

**FLAVIA COSTA CARVALHO DE ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA CRESCIMENTO  
BACTERIANO EM PEQUENAS E MÉDIAS PROPRIEDADES RURAIS**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito  
para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
FEVEREIRO / 2022**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação do Professor Caio Tavora Rachid Coelho da Costa e coorientação do Professor Mateus Gomes de Godoy.

## CIP - Catalogação na Publicação

A553a Andrade, Flavia Costa Carvalho de  
Avaliação de meios de cultura alternativos para  
crescimento bacteriano em pequenas e médias  
propriedades rurais / Flavia Costa Carvalho de  
Andrade. -- Rio de Janeiro, 2022.  
58 f.

Orientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa.  
Coorientador: Mateus Gomes de Godoy.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Inoculantes. 2. Agricultura orgânica. 3.  
Agricultura sustentável. 4. PGPB. I. Tavora Rachid  
Coelho da Costa, Caio, orient. II. Godoy, Mateus  
Gomes de, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Flavia Costa Carvalho de Andrade**  
 DRE: 117053057

BANCA EXAMINADORA: Prof. Andrew Macrae (Presidente)  
 Profa. Deborah Catharine de Assis Leite  
 M.Sc. Isabella Dal’Rio Nascimento Lopes  
 Profa. Ana Maria Mazotto (Suplente)

Título da Monografia: **“Avaliação de meios de cultura alternativos para  
 crescimento bacteriano em pequenas e médias propriedades rurais”**

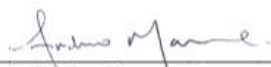
Local: Sala virtual <https://meet.google.com/esq-wfmq-sms>  
 Data e hora de início: **22 de fevereiro de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 22 de Fev de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
9,0	Prof. Andrew Macrae
8,5	Profa. Deborah Catharine de Assis Leite
8,0	M. Sc. Isabella Dal’Rio Nascimento Lopes

Presidente da banca

  
 Prof. Andrew Macrae

Aluno:

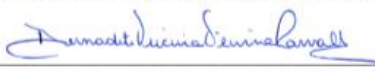
Assinado eletronicamente por Flavia Costa  
 Flavia Costa Carvalho de Andrade  
 Carvalho de Andrade  
 Data: 2022.02.22 14:02:00 -0300

Orientador:

Flavia Costa Carvalho de Andrade  
 CAIO TAVORA  
 RACHID COELHO DA  
 COSTA:31385413808  
Digitally signed by CAIO TAVORA  
 RACHID COELHO DA  
 COSTA:31385413808  
 Date: 2022.02.22 14:06:03 -0300

Prof. Caio Tavora Rachid Coelho da Costa / Coorientador: Prof. Mateus Gomes de Godoy

Coordenador  
 de TCC

  
 Prof. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

**DEDICATÓRIA:**

Dedico este trabalho à minha mãe, grande professora e pesquisadora da UFRJ, Vera Lucia Alcides da Costa Carvalho, que se foi antes do combinado. Obrigada pelo exemplo de mulher e profissional que você sempre foi, Mãe.

## AGRADECIMENTOS:

Agradeço inicialmente a minha família, por todo o apoio e compreensão, sempre, especialmente em minha volta à universidade, nesta jornada cheia de novos desafios. Minha mãe Vera (*in memoriam*), a quem o presente trabalho também é dedicado. Meu pai, Mauricio, minha irmã, Fernanda (agora mãe da maior lindeza deste mundo, meu sobrinho italianinho Marco, nosso peixinho) e meu irmão Mauricio Jr., pai do Augusto (esse menino ainda vai ser biólogo, hein?). Agradeço, também, a meu orientador Caio, por todos os ensinamentos e lições, nas horas boas e nas ruins (pois é, nem sