fim de evitar contaminações; e

II - antes da abertura, as embalagens deverão ser desinfetadas, externamente, com algodão ou papel toalha embebido em álcool 70%.

Parágrafo único. Todos os materiais utilizados nas análises deverão ser previamente esterilizados.

Art. 3ª A diluição seriada decimal deverá ser preparada observando os seguintes procedimentos:

I - a diluição seriada decimal é o primeiro passo para a realização das análises de concentração e de pureza de inoculantes;

II - a diluição seriada decimal deve ser preparada em capela de fluxo laminar, utilizando tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85%) esterilizada e a primeira diluição (10<sup>-1</sup>) será obtida de acordo com o suporte do inoculante a ser analisado;

III - para inoculantes turfosos (ou de qualquer natureza sólida) e pacotes de embalagem (sachês) contendo substrato sólido (turfas), esterilizados, pesar na capela de fluxo laminar 10,0 g do inoculante ou do substrato sólido esterilizado em frasco de 250-300 mL e adicionar 90,0 mL de solução fisiológica a fim de formar a diluição 10<sup>-1</sup> e este frasco deverá ser homogeneizado em agitador orbital por um período de 20 (vinte) minutos para depois ser coletada, com pipeta ou micropipeta, uma alíquota de 1,0 mL que será transferida para um tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica, formando a diluição 10<sup>-2</sup>;

IV - do tubo com a diluição 10<sup>-2</sup>, retirar 1,0 mL com uma nova pipeta ou ponteira e transferir para outro tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica para formar a diluição 10<sup>-3</sup> e assim, sucessivamente, até formar a diluição que permita a contagem de 30 a 300 colônias por placa e que contemple a concentração garantida no

produto; em cada procedimento de transferência da alíquota de 1,0 mL, descartar a pipeta ou ponteira utilizada e agitar o tubo em vórtex por vinte segundos;

V - para inoculantes líquidos, homogeneizar vigorosamente a embalagem e coletar assepticamente a alíquota de 1,0 mL transferindo-a para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica a fim de formar a diluição 10<sup>-1</sup> e continuar procedendo da mesma forma que para o inoculante turfoso, até formar a diluição que permita a contagem de 30 a 300 colônias por placa e que contemple a concentração garantida no produto.

§ 1ª Todos os cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o procedimento.

§ 2ª A mesma série de diluições é suficiente para a análise de pureza e para contagem com a utilização de placas de Petri com meios sólidos, frascos com meios semissólidos ou a infecção em plantas.

§ 3ª De cada amostra de inoculante deverão ser preparadas duas séries de diluição, denominadas A e B, sendo que o resultado final de cada amostra será obtido pela média dos resultados das duas análises.

§ 4ª De cada amostra das embalagens (sachês) do substrato sólido esterilizado, deverão ser preparadas duas séries de diluição denominadas A e B para a verificação da ausência de micro-organismos no fator de diluição 10<sup>-2</sup>.

Art. 4ª Para os métodos de avaliação da concentração de inoculantes, devem ser observados:

§ 1ª Dependendo do produto inoculante, após a diluição seriada deverão ser observados os três métodos a seguir para a contagem das bactérias:

I - espalhamento e contagem em placas de Petri com meio sólido, para rizóbios, bactérias diazotróficas associativas e endofíticas e bactérias promotoras do crescimento de plantas;

II - infecção em plantas, também conhecido como método do número mais provável (NMP) em plantas, para rizóbios; e

III - contagem em meios semissólidos, também conhecido como método do número mais provável (NMP), para bactérias diazotróficas associativas, endofíticas e bactérias promotoras do crescimento de plantas.

§ 2ª Os meios a serem utilizados encontram-se descritos nos arts. 26 a 40 e a indicação de seu uso sumarizada na Tabela 01, abaixo, que também descreve a faixa de dias para avaliação dos resultados por contagem:

Tabela 01

Micro-organismo	Meio de Cultura para contagem em placa	Faixa de dias para contagem em placa	Meio de Cultura para NMP	Faixa de dias para contagem em NMP
Azorhizobium	79 + VC*	5 a 7	NA**	25 a 30
Azospirillum	Batata e Nfb	5 a 7	NFb, LGI e FAM	5 a 7
Azotobacter	LG	3 a 5	NA	NA
Burkholderia	79 + VC	3 a 5	NA	25 a 30
Bradyrhizobium	79 + VC	5 a 12	NA	25 a 30
Ensifer (Sinorhizobium)	79 + VC	2 a 4	NA	25 a 30
Gluconacetobacter	Batata-P	7 a 10	LGI-P	7 a 10
Herbaspirillum	Batata	5 a 7	JNfb	5 a 7
Mesorhizobium	79 + VC	2 a 5	NA	25 a 30
Rhizobium	79 + VC	2 a 3	NA	20 a 30
Sphingomonas	Batata	7 a 12	Nfb	8 a 12

\* Meio 79 + Vermelho Congo \*\* Não se aplica

Art. 5ª Para rizóbios, bactérias diazotróficas associativas e endofíticas e bactérias promotoras do crescimento de plantas, será utilizado o método de contagem em placas de Petri.

Art. 6ª Para a técnica do espalhamento, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - alíquotas de 0,1 mL das diluições sucessivas A e B, iniciando em 10<sup>-5</sup>, são inoculadas na superfície dos meios de cultura nas placas de Petri e em sequência essas alíquotas devem ser uniformemente distribuídas na superfície do meio, usando-se para isso um bastão de vidro com uma extremidade em triângulo (alça de Drigalski), fazendo para cada diluição três repetições das análises A e B; e

II - a incubação deve ser feita na faixa de 28°C a 30°C para rizóbios, ou na temperatura recomendada para os micro-organismos declarados em outros produtos inoculantes, sendo que a primeira observação, para acompanhar o desenvolvimento das colônias, deverá ser efetuada diariamente, a partir do 2º dia da incubação, com contagem das colônias realizada conforme Tabela 1.

§ 1ª Esse método pode apresentar inconvenientes quando empregado para inoculantes que apresentam contaminação em função do fato de que geralmente os meios de cultivo não são seletivos, possibilitando o desenvolvimento dos contaminantes.



§ 2ª Alternativamente, no caso da avaliação de produtos inoculantes formulados com rizóbios, que contenham um número elevado de contaminantes, a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pode ser feita em meio 79 acrescido de 100 mg.L<sup>-1</sup> da solução estoque de actidione/ciclohexamida (inciso V do art. 26), que permite o crescimento de rizóbios e inibe o crescimento de contaminantes.

§ 3ª Outros antimicrobianos também podem ser empregados, desde que não interfiram no desenvolvimento das colônias de rizóbios.

Art. 7ª Para a Contagem das Colônias e Cálculo do Número de Bactérias, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - para rizóbios, bactérias diazotróficas associativas e endofíticas e bactérias promotoras do crescimento de plantas, será utilizado o método de contagem em placas de Petri;

II - marcar e contar as UFC, registrar o número contado e, no caso de inoculantes com presença de contaminantes, recorrer a contagens sob lupa para facilitar o reconhecimento das colônias da(s) estirpe(s) utilizada(s) no inoculante;

III - deve ser considerada a diluição cuja média de contagem das três placas estiver na faixa entre 30 e 300 UFC e, se nenhuma das diluições sucessivas estiverem dentro dessa faixa, calcular a média das duas diluições mais próximas da faixa de contagem;

IV - caso uma das repetições apresente discrepância acima de 50% da média das outras duas placas, esta não deve ser considerada no cálculo da média;

V - o número de bactérias é dado pela fórmula:

Nª de célula/grama ou mililitro de inoculante = f x N, em que:

f = fator de diluição e N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada;

VI - o fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa multiplicada por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL; e

VII - como exemplo, considerando-se a inoculação de 0,1 mL das diluições 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> e 10<sup>-7</sup>, o cálculo pode ser efetuado empregando-se os fatores da tabela 02 abaixo:

Tabela 02

Diluição	Fator (f)	Nª de células/g ou mL de inoculante
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>6</sup>	N x 10 <sup>6</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>7</sup>	N x 10 <sup>7</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>8</sup>	N x 10 <sup>8</sup>

Art. 8ª Para o Método do Número Mais Provável (NMP) em Plantas, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - o NMP em planta é um processo indireto de contagem que envolve a inoculação de diluições seriadas decimais das amostras do produto inoculante em plantas testes específicas, cultivadas em condições assépticas pressupondo-se que neste método a infectividade é avaliada pela formação de nódulos que confere caráter positivo ao teste, enquanto a ausência de nodulação confere caráter negativo ao mesmo;

II - para eficácia do teste, a última diluição tem que apresentar todas as repetições negativas, evitando a subestimação do resultado;

III - a partir da semeadura do inóculo, o teste demanda 25 a 30 dias para sua conclusão e se vale da Tabela 2, para a estimativa do número de bactérias no produto inoculante; os testes do NMP em planta constarão de uma plântula por unidade teste e poderão ser conduzidos em tubos de ensaio, sacos de polietileno, frascos de vidro ou vasos de Leonard, com três repetições;

IV - a estimativa do número de células de rizóbio pelo número mais provável (NMP) em plantas (adaptado de Andrade & Hamakawa, 1994, modificado de Cochran, 1950) será de acordo com a Tabela 03 a seguir:

Tabela 03

Diluições			Fator	Prob.%	Intervalo de confiança	
D1	D2	D3	NMP		mínimo	máximo
0	0	1	0,300	0,332	0,073	1,675
0	0	2	0,601	0,001	0,186	2,176
0	0	3	0,904	0,000	0,329	2,645
0	1	0	0,305	3,365	0,074	1,698
0	1	1	0,611	0,045	0,189	2,208
0	1	2	0,917	0,000	0,334	2,684
0	1	3	1,224	0,000	0,498	3,140
0	2	0	0,620	0,156	0,192	2,239
0	2	1	0,930	0,004	0,338	2,722
0	2	2	1,242	0,000	0,505	3,185
0	2	3	1,555	0,000	0,686	3,636
0	3	0	0,944	0,004	0,343	2,762
0	3	1	1,261	0,000	0,512	3,233
0	3	2	1,579	0,000	0,695	3,693
0	3	3	1,898	0,000	0,890	4,141
1	0	0	0,357	39,203	0,087	2,058

1	0	1	0,723	0,624	0,225	2,711
1	0	2	1,098	0,006	0,399	3,336
1	0	3	1,482	0,000	0,601	3,948
1	1	0	0,736	6,445	0,228	2,762
1	1	1	1,118	0,179	0,407	3,401
1	1	2	1,510	0,002	0,612	4,026
1	1	3	1,911	0,000	0,838	4,644
1	2	0	1,138	0,627	0,414	3,468
1	2	1	1,538	0,025	0,623	4,108
1	2	2	1,950	0,000	0,854	4,740
1	2	3	2,370	0,000	1,104	5,356
1	3	0	1,568	0,030	0,635	4,194
1	3	1	1,988	0,002	0,871	4,842
1	3	2	2,418	0,000	1,126	5,486
1	3	3	2,860	0,000	1,397	6,126
2	0	0	0,917	31,927	0,288	3,773
2	0	1	1,432	1,120	0,522	4,791
2	0	2	1,990	0,019	0,802	5,832
2	0	3	2,600	0,000	1,123	6,887
2	1	0	1,469	11,963	0,535	4,951
2	1	1	2,046	0,632	0,823	6,037
2	1	2	2,680	0,015	1,156	7,143
2	1	3	3,359	0,000	1,529	8,261
2	2	0	2,106	2,318	0,847	6,261
2	2	1	2,763	0,170	1,191	7,420
2	2	2	3,478	0,005	1,579	8,598
2	2	3	4,240	0,000	2,009	9,782
2	3	0	2,855	0,216	1,229	7,726
2	3	1	3,602	0,021	1,632	8,966
2	3	2	4,408	0,001	2,082	10,217
2	3	3	5,254	0,000	2,574	11,478
3	0	0	2,312	34,098	0,871	12,822
3	0	1	3,850	3,099	1,511	17,662
3	0	2	6,348	0,158	2,434	22,749
3	0	3	9,538	0,004	3,706	27,927
3	1	0	4,272	37,433	1,664	21,327
3	1	1	7,488	6,579	2,777	28,088
3	1	2	11,520	0,649	4,380	35,159
3	1	3	15,878	0,032	6,485	42,502
3	2	0	9,324	32,817	3,331	38,555
3	2	1	14,938	12,507	5,569	50,581
3	2	2	21,470	2,470	8,652	64,067
3	2	3	29,170	0,235	12,543	79,220
3	3	0	23,970	36,594	9,128	139,550
3	3	1	46,208	42,767	17,836	240,763
3	3	2	109,849	44,442	38,227	478,767

V - para os testes positivos e negativos:

a) os controles positivos e negativos, também em três repetições, são indicativos da não interferência de fatores externos, que podem ocorrer na técnica de contagem do NMP em planta;

b) para compor o teste positivo, utiliza-se uma cultura pura da bactéria específica; serão utilizados inóculos de uma estirpe componente do inoculante em teste, enquanto o controle negativo será composto, unicamente, de plântulas e solução nutritiva; e

c) os controles deverão ser incluídos simultaneamente aos testes analíticos examinados, sendo que o controle positivo indica se as condições experimentais foram adequadas ao estabelecimento da simbiose e seu funcionamento; já o controle negativo indica se as condições experimentais tiveram assepsia adequada, não permitindo contaminação; e, se apresentar nodulação, o resultado do teste não pode ser aceito;

VI - para a assepsia e desinfecção de sementes:

a) para sementes com tegumento duro como soja perene (*Neonotonia wightii*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*), que necessitam escarificações, a assepsia, desinfecção e escarificação podem ser feitas simultaneamente, usando ácido sulfúrico concentrado;

b) colocar as sementes em um copo tipo Becker e adicionar o ácido sulfúrico em quantidade que permita a cobertura das sementes, onde o tempo de exposição ao ácido sulfúrico dependerá da espécie e das condições ambientais em que as sementes forem armazenadas;

c) esse tempo não influenciará nos resultados de expressão da simbiose, desde que as sementes germinem adequadamente e não danifiquem o embrião;

d) drenar o ácido e lavar com água destilada esterilizada por, no mínimo, seis vezes, sendo que a drenagem do ácido é importante, caso contrário dar-se-á violenta reação, no qual há desprendimento de calor durante o processo, porém este calor não é suficiente para prejudicar a germinação da semente; e

e) após a última lavagem, deixar as sementes em água destilada esterilizada por cerca de cinco minutos, para intumescimento, o que facilita a germinação homogênea;

VII - no caso de sementes que não necessitam escarificação, como soja (*Glycine max*) e feijão (*Phaseolus spp.*), a assepsia e a desinfecção superficial podem ser feitas com solução de hipoclorito de sódio de 3 a 6%, durante 4 a 5 minutos e, decorrido o tempo, as sementes devem ser lavadas, no mínimo, por seis vezes com água destilada esterilizada, sendo conveniente efetuar uma imersão prévia das sementes em álcool etílico a, aproximadamente, 95% por 30 a 60 segundos, para facilitar o contato do tegumento com a solução de hipoclorito;

VIII - pré-germinação das sementes:

a) a pré-germinação das sementes destina-se a garantir o desenvolvimento de plântulas homogêneas para o transplante em tubos de ensaio, sacos de polietileno ou vasos de Leonard no teste NMP em planta;

b) após a assepsia e desinfestação das sementes, elas deverão ser distribuídas de forma individualizada sobre a superfície de um conjunto de duas folhas de papel para germinação esterilizadas e umedecidas com água destilada estéril;

c) o papel para germinação pode ser substituído por outros suportes (por exemplo: ágar-água, algodão) e estes podem ser colocados também em placa de petri, caixa germinadora, etc; e

d) recobrir as sementes com mais uma folha de papel para germinação umedecida, com o devido cuidado para manter a distribuição das sementes, e o material deverá ser acondicionado em saco de polietileno e conduzido a um germinador à temperatura de 20 a 25°C por um período de 2 a 4 dias;

IX - solução nutritiva: a solução nutritiva de Norris ou similar deve ser usada para os sistemas de cultivo em tubos de ensaio com solução agarizada, em sacos de polietileno contendo papel para germinação ou outro suporte, em frascos de vidro com papel para germinação e em vasos de Leonard.

Art. 9ª Para o Método do Número Mais Provável em tubos, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - para sementes pequenas, como trevos (*Trifolium spp.*) e alfafa (*Medicago sativa*), recomenda-se conduzir o teste NMP em tubos de ensaio de, aproximadamente, 200 x 25 mm, com uma plântula por tubo e cada tubo deve receber 15 a 20 mL da solução nutritiva de Norris ou similar agarizada, ser fechado adequadamente (com algodão ou tampa plástica) e esterilizado a, aproximadamente, 121°C e 1,0 atmosfera por 20 minutos;

II - em cada tubo esterilizado, deve ser colocada uma semente pré-germinada, com a raiz imersa na solução agarizada, corretamente orientada, onde é conveniente que o plantio seja efetuado próximo à parede do tubo, de forma a possibilitar a observação dos nódulos sem necessidade de desfazer o sistema;

III - os tubos deverão ser acomodados em suportes adequados, de forma que toda a extensão da solução agarizada (parte das raízes) fique protegida da luz, e conduzidos para câmara de crescimento ou casa de vegetação; e

IV - a inoculação deverá ser feita até o segundo dia após a colocação das sementes pré-germinadas nos tubos e consistirá na adição de alíquotas de 1,0 mL de cada diluição por tubo (unidade teste), em triplicatas.

§ 1ª Deverão ser incluídos tubos controles positivos e negativos, conforme indicado anteriormente e o crescimento dar-se-á em câmara de crescimento ou casa de vegetação.

§ 2ª A avaliação poderá ser efetuada, com segurança, dos 25 aos 35 dias após a inoculação, ou quando o controle positivo apresentar nodulação.

Art. 10. Para o Método do Número Mais Provável em Plantas cultivadas em sacos de polietileno com solução nutritiva, deve ser observado o seguinte:

I - os cultivos de plantas em sacos de polietileno para o teste NMP são recomendados para sementes de leguminosas de tamanho médio, como a leucena (*Leucaena leucocephala*) e ervilhaca (*Vicia sativa*), e, para sementes grandes, como a soja e o feijão, consiste em acomodar uma plântula pré-germinada da cultura leguminosa específica em sacos de polietileno contendo papel para germinação ou outro suporte;

II - os sacos de polietileno deverão ter uma espessura adequada (em torno de 0,12 mm), para que se sustentem, e as dimensões médias de base e altura de, aproximadamente, 130 x 140 mm;

III - o papel para germinação deverá ter comprimento e largura de, aproximadamente, 230 x 120 mm e será dobrado e perfurado para abrigar as sementes pré-germinadas, e os sacos de polietileno contendo o papel para germinação com a plântula serão dispostos em uma grade e adicionados volumes de 80 a 100 mL da solução nutritiva de Norris ou similar, e a grade com o material será conduzida à câmara de crescimento para posterior inoculação; e

IV - a inoculação deverá ser feita até o segundo dia após a colocação das sementes pré-germinadas nos sacos de polietileno e consistirá na adição de alíquotas de 1,0 mL de cada diluição por saco (unidade teste), em triplicatas.

Parágrafo único. Conforme as plantas leguminosas forem se desenvolvendo, adicionar solução nutritiva, a fim de atender à necessidade de consumo dos vegetais.

Art. 11. Para o Método do Número Mais Provável em frascos de vidro com solução nutritiva, deve ser observado o seguinte:

I - serem usados frascos de vidro de, aproximadamente, 400 a 600 mL, que permitam a adição de 300 a 400 mL de solução nutritiva de Norris ou similar, suficiente para atender às exigências das plantas, com diâmetro aproximado de 7 a 8 cm e altura de 15 a 20 cm, onde o papel para germinação utilizado como suporte deve ter 5 cm a mais de altura e 1,5 cm a mais de largura em relação às medidas do frasco;

II - a folha de papel dobrada deve ter duas abas fixadas às bordas do frasco com o auxílio de um fio de látex ou barbante de algodão e a parte superior do papel deverá conter um orifício, formado entre as duas folhas do papel para segurar as sementes pré-germinadas;

III - colocar a solução nutritiva nos frascos, inserir o papel já dobrado, cobrir o frasco com uma folha de papel alumínio e fixar as duas abas do papel para germinação e as bordas do papel de alumínio ao frasco, utilizando o fio de látex ou barbante de algodão e esterilizar os frascos em autoclave a 121°C e 1,0 atmosfera durante 30 minutos;

IV - após o resfriamento, fazer um pequeno orifício no papel alumínio, na mesma posição do orifício já existente no papel para germinação, onde será colocada a semente pré-germinada;

V - os frascos devem ser de vidro âmbar ou envoltos com papel opaco, a fim de evitar a incidência de luz na região das raízes, e serão dispostos sobre balcões em câmara de crescimento ou casa de vegetação; e

VI - a inoculação deverá ser feita até o segundo dia após a colocação das sementes pré-germinadas nos frascos e consistirá na adição de alíquotas de 1,0 mL de cada diluição por frasco (unidade teste), em triplicatas.

Art. 12. Para o Método do Número Mais Provável em vasos de Leonard, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - os vasos, que constam de um reservatório para solução nutritiva e outro suporte para as plantas, podem ser improvisados com garrafas de vidro comerciais comuns e para o reservatório da solução nutritiva, as garrafas são cortadas a cerca de 12 cm de altura a partir da base;

II - para obtenção do suporte, que conterá o substrato com a planta, são cortados os fundos das garrafas e realizado um fechamento do bocal da garrafa com rede plástica de malha reduzida, tecido de algodão fino, ou similar, a fim de manter o substrato no vaso;

III - o substrato usado para o preparo dos vasos poderá ser areia, vermiculita, ou a mistura de areia com vermiculita, ou outros substratos referenciados na literatura; de modo geral, adicionam-se 2/3 do volume da parte inferior do vaso com solução nutritiva de Norris ou similar e essa solução atinge a parte superior por capilaridade;

IV - no momento da distribuição, a solução nutritiva deve ser constantemente agitada, para que o sulfato de cálcio seja mantido em suspensão, sendo que os vasos e a solução nutritiva devem ser esterilizados e dispostos sobre balcões em casa de vegetação preparada para cultivo asséptico;

V - nos vasos, devidamente preparados, fazer o plantio das sementes pré-germinadas; e

VI - a inoculação deverá ser feita até o segundo dia após a colocação das sementes pré-germinadas nos vasos e consistirá na adição de alíquotas de 1,0 mL de cada diluição por vaso (unidade teste), em triplicatas.

Art. 13. Para os diversos substratos, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - para o substrato à base de areia:

a) a areia a ser usada nos vasos de Leonard deve estar isenta de nitrogênio e de qualquer elemento que possa causar toxidez às plantas, onde toxidez de manganês já foi observada em areias de diversas procedências;

b) preliminarmente, a areia deve ser lavada com água corrente até que esta saia límpida e faz-se, a seguir, imersão da areia em HCl a 5%, durante cerca de cinco horas, com agitação ocasional; a seguir, drena-se o ácido e lava-se com água até a completa eliminação do ácido, sendo que a areia lavada e seca pode ser armazenada em sacos de polietileno até o momento de uso;

II - para o substrato à base de vermiculita:

a) a vermiculita é um argilomineral 2:1 com capacidade de expansão e contração, que lhe confere uma elevada plasticidade e pegajosidade e, dependendo da origem, algumas vermiculitas são muito alcalinas;

b) recomenda-se a lavagem por imersão em água por cerca de 8 horas, após este período a lavagem com água corrente e secagem de 90 a 100°C por 24 horas ou à temperatura ambiente, por cerca de uma semana;

c) a vermiculita que será utilizada em vasos deve ser pe-neirada com malhas entre ASTM nº 18 (1,0 mm) e nº 7 (2,83 mm) e, quando necessário, corrigir o pH para cerca de 6,5, sendo que, se houver necessidade, para uma boa umidade inicial do substrato, pode-se adicionar, antecipadamente à introdução das sementes, aproximadamente 2,5 mL de solução nutritiva esterilizada por grama de vermiculita na parte superior do vaso;

III - para o substrato à base de mistura: os vasos poderão ser preparados com uma mistura de areia e vermiculita (1:1, v:v) ou de outros substratos referenciados na literatura.

Art. 14. Para as condições de cultivo, deve ser observado o seguinte:

I - a câmara de crescimento constitui-se de uma sala asséptica com: controle automático da temperatura adequada ao sistema-teste (bactéria-planta); luminosidade de 500 a 1000 lumens, fornecida por lâmpadas fluorescentes Growlux e Branca-Fria, controladas, automaticamente, por temporizador para fotoperíodo (correspondente a cada cultura); sistema automático de manutenção da umidade para 70% e estantes para receber as grades com os testes dos produtos inoculantes;

II - para a casa de vegetação:

a) a manutenção da limpeza da casa de vegetação é crucial para o sucesso dos testes desenvolvidos e o processo de nodulação é prejudicado por temperaturas elevadas (acima de 28-30°C nos vasos), sendo, portanto, necessário que a casa de vegetação disponha de sistema de refrigeração;

b) a pintura de seus vidros com tinta branca ou uso de sombrites 65-70% permite suficiente luminosidade e atenua o problema da temperatura elevada durante o verão.

Art. 15. Para o Cálculo do Número de Células de Rizóbios, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - uma vez decorrido o prazo para formação de nódulos, no sistema de cultivo em tubos, sacos de polietileno, frascos de vidro ou vasos de Leonard, verifica-se o número de unidades com resultado positivo de nodulação;

II - a presença de pelo menos um nódulo no sistema radicular da unidade teste lhe confere resultado positivo e três diluições (D1, D2 e D3) serão adotadas para fins de cálculo, sendo que as diluições subsequentes à última não deverão apresentar nenhuma unidade teste positiva;

III - o número de unidades teste positivas de cada diluição, observando a coluna para D1, D2 e D3 da Tabela 3, indicará o fator NMP de células de rizóbio;

IV - o número de rizóbios por grama ou mililitro de inoculante é calculado pela manifestação de nodulação nas repetições das três diluições adotadas (D1, D2 e D3), por meio da seguinte fórmula:

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

na qual:

f = fator NMP da Tabela 3;

d = menor diluição da série empregada, antes da diluição que apresentar todos os tubos negativos;

V - o intervalo de confiança para o NMP será determinado por meio do cálculo multiplicando-se a menor diluição adotada (D1) pelos valores correspondentes do intervalo de confiança mínimo (IC mín.) e intervalo de confiança máximo (IC máx.).

Art. 16. Para o Método do Número Mais Provável (NMP) para diazotróficas associativas e endofíticas, deve ser observado o seguinte:

I - o NMP é um processo indireto de contagem de micro-organismos que envolve a inoculação, geralmente de 0,1mL, de diluições seriadas do produto inoculante, em frascos de aproximadamente 10mL contendo por volta de 5mL de meio semissólido semisseletivo para um determinado grupo, gênero ou espécie alvo (Tabela 1), com 3 ou 5 repetições;

II - este método pressupõe que a formação de película característica dos organismos diazotróficos associativos confere caráter positivo ao teste, enquanto que a ausência confere caráter negativo a este e para eficácia do teste a última diluição tem de apresentar todas as repetições negativas, evitando a substituição do resultado;

III - a partir da inoculação, o teste demanda cinco a doze dias para sua conclusão e se vale da Tabela 4(A e B) para a estimativa do número de bactérias no produto inoculante; e

IV - a Tabela 04, de McCrady, abaixo, utilizada para a estimativa do número mais provável (NMP), conforme Pochon & Tardieux (1957):

Tabela 04

A - 3 tubos/diluição			
Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos
000	0,0	222	3,5
001	0,3	223	4,0
010	0,3	230	3,0
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4,0
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4,0
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
120	1,1	312	11,5
121	1,4	313	16,0
130	1,6	320	9,5
200	0,9	321	15,0
201	1,4	322	20,0
202	2,0	323	30,0
210	1,5	330	25,0
211	2,0	331	45,0
212	3,0	332	110,0
220	2,0	333	140,0
221	3,0		
B - 5 tubos/diluição			
Diluição com crescimento	Número de diazotróficas	Diluição com crescimento	Número de diazotróficas
000	0,0	400	1,3
001	0,2	401	1,7
002	0,4	402	2,0
010	0,2	403	2,5
011	0,4	410	1,7
012	0,6	411	2,0
020	0,4	412	2,5
021	0,6	420	2,0
030	0,6	421	2,5
100	0,2	422	3,0
101	0,4	430	2,5
102	0,6	431	3,0
103	0,8	432	4,0
110	0,4	410	3,5
111	0,6	441	4,0
112	0,8	450	4,0
120	0,6	451	5,0
121	0,8	500	2,5
122	1,0	501	3,0
130	0,8	502	4,0
131	1,0	503	6,0
140	1,1	504	7,5
200	0,5	510	3,5
201	0,7	511	4,5
202	0,9	512	6,0
203	1,2	513	8,5
210	0,7	520	5,0
211	0,9	521	7,0
212	1,2	522	9,5
220	0,9	523	12,0
221	1,2	524	15,0
222	1,4	525	17,5
230	1,2	530	8,0
231	1,4	531	11,0
240	1,4	532	14,0
300	0,8	533	17,5
301	1,1	534	20,0
302	1,4	535	25,0
310	1,1	540	13,0
311	1,4	541	17,0
312	1,7	542	25,0
313	2,0	543	30,0
320	1,4	544	35,0
321	1,7	545	45,0
322	2,0	550	25,0
330	1,7	551	35,0
331	2,0	552	60,0
340	2,0	553	90,0
341	2,5	554	160,0
350	2,5	555	180,0

Art. 17. Para o cálculo do número de células de bactérias associativas e endofíticas, deve ser observado o seguinte:

I - uma vez decorrido o prazo determinado, verifica-se o número de unidades (frascos) com resultado positivo em cada diluição e, adotando-se, para fins de cálculo, três diluições (D1, D2 e D3), sendo que as diluições subsequentes à última não deverão apresentar nenhuma unidade teste positiva; e

II - o número de células por grama ou mL de inoculante é calculado por meio da seguinte fórmula:

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

na qual:

n = NMP de acordo com a Tabela 4;

d = Menor diluição da série empregada;

f = Fator de diluição (dez, no caso de inoculação de 0,1 mL nos frascos com meio semissólido).

Art. 18. Para o Teste de Pureza dos Inoculantes, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - a avaliação da pureza dos inoculantes deverá ser realizada pelo método do espalhamento em placas de Petri;



II - a alíquota de 0,1 mL da diluição em  $10^{-5}$  é inoculada na superfície de meios de cultura específicos para cada organismo, em placas de Petri, e esse inóculo deve ser uniformemente distribuído na superfície do meio, usando-se para isso um bastão de vidro com uma extremidade em triângulo (alça de Drigalski), sendo que deverão ser feitas três repetições das análises A e B;

III - a incubação deve ser feita na faixa de 28°C a 30°C para rizóbios, ou na temperatura recomendada para os micro-organismos declarados em outros produtos inoculantes e a primeira observação, para acompanhar o eventual desenvolvimento de colônias de outros micro-organismos deverá ser efetuada diariamente a partir do 2º dia da incubação;

IV - especificamente no caso dos rizóbios, será empregado o meio 79 com o corante vermelho Congo e como, de uma forma geral, estes micro-organismos não absorvem o corante em questão, o aparecimento de colônias avermelhadas será tido como indicativo de contaminação;

V - na impossibilidade de emprego de um meio diferencial ou corante que permita distinguir prontamente colônias das estirpes do inoculante de eventuais contaminantes, a diferenciação deve ser feita pela análise criteriosa das características morfofisiológicas da colônia da bactéria alvo; e

VI - caso a análise morfológica não seja suficiente para separação das colônias de contaminantes e nos casos em que colônias avermelhadas pelo corante vermelho Congo apresentem as mesmas características morfofisiológicas das colônias da estirpe de rizóbio do produto, testes complementares de identidade deverão ser realizados, sendo que estes podem envolver desde exame microscópico, testes bioquímicos, sorologia até testes moleculares, dependendo da necessidade.

Art. 19. Para a Identificação das Estirpes por Soroaglutinação Direta, deve ser observado o seguinte:

I - a caracterização rápida das estirpes presentes no inoculante está fundamentada no fato de que uma suspensão de bactérias do produto, que seria o antígeno, aglutina especificamente com o antissoro da estirpe que deu origem ao inoculante;

II - o laboratório deverá dispor das estirpes autorizadas para a fabricação de inoculantes e possuir os soros específicos (antissoro) referentes às estirpes autorizadas para a identificação sorológica das estirpes que constituem os inoculantes;

III - a verificação do título do antissoro consiste em fazer reagir diluições sucessivas do antissoro com o antígeno homólogo e, em todas as 96 cavidades de uma microplaca, distribuem-se 50 µL de solução fisiológica;

IV - na primeira coluna colocam-se 50 µL de soro diluído 1:100 e na segunda coluna acrescenta-se o soro a ser testado e dilui-se, transferindo-se 50 µL da segunda para a terceira coluna e assim sucessivamente, até a décima segunda coluna;

V - na décima segunda cavidade descartam-se os 50 µL de solução e acrescentam-se 50 µL de solução antigênica conforme o respectivo soro a ser testado;

VI - após a vedação das microplacas, agita-se por 5 minutos em agitador orbital e deixa-se à temperatura ambiente por 24 horas para verificação da leitura do título e são utilizados os soros com título mínimo de 1:512;

VII - o antígeno é preparado a partir da inoculação de dois tubos com meio de cultura em bisel (A e B), contendo meios específicos para a bactéria do produto inoculante, de uma alíquota de 400 µL do produto líquido ou da diluição  $10^{-1}$  do produto inoculante turfos e, também, poderá ser preparado a partir do raspado de várias colônias crescidas nas placas de Petri da contagem e inoculação nos tubos com os meios específicos;

VIII - após o crescimento da massa celular nos tubos (2 a 5 dias de incubação em estufa bacteriológica a 28°C), é preparada a solução antigênica para o teste de soroaglutinação direta, sendo que se adiciona o volume de 3,0 a 4,0 mL de solução fisiológica e procede-se à raspagem da massa celular assepticamente, tomando-se o cuidado de não ferir o meio de cultura;

IX - esta suspensão de bactérias é transferida para outro tubo de ensaio esterilizado e levado para a fervura em banho-maria (100°C) por 30 minutos a fim de romper a parede celular bacteriana;

X - para cada teste de soroaglutinação, também, deverão ser preparadas suspensões antigênicas com as culturas puras das estirpes autorizadas para a produção do inoculante (testemunha ou controle positivo do teste sorológico) e, após a fervura, a suspensão bacteriana é diluída com solução fisiológica para atingir a concentração na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  (conforme a escala de McFarland) e está pronta para ser utilizada;

XI - para a elaboração do teste soroaglutinação direta, são utilizados: solução fisiológica, o soro controle negativo (obtido de coelho que não foi inoculado com nenhuma estirpe), os antissoros específicos para o reconhecimento das estirpes autorizadas para a produção do inoculante em questão, as suspensões antigênicas das culturas puras e a suspensão antigênica obtida do inoculante a ser testado;

XII - o soro a ser utilizado é diluído 1:100 em solução fisiológica esterilizada e distribui-se em cada coluna de uma microplaca de 96 cavidades 50 µL de cada antissoro (específico por estirpe e do controle negativo);

XIII - na coluna seguinte à do soro controle negativo, são distribuídos 50 µL de solução fisiológica e, a estas cavidades preenchidas, acrescentam-se 50 µL da solução antigênica (das estirpes puras e do inoculante a ser testado) em cada linha; e

XIV - homogeneiza-se de 1 a 5 minutos em agitador orbital, veda-se com tampa ou parafilme, leva-se ao banho-maria a aproximadamente 56°C e é realizada a leitura após 2 horas ou deixa-se a placa vedada à temperatura ambiente para proceder à leitura após 24 horas, sendo que o teste é realizado em duplicata.

Art. 20. Para a leitura do resultado do teste de soroaglutinação, deve ser observado o seguinte:

I - a reação é considerada positiva se houver a presença de aglutinação (formação de grumos no fundo da placa) e negativa quando houver a formação de um ponto branco (botão) no fundo da cavidade da placa;

II - para que o teste seja considerado válido, os controles positivos (suspensões antigênicas das estirpes puras) deverão apresentar formação de grumos (reação positiva), e os controles negativos (soro negativo e solução fisiológica) não devem apresentar grumos no fundo da cavidade da placa; e

III - há casos raros de autoaglutinação da bactéria em presença de eletrólitos e, nesse caso, a aglutinação vai ser observada em todas as diluições e, até mesmo, nos controles negativos.

Art. 21. Para a Identificação por Técnicas da Biologia Molecular, devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - as análises para a obtenção dos perfis de BOX-PCR são realizadas, preferencialmente, com o DNA extraído das bactérias crescidas em caldo, e as análises também podem ser feitas diretamente utilizando colônias puras ou meio líquido;

II - para a extração do DNA, as bactérias podem ser colocadas para crescer em 5 a 20 mL de meio 79 por 3 a 10 dias, dependendo da taxa de crescimento, que pode ser de rápida (3 dias) a muito-lenta (10 dias), a 150 a 200 rpm, em temperatura de, aproximadamente, 28°C, com incubação no escuro;

III - as bactérias também podem ser colocadas em outros meios que se mostrem adequados para o crescimento, por exemplo, o meio "triptona-extrato de levedura" (TY, tryptone-yeast, contendo, em 1 litro: 5,0 g de triptona; 3,0 g de extrato de levedura;  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,87 g; completado com água deionizada e pH ajustado a 6,8 a 7,2; Somasegaran & Hoben, 1994), útil no caso de bactérias apresentando grande produção de exopolissacarídeos;

IV - após o período de crescimento, centrifugar as suspensões bacterianas a, aproximadamente, 10.000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos e descartar o sobrenadante, e todas as soluções utilizadas para a extração do DNA devem ser previamente autoclavadas;

V - ressuspender o pélete e lavar por três vezes, com 5 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85%) podendo, ainda, no caso de bactérias com grande produção de exopolissacarídeos, fazer uma última lavagem com solução salina tamponada de fosfato (PBS 1 X, contendo, em 500 mL: 4,383 g de NaCl 150 mmol.L<sup>-1</sup>; 0,1793 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2,6 mmol.L<sup>-1</sup>; 1,36 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  7,6 mmol.L<sup>-1</sup>);

VI - centrifugar e descartar o sobrenadante e, depois da última lavagem, acrescentar 1,0 mL de solução fisiológica ou PBS, homogeneizar e transferir o pélete para um tubo de ensaio de vidro ou outro recipiente;

VII - ajustar a concentração de células a, aproximadamente,  $10^9$  células.mL<sup>-1</sup>, pela adição de solução fisiológica e calibração, que pode ser efetuada utilizando diferentes métodos, incluindo leitura da densidade ótica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 a 540 nm (caso a curva de crescimento da bactéria já tenha sido determinada), ou por leitura em câmaras de contagem de Petroff-Hausser ou Neubauer ou, ainda, visualmente, utilizando padrões de soluções de McFarland de sulfato de bário (Somasegaran & Hoben, 1994);

VIII - transferir aproximadamente 1,4 a 1,5 mL para um ou outro tubo de PCR de 1,7 ou 2,0 mL de capacidade (no tubo de 1,7 mL a visualização do pélete é mais fácil), centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente (21 a 23°C) e descartar o sobrenadante;

IX - em seguida, ressuspender o precipitado em 400 µL de TE 50:20 (50 mmol.L<sup>-1</sup> de Tris, pH 8; 20 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8), adicionar 50 µL de SDS a 10% (10 g de dodecil sulfato de sódio em 100 mL de água), 10 µL de proteinase K (10 mg.mL<sup>-1</sup>, mantida no congelador), 10 µL de lisozima (5 mg.mL<sup>-1</sup>, mantida no congelador), 2 µL de RNase (10 mg.mL<sup>-1</sup>, mantida conforme especificação do fabricante) e, então, incubar a 37°C por, aproximadamente, 1 hora (ou até que o material se torne mais claro);

X - na sequência, as amostras podem ser homogeneizadas com ponteiros de 1 mL com a ponta cortada (aspirar e soltar o material bem lentamente), por três vezes, para retirar a viscosidade e, a seguir, acrescentar 30 µL de NaCl 5 mol.L<sup>-1</sup> (resultando em uma concentração final de 250 mmol.L<sup>-1</sup>), 70 µL de  $\text{AcONa}_3$  mol.L<sup>-1</sup> (concentração final de 300 mmol.L<sup>-1</sup>) e 28 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura estéril;

XI - as amostras devem ser bem homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora em refrigerador (aproximadamente 8°C) e, em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos, em temperatura ambiente;

XII - recolher 300 µL do sobrenadante de cada amostra e adicionar 600 µL (ou 2 volumes, no caso de menor volume de sobrenadante) de etanol puro (95 a 99%) gelado (aproximadamente -20°C) armazenando-se, então, por uma noite, a -20°C e, no dia seguinte, centrifugar as amostras a 12.000 rpm durante 15 minutos, em temperatura ambiente, descartar o etanol e adicionar 400 µL a 1000 µL de etanol a 70% (gelado), visando lavar bem o pélete e retirar o excesso de sais; e

XIII - centrifugar novamente a 12.000 rpm durante 5 minutos, em temperatura ambiente, descartar o etanol e secar os precipitados, também em temperatura ambiente por, aproximadamente, 3 horas e ressuspender os precipitados em 50 µL de água ultrapura estéril ou TE 10:1 (10 mmol.L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8; 1 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8), ambos previamente esterilizados, sendo que as amostras podem ser armazenadas a -20°C, mas a qualidade do DNA sempre deve ser verificada antes de cada análise.

Art. 22. Para a verificação da qualidade do DNA, deve ser observado o seguinte:

I - para confirmar a concentração e pureza do DNA, as amostras podem ser submetidas à eletroforese em minigel de ágarose de 10 x 11 cm a 1,0% [0,4 g de ágarose em 40 mL de TBE 1X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA, 0,5 M, ajustado em pH 8, para cada litro de solução)];

II - aplicar a amostra, utilizando 2 µL da amostra, adicionados a 2 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol) e submeter à eletroforese durante 40 minutos a 80 V; como essa é apenas uma etapa de verificação, outros tamanhos de géis, bem como o tempo e a voltagem, podem ser alterados;

III - a concentração do DNA pode ser verificada por comparação com padrões de peso molecular conhecidos, por exemplo, LambdaTM (InvitrogenTM) ou Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM), ou outro padrão similar;

IV - a pureza do DNA deve ser verificada após a coloração com brometo de etídio (40 µL do estoque a 1% em 800 mL de água destilada) e visualização em um transluminador sob radiação ultravioleta de comprimento de onda curto, ou pelo uso de outro corante que tenha a mesma finalidade, adequando os filtros e comprimentos de onda para esse corante; e

V - equipamentos de quantificação de DNA também podem ser utilizados e a pureza do DNA pode ser verificada, no gel, pela observação de uma única banda de DNA, sem qualquer tipo de arraste; no caso de leitura em espectrofotômetro, a relação das leituras nos comprimentos de onda 260/280 nm deve ficar entre 1,8 e 2,0; e a concentração do DNA deve ser ajustada para a concentração desejada, recomendando-se 50 ng.µL<sup>-1</sup>, usando água ultrapura esterilizada como diluente.

Art. 23. Em relação à Técnica de BOX-PCR, deve ser observado o seguinte:

I - para a amplificação do DNA, utilizar o primer (oligonucleotídeo) BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994; Koeuth et al., 1995), com as reações de amplificação efetuadas conforme as modificações especificadas por Fernandes et al. (2003) e Kaschuk et al. (2006);

II - visando à uniformização para a obtenção de perfis idênticos, a reação de amplificação deverá ser conduzida em um volume final de 25 µL, contendo: água ultrapura esterilizada, 13,8 µL; dNTPs, 5,0 µL (estoque com 1,5 mmol.L<sup>-1</sup> de cada base); tampão 10X (500 Mm KCl; 200 Mm Tris-HCl, pH 8,4), 2,5 µL; MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL (50 mmol.L<sup>-1</sup>); oligonucleotídeo, 1,0 µL (50 pmol.µL<sup>-1</sup>); DNA, 1,0 µL (50 ng.µL<sup>-1</sup>); Taq, 0,2 µL (5 U.µL<sup>-1</sup>), sendo que as concentrações podem ser ajustadas no caso de reagentes com concentrações distintas;

III - incluir sempre tubos-controle, sendo um negativo, apenas com os reagentes e sem DNA (para verificar possíveis contaminações), e um positivo contendo a estirpe padrão de comparação;

IV - a amplificação será realizada usando a seguinte programação: uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 30 a 35 ciclos intermediários de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); uma etapa de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C;

V - para DNA extraído, 30 ciclos intermediários são suficientes, enquanto, para células ou colônias, recomendam-se 35 ciclos (Versalovic et al., 1994);

VI - depois da amplificação, adicionar, aos 25 µL de cada reação, 5 µL de tampão (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol) e preparar um gel de ágarose (low EEO, type I-A) de, aproximadamente, 20 X 25 cm a 1,5%, diluído em tampão TBE 1X (10,8 g de Trisma-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA Na<sub>2</sub> 0,5 M; pH 8,0 em 1 L de água destilada); adicionar 250 mL da solução à bandeja da cuba de eletroforese;

VII - nas canaletas do gel, colocar 30 µL de cada amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e, preferencialmente, também da central, nas quais devem ser colocados 5 µL de padrão, por exemplo, do padrão de peso molecular de 1 kb plus DNA Ladder™ (Invitrogen™), ou outro padrão similar;

VIII - para preparar o padrão de 1 kb plus DNA Ladder™, para cada 1 µL do marcador, adicionar 2 µL de tampão de amostra e 7 µL de água ultrapura esterilizada; desse modo, a aplicação de 5 µL corresponde a 0,5 µg de padrão;

IX - aplicar a voltagem de 120 V (aproximadamente 5 V.cm<sup>-1</sup>) e correr à temperatura ambiente por, aproximadamente, 6h30min (entre 6 e 7 h), até que falem cerca 2 cm para o final do gel;

X - o tamanho e volume do gel e a voltagem devem ser rigorosamente padronizados; corar o gel conforme descrito nesta metodologia para a verificação da qualidade do DNA; visualizar em transiluminador e fotografar; e

XI - como padrão de comparação para as condições de amplificação e equipamentos de cada laboratório, recomenda-se utilizar, nas corridas, a estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (=CPAC 15), sendo que se recomenda que bandas de peso molecular (PM) iguais ou superiores a 12.000 e inferiores a 300 pares de base (pb) não sejam consideradas, pois apresentam maior variabilidade e podem representar falsos produtos de PCR.

Art. 24. Para as estirpes que apresentarem Perfis Idênticos por BOX-PCR, deve ser observado o seguinte:

I - no caso de estirpes apresentando o mesmo perfil de BOX-PCR, podem-se obter, em caso de necessidade de comprovação de identidade, os perfis de ERIC-PCR ou REP-PCR; para a amplificação, utilizar-se-ão os pares de primers (REP 1R e REP 2I; ERIC 1R e ERIC 2) descritos por de Bruijn (1992) e Versalovic et al. (1991, 1994), como se segue:

- REP 1R - 5'-IIIICGICGICATCIGGC- 3';
- REP 2I - 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3';
- ERIC 1R - 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; e
- ERIC 2 - 5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3';

II - a extração de DNA e verificação da pureza serão realizadas conforme descrito para BOX-PCR e para a reação de amplificação, utilizar as mesmas concentrações recomendadas para BOX-PCR, exceto que, pela utilização de dois primers, adicionando 1 µL de cada primer (50 pmol.µL<sup>-1</sup>), o volume final de 25 µL levará 1 µL a menos de água ultrapura esterilizada;

III - a reação de amplificação será realizada segundo de Bruijn (1992) e Versalovic et al. (1994), com as modificações efetuadas por Santos et al. (1999), resultando na programação descrita a seguir: REP 1R e REP 2I: uma etapa a 95°C por 7 min.; 30 a 35 ciclos a 94°C por 1 min., a 53°C por 1 min. e a 65°C por 8 min; uma etapa final de extensão a 65°C por 16 min., mantendo-se, então, a 4°C; e

IV - para os primers ERIC 1R e ERIC 2, a programação será de: uma etapa de 95°C por 7 min.; 30 a 35 ciclos a 94°C por 1 min, a 52°C por 1 min. e a 65°C por 8 min; uma etapa final de extensão a 68°C por 16 min, mantendo-se, então, a 4°C, realizando a corrida de eletroforese conforme descrito para BOX-PCR.

Art. 25. Para a recuperação e quantificação de bactérias em sementes inoculadas, deve ser observado o seguinte:

I - Método 1 - Recuperação e quantificação de *Bradyrhizobium* em sementes inoculadas (RELARE, 2007):

a) efetuar o tratamento das sementes (quando for o caso) e a inoculação, deixar secar por um período de até 4 horas, registrar a umidade do ar e a temperatura do local; esta operação deve ser efetuada, preferencialmente, com umidade do ar superior a 45% e temperatura entre 20 e 30°C;

b) tomar amostras de 100 sementes (considerando o peso de 100 sementes da cultivar) e colocar em erlenmeyer A esterilizado, com 90 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85%);

c) adicionar 2 a 3 gotas de Tween 80 (polioxietilenorbitano monolaurato) e agitar por 15 minutos (primeira lavagem);

d) agitar manualmente e transferir a suspensão do erlenmeyer A para o erlenmeyer B, também esterilizado, com capacidade mínima de 250 mL;

e) adicionar outros 90 mL de solução fisiológica com 2 a 3 gotas de Tween 80 ao erlenmeyer A e agitar por 15 minutos (segunda lavagem);

f) agitar manualmente e transferir a suspensão para o erlenmeyer B;

g) completar o volume do erlenmeyer B com solução fisiológica, totalizando 200 mL;

h) tomar alíquotas de 10 mL da suspensão (erlenmeyer B) e colocar em erlenmeyer C esterilizado contendo 90 mL de solução fisiológica e agitar para obter a diluição 10<sup>-1</sup>;

i) tomar alíquota de 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup>, colocar em frasco estéril com 9 mL de solução fisiológica, obtendo a diluição 10<sup>-2</sup>;

j) repetir a operação anterior até obter a diluição 10<sup>-6</sup>;

k) a contagem deve ser feita em placas de Petri por meio da técnica do espalhamento utilizando-se o meio de cultura semisseletivo Ikuta (arts. 38 e 39);

l) incubar as placas em estufa a 28-30°C por 10-12 dias, realizar a contagem das placas, registrar o resultado e, no caso de presença de contaminação, recorrer à contagem sob lupa para facilitar o reconhecimento das colônias da(s) estirpe(s) utilizada(s) no inoculante;

m) para contagem, deve ser considerada a diluição cuja média de contagem das três placas estiver na faixa entre 30 e 300 UFC e, se nenhuma das diluições sucessivas estiverem dentro dessa faixa, calcular a média das duas diluições mais próximas da faixa de contagem;

n) caso uma das repetições apresente discrepância acima de 50% da média das outras duas placas, esta não deve ser considerada no cálculo da média;

o) o número de bactérias recuperadas das sementes é dado pela seguinte fórmula:

Nº de células recuperadas/semente = f x N x 200 / 100, na qual:

f = fator de diluição;

N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada;

200 = volume total da solução de lavagem;

100 = número de sementes;

p) o fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa multiplicada por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL; e

q) como exemplo, considerando-se a inoculação de 0,1 mL das diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>, o cálculo pode ser efetuado empregando-se os seguintes fatores constantes da Tabela 05 a seguir:

Tabela 05

Diluição	Fator (f)	Nº de células recuperadas/semente
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>3</sup>	N x 10 <sup>3</sup>
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>4</sup>	N x 10 <sup>4</sup>
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>5</sup>	N x 10 <sup>5</sup>

II - Método 2 - Recuperação e quantificação de Rizóbios em sementes inoculadas (Penna et al., 2004):

a) efetuar o tratamento das sementes (quando for o caso) e a inoculação em 500 a 1000 gramas de sementes, quando se tratar de inoculante líquido e em mais de 1000 gramas de sementes quando o inoculante for turfoso e registrar a umidade do ar e a temperatura do local; esta operação deve ser efetuada, preferencialmente, com umidade do ar superior a 45% e temperatura entre 20 e 30°C;

b) opcionalmente, o teste pode ser efetuado em amostras com menor peso de sementes, especialmente para sementes pequenas;

c) para inoculação, colocar as sementes em uma bolsa de polietileno com capacidade três vezes maior que o volume ocupado pelas sementes a serem tratadas e acrescentar as quantidades dos produtos nas sementes, deixar um volume de ar equivalente ao ocupado pelas sementes, fechar a bolsa e misturar com movimentos rotatórios para a correta distribuição dos produtos nas sementes; logo após, transferir as sementes tratadas para uma bandeja e deixar secar por um período de duas horas;

d) tomar amostras de 100 sementes (considerando o peso de 100 sementes da cultivar) e colocar em erlenmeyer esterilizado com capacidade de 250-300 mL, contendo 100 mL de solução fisiológica com Tween 80 (polioxietilenorbitano monolaurato), preparada com a adição de 0,4 mL de solução estoque de Tween 80 em um litro de solução fisiológica (NaCl a 0,85%);

e) colocar o erlenmeyer em agitador orbital pelo período de 15 minutos (esta diluição representa 10<sup>0</sup>);

f) tomar alíquota de 1,0 mL da diluição 10<sup>0</sup>, colocar em frasco esterilizado com 9,0 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), obtendo a diluição 10<sup>-1</sup> e repetir a operação anterior até obter a diluição 10<sup>-4</sup>;

g) inocular, em triplicata, 0,1 mL das diluições, por meio da técnica do espalhamento, em placas de Petri contendo o meio 79 com vermelho Congo, vancomicina e actidione, como descrito no art. 40;

h) incubar as placas em estufa a 28-30°C por sete dias; marcar e contar as unidades formadoras de colônias e registrar o número contado e, no caso de presença de contaminação, recorrer a contagens sob lupa para facilitar o reconhecimento das colônias da(s) estirpe(s) utilizada(s) no inoculante;

i) para contagem, deve ser considerada a diluição cuja média de contagem das três placas estiver na faixa entre 30 e 300 UFC e, se nenhuma das diluições sucessivas estiverem dentro dessa faixa, calcular a média das duas diluições mais próximas da faixa de contagem;

j) caso uma das repetições apresente discrepância acima de 50% da média das outras duas placas, esta não deve ser considerada no cálculo da média;

k) o número de bactérias recuperadas das sementes é dado pela fórmula:

Nº de células recuperadas/semente = f x N, na qual:

f = fator de diluição e N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada;

l) o fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa multiplicada por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL; e

m) Como exemplo, considerando-se a inoculação de 0,1 mL das diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup>, o cálculo pode ser efetuado empregando-se os seguintes fatores da tabela 06 abaixo:

Tabela 06

Diluição	Fator (f)	Nº de células recuperadas/semente
10 <sup>-2</sup>	10 <sup>3</sup>	N x 10 <sup>3</sup>
10 <sup>-3</sup>	10 <sup>4</sup>	N x 10 <sup>4</sup>
10 <sup>-4</sup>	10 <sup>5</sup>	N x 10 <sup>5</sup>

§ 1ª Alternativamente nos Métodos 1 e 2 constantes dos incisos I e II deste artigo poderá ser utilizada a metodologia da gota (drop plate) para a inoculação das placas e respectiva contagem (RELARE, 2007).

§ 2ª Essa metodologia consiste na inoculação de uma gota de aproximadamente 30 µl, por setor, das diluições seriadas a serem avaliadas na superfície dos meios de cultura especificados (métodos I e II) em placas de Petri; as placas deverão ser divididas em seis setores, utilizando-se dois setores da placa por diluição.

§ 3ª A inoculação é realizada através da gota de cada diluição, em três placas distintas, obtendo-se seis repetições por diluição; após a absorção do inóculo, as placas deverão ser colocadas invertidas em estufa a 28°C a 30°C pelo período de 7 a 12 dias, quando então será efetuada a contagem de UFC da diluição que apresentar de 10 a 30 UFC por gota.

§ 4ª O cálculo do número de células recuperadas por semente será efetuado conforme descrito nos métodos I e II, substituindo o valor 10 (referente ao uso de 0,1 mL) da metodologia do espalhamento pelo valor de 33,33, correspondente à alíquota de 30 µl empregada.

Art. 26. Para os meios de cultura, o preparo das soluções de micronutrientes (solução A), vitaminas (solução B), Tween 80, Vancomicina e Actidione, empregadas em alguns dos meios de cultura, é o seguinte:

I - Solução A (micronutrientes), com os seguintes componentes:

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,2 g

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O.....0,235 g



H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	0,28 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,008 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,024 g
Águadestilada.....	200 mL

## II - Solução B (vitaminas):

## a) componentes:

Biotina.....	10 mg
Piridoxina.....	20 mg
Águadestilada.....	100 mL

## b) dissolver em banho-maria e manter em refrigerador;

## III - Solução estoque de Tween 80 (2,5 % p/v), com os seguintes componentes:

Tween 80 .....	5,0 g
Águadestiladaqsp.....	200 mL

## IV - Solução estoque de Vancomicina (cloridrato de vancomicina):

## a) componentes:

Cloridrato de vancomicina.....	0,009 g
Água destilada qsp.....	3,0 mL

## b) procedimento: filtrar a solução em membrana esterilizante de 0,20 µm;

## V - Solução estoque de Actidione (ciclohexamida):a) componentes:

Ciclohexamida.....	25 mg
Álcool etílico.....	300 µL

## b) filtrar a solução em membrana esterilizante de 0,20 µm.

Art. 27. Para o Meio de cultura 79 ou YMA (Yeast, Manitol, Ágar) com o corante Vermelho Congo (CRYMA - Congo Red, Yeast, Manitol, Ágar) Fred & Waksman (1928), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

1. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
2. MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
3. NaCl.....	0,1 g
4. Manitol.....	5,0 a 10 g
5. Extrato de levedura.....	0,4 g
6. Ágar-ágar.....	10,0 a 15,0 g
7. Água destilada.....	1000 mL
8. Solução de Vermelho Congo.....	10 mL

## II - procedimentos:

a) para o preparo da solução de vermelho Congo, dissolver 0,25 g em 100 mL de água destilada;

b) preparo do meio: dissolver os componentes na ordem indicada na formulação e ajustar o pH na faixa de 6,8 a 7,0; utilizar solução de NaOH 0,1 M para elevar o pH e solução de HCl 0,1 M para baixar o pH do meio de cultura;

c) para facilitar a distribuição nas placas, o meio deve ser esterilizado em recipientes contendo 250 mL cada, realizando a esterilização a 121°C em 1,0 atmosfera por 20 minutos e a distribuição assepticamente, na base de 15 - 30 mL/placa.

Art. 28. Para o Meio Batata (Baldani & Döbereiner, 1980), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Batata.....	200 g
Ácido málico.....	2,5 g
Açúcar cristal.....	2,5 g
Solução A (micronutrientes) .....	2,0 mL
Solução B (vitaminas).....	1,0 mL
Ágar.....	15 a 18 g

## II - procedimentos:

a) descascar, pesar, cortar, lavar e colocar as batatas para ferver em aproximadamente 500 mL de água destilada até o seu completo cozimento;

b) paralelamente colocar 2,5 g de ácido málico em 50 mL de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol (solução 0,5% em KOH 0,2 mol. L<sup>-1</sup>), colocando aos poucos KOH até ficar com pH 6,8-7,0 (verde) e adicionar 2,5 g de açúcar cristal, 2,0 mL de solução de micronutrientes e 1,0 mL de solução de vitaminas;

c) filtrar em algodão a água de cozimento da batata e, a seguir, juntar ao filtrado a solução de ácido málico, açúcar cristal, micronutrientes e vitaminas;

d) completar para 1000 mL com água destilada e colocar o ágar por último.

Parágrafo único. Para preparar o meio batata com vermelho Congo, usar 5,0 mL de solução de vermelho Congo (sol. 0,25%) por litro de meio de cultura.

Art. 29. Para o Meio Batata - P (Cavalcante e Döbereiner, 1988), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Batata.....	200,0 g
Açúcar cristal.....	100,0 g
Solução A (micronutrientes).....	2,0 mL
Solução B (vitaminas).....	1,0 mL
Ágar.....	15 a 18 g

## II - procedimentos:

a) pesar a batata, descascar, lavar, cortar e colocar para ferver por meia hora;

b) filtrar a batata com algodão;

c) adicionar, ao filtrado, 100 g de açúcar cristal, 2,0 mL de micronutrientes para meio de cultura, 1,0 mL de vitamina para meio de cultura;

d) completar o volume para 1000 mL com água destilada;

e) ajustar o pH para 5,5 com ácido acético sol. 10 %.

Art. 30. Para o Meio JMV (Baldani, 1996), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Manitol.....	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (solução a 10%).....	6,0 mL
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (solução a 10%).....	18,0 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O(solução a 10%).....	2,0 mL
NaCl (solução a 10%).....	1,0 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O (solução a 1%).....	2,0 mL
Azul de bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH).....	2,0 mL
FeEDTA(solução a 1,64%).....	4,0 mL
Solução A (micronutrientes).....	2,0 mL
Solução B (vitaminas).....	1,0 mL
Extrato de levedura...8 g (meio sólido) / 1,9 a 2,0 g (meio semissólido)	

II - Procedimentos: ajustar o pH para 5,0 - 5,4, completar a solução para 1000 mL com água destilada e adicionar o ..

Art. 31. Para o Meio JNFb (Herbaspirillum spp.) (Döbereiner, 1991), deve ser observado:

## I - componentes:

Ácido Málico.....	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
Solução A (micronutrientes).....	2 mL
B (vitaminas).....	1 mL
Fe EDTA Solução 1,64%.....	4 mL
Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH).....	2 mL
Ágar.....	15 a 18 g (meio sólido) / 1,8 a 2,0 g (meio semissólido)

## II - procedimentos:

a) ajustar o pH para 5,8 com KOH e completar o volume para 1000 mL com água destilada;

b) colocar as substâncias na ordem indicada; e

c) adicionar 50 mg de extrato de levedura para o meio sólido.

Art. 32. Para o Meio de Cultura LGI (A. amazonense) (Magalhães et al., 1983), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Sacarose ou Açúcar Cristal.....	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,6 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,002 g
Azul de Bromotimol (Sol. 0,5% em Etanol).....	5 mL
FeEDTA (Sol. 1,64%).....	4 mL
Solução B (vitaminas).....	1 mL
Ágar.....	15 a 17 g (meio sólido) / 1,7 a 1,8g (meio semissólido)

## II - procedimentos:

a) ajustar o pH para 6,0 a 6,2 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e completar o volume para 1000 mL com água destilada; e

b) adicionar 50 mg de extrato de levedura para o meio sólido.

Art. 33. Para o Meio de Cultura LG (Azotobacter spp. e Azomonas spp.) (Lipman, 1904), deve ser observado:

## I - componentes:

Sacarose ou Açúcar Cristal.....	20,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	15 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,20 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,002 g
FeCl <sub>3</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,01 g
Azul de Bromotimol (Sol. 0,5% em Etanol).....	5 mL
CaCO <sub>3</sub> .....	1,00 g

II - procedimentos: completar o volume para 1000 mL com água destilada, ajustar o pH para 7,0 com NaOH e adicionar 15 g de ágar.

Art. 34. Para o Meio FAM (Azospirillum amazonense) (Magalhães, 1983), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Sacarose.....	5,00 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O.....	0,04 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,12 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
NaCl.....	0,1 g
FeEDTA (1,64%).....	4,0 mL
Solução B (vitaminas).....	1,0 mL
Solução A (micronutrientes).....	2,0 mL
Água destilada.....	1.000 mL
Ágar.....	15 a 18 g (meio sólido) / 1,7 a 1,8g (meio semissólido)

## II - procedimentos:

a) ajustar pH para 6,0; e

b) adicionar 200 mg de extrato de levedura para o meio sólido.

Art. 35. Para o Meio NFb (Azospirillum spp) (Döbereiner, 1991), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Ácido Málico.....	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
Solução B (vitaminas).....	1 mL
Solução A (micronutrientes).....	2 mL
FeEDTA Solução 1,64%.....	4 mL
Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH).....	2 mL
Água destilada.....	1.000 mL
Ágar.....	15 a 18 g (meio sólido) / 1,7 a 1,8 g (meio semissólido)

## II - procedimentos:

a) ajustar pH para 6,8 (ajustar com ± 4,0 g de KOH);

b) adicionar 200mg de extrato de levedura para o meio sólido.

Art. 36. Para o LGI-P (Gluconacetobacter diazotrophicus) (Döbereiner, 1991), deve ser observado o seguinte:

## I - componentes:

Sacarose ou açúcar cristal.....	100,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,6 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,02 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,002 g
FeEDTA (1,64%).....	4 mL
Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2 N de KOH).....	2 mL
Solução B(vitaminas).....	1 mL
Água destilada.....	1.000 mL
Ágar.....	18 a 20 g (meio sólido) / 1,6 a 1,8 g (meio semissólido)

II - procedimentos: ajustar pH = 5,5 (utilizar ac. Acético p/ atingir pH necessário).

Art. 37. Para o Meio de Jensen para Tubos Gibson (tubos com ágar inclinado ou vasos de Leonard) (Vicent, 1970), deve ser observado o seguinte:

I - componentes:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (sol. 2%).....	10 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (sol. 2%) + NaCl (sol. 2%).....	10 mL
CaHPO <sub>4</sub> (sol. 10%) (ou Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O 1,83 g/l).....	10 mL
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (sol. 1.4 %) ou FeCl <sub>3</sub> (sol. 1%).....	10 mL
Solução de micronutriente.....	1 mL
Água Destilada.....	1.000 mL

II - procedimento: ajustar com KOH para pH = 6,7.

Parágrafo único. A Solução de micronutrientes 1 mL, constante do inciso I, deverá ser preparada para um litro de água destilada com os seguintes componentes:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86 g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	2,03 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,08 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	0,09 g

Art. 38. Para o meio de cultura IKUTA (IKUTA, 1995), devem ser observados os seguintes componentes:

1. Manitol.....	5,0 g
2. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
3. NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	0,5 g
4. MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
5. Solução de Vermelho Congo (0,25g/100 mL).....	10 mL
6. Ágar-ágar.....	10,0 a 15,0 g
7. Água destilada.....	1000 mL

Art. 39. Para o preparo das soluções estoques (10 mL) dos antimicrobianos que serão adicionados no meio de cultura IKUTA, deve ser observado o seguinte:

- I - Ácido Nalidíxico (20mg/mL), 0,2g (em NaOH 0,1N) adicionar 0,5 mL;  
 II - Neomicina (20mg/mL), 0,2g (em água destilada) adicionar 1,5 mL;  
 III - Cloranfenicol (20mg/mL), 0,2g (etanol:água destilada, 1:1. v:v) adicionar 1,5 mL;  
 IV - Actidione (10mg/mL), 0,1g (em água destilada) adicionar 0,1 mL;  
 V - Triazol (2,5%), 0,25g (em água destilada) adicionar 0,4 mL; e

VI - procedimentos:

- a) preparo do meio: dissolver os componentes na ordem indicada na formulação, ajustar o pH na faixa de 6,8 a 7,0 e utilizar solução de NaOH 0,1 M para elevar o pH ou solução de HCl 0,1 M para baixar o pH do meio de cultura;  
 b) as soluções antimicrobianas estoques deverão ser esterilizadas por passagem em filtro de 0,2 µm antes de serem adicionadas ao meio autoclavado.

Art. 40. Para o Meio 79 com vermelho congo, vancomicina e actidione, deve ser observado o seguinte: a cada 300 mL de meio 79 com vermelho congo (art. 27) esterilizado na temperatura aproximada de 45-50°C, adicionar 100 µL de solução de vancomicina e de 200 µL de solução de actidione (cicloheximida); a solução de actidione no meio de cultura é optativa e a solução de actidione deverá ser esterilizada por membrana de filtro 0,2 µm e adicionada ao meio após autoclavagem do mesmo.

Art. 41. Para as soluções nutritivas, deve ser observado o seguinte:

I - Solução nutritiva de Norris (Norris & Date, 1976), nas tabelas 07, 08 e 09 abaixo:

Tabela 07

Ingrediente	Sol. Estoque/L	Quant./L
01- KCl	29,8 g	2,5 mL
02- K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	69,6 g	2,5 mL
03- MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	98,6 g	2,5 mL
04- CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	0,344 g*
05- Solução Estoque nº 1	-	0,5 mL
06- Solução Estoque nº 2	-	1,0 mL
07- Água destilada	p/ 1.000 mL	p/ 1.000 mL

\*preparar em cadinho com água destilada suficiente para formar uma pasta e moer muito bem.

Tabela 08

Solução Estoque nº 1	Quant./L
01- CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,078 g
02- ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22 g
03- MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	2,03 g
04- (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,01 g
05- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,43 g
06- Água destilada	p/ 1.000 mL

Tabela 09

Solução Estoque nº 2	Quant./L
01- Citrato de Fe (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .Fe.5H <sub>2</sub> O)	1,795 g
02- Água destilada	p/ 1.000 mL

II - Ágar (8 a 10 g/L) - A inclusão do ágar na solução nutritiva de Norris ou similar se destina aos testes em tubos de ensaio;

III - os sais devem ser adicionados à água destilada na ordem em que estão indicados a fim de evitar reações secundárias e precipitação e a solução nutritiva deve ser constantemente agitada no momento de sua distribuição, sendo que o pH final da solução nutritiva deve ser de 6,5 e, alternativamente, pode ser empregada a solução nutritiva de Jensen (Vicent, 1970).

Art. 42. Para a solução de Hoagland para tubos (BALDANI et al., 2000), deve ser observado o seguinte:

I - componentes:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> sol.1 M.....	1,0 mL
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> sol.1 M. ....	1,0 mL
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O sol.1 M.....	2,0 mL
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,172 g
Solução de Micronutrientes para tubos.....	1,0 mL
Sol. de Ferro.....	1,0 mL
Água destilada.....	1000 mL

a) ajustar pH 6.5-7.0; e

b) para a preparação da solução de Ferro, 1,21 g Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA/100 mL de água destilada, misturar bem e adicionar 0,6 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O;

II - componentes para a Solução de Micronutrientes para tubos:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	2,86 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O.....	1,81 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,22 g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,08 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,02 g

a) completar para 1000 mL com água destilada; e

b) se a solução ficar turva, acrescentar ácido clorídrico até que fique límpida.

Art. 43. As dúvidas suscitadas na aplicação desta Instrução Normativa serão resolvidas pela Secretaria de Defesa Agropecuária.

Art. 44. Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 45. Fica revogada a Portaria SNDA nº 31, de 8 de junho de 1982.

JOSÉ GUILHERME TOLLSTADIUS LEAL  
ANEXO

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS REFERENTES AOS MÉTODOS DESCRITOS NESTA INSTRUÇÃO NORMATIVA

I - ANDRADE, D. S.; HAMAKAWA, P. J. Estimativa do número de células de rizóbio no solo e inoculantes por infecção em planta. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Eds.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 63-94.

II - BALDANI, V. L. D. ; BALDANI, José Ivo ; DÖBEREINER, Johanna . Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs Herbaspirillum seropedicae and Burkholderia spp.. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v. 30, p. 485-491, 2000.

III - BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de Herbaspirillum spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. 1996. 262p. Dissertação (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

IV - BALDANI.V.L.D. & DÖBEREINER,J. 1980 Host plant specificity in the infections of cereals with Azospirillum spp. Soil Biology & Biochemistry, v.12, p.433-439, 1980.

V - CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium with sugarcane. Plant and Soil, v.108, p.23-31, 1988.

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

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

VIII - FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes para as culturas do guandu e caupi. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.38, p.911-920, 2003. (DOI: 10.1590/S0100-204X2003000800003).

IX - FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. Laboratory Manual of General Microbiology. Mc Graw-Hill Book Company, Inc New York 1928, 145 p.

X - IKUTA, N. Desenvolvimento de métodos de identificação e quantificação de estirpes de Bradyrhizobium japonicum. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 90 p. Tese de doutorado.

XI - KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (Phaseolus vulgaris L.) grown under the no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. Applied Soil Ecology, v.32, n.2, p.210-220, 2006a. (DOI:10.1016/j.apsoil.2005.06.008).

XII - KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive Streptococcus pneumoniae BOX elements in diverse bacteria. Genome Research, v.5, p.408-418, 1995.

XIII - LIPMAN, J.G. Soil bacteriological studies. Further contributions to the physiology and morphology of the members of the Azotobacter group. Report of the New Jersey State Agricultural Experiment Station 25, p. 237-289, 1904.

XIV - MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant Azospirillum species. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências, 55: 417-430, 1983.

XV - MAGALHÃES, F.M.M. Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio. Manaus, Universidade do Amazonas, 1983. 89p. (Tese de Mestrado)

XVI - NORRIS, D.O., DATE, R.A. 1976. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H., BRYAN, W.W. (Eds.) Tropical pasture research - principles and methods. Brisbane: CAB. p.134-173.

XVII - PENNA, C.A.; DEMARES, D.O.; GUERRERO, M.E.; GUTKIND, G.O. Vancomycin as a selective agent in ágarized media for evaluating bacterial inoculants after seed treatment. In: Latin-american Conference on Rhizobiology and I Brazilian Conference on Biological Nitrogen Fixation, 2004, Miguel Pereira, RJ. RELAR - Programme and Abstracts, 2004.

XVIII - POUCHON, J., TARDIEUX, P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol, collection "techniques de base" série microbiologie, service de microbiologie du sol de Institut Pasteur. Editions de la Tourelle, 106p. 1957.

XIX - REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DE INOCULANTES MICROBIANOS DE INTERESSE AGRÍCOLA (RELARE), 13. Anais. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212p.

XX - SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. FEMS Microbiology Ecology, v.30, p.261-272, 1999.

XXI - SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. 1994. Handbook for rhizobia - methods in legume Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag, 1994. 450 p. (ISBN 0-387-94134-7).

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

XXIII - VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in Molecular and Cell Biology, v.5, p.25-40, 1994.

XXIV - VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15). (ISBN 632064102).

DEPARTAMENTO DE FISCALIZAÇÃO  
DE INSUMOS AGRÍCOLAS  
COORDENAÇÃO-GERAL  
DE AGROTÓXICOS E AFINS

ATO Nº 57, DE 16 DE NOVEMBRO DE 2010

De acordo com o Art 3º da IN 27, de 22/09/2005, publicada no DOU de 06/10/2005 fica atualizada a tabela da IN 42, de 05/07/2002 com a inclusão do seguinte alvo biológico na cultura do Cana-de-açúcar: Cana-de-açúcar - *Digitaria nuda* (Capim colchão);

LUIS EDUARDO PACIFÍCI RANGEL  
Coordenador-Geral

SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO  
AGROPECUÁRIO E COOPERATIVISMO  
SERVIÇO NACIONAL  
DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES  
COORDENAÇÃO DE PROTEÇÃO DE CULTIVARES

DECISÃO Nº 32, DE 16 DE NOVEMBRO DE 2010

O Serviço Nacional de Proteção de Cultivares, em cumprimento ao § 7º do art. 18 da Lei n.º 9.456/97, torna público aos interessados que tramitaram neste Serviço, os pedidos de proteção de cultivares de antúrio (*Anthurium Schott.*), com solicitações de denominação Rijn200336 e Rijn200332, protocolizados sob os números 21806.000132/2010-16 e 21806.000135/2010-50, respectivamente, apresentados pela empresa holandesa Rijnplant B.V. Os pedidos de proteção foram INDEFERIDOS, por não atenderem ao inciso V do Art. 3 da Lei 9.456, de 25 de abril de 1997. Fica aberto o prazo de 60 (sessenta) dias para recurso, contados da publicação desta Decisão.

DANIELA DE MORAES AVIANI  
Coordenadora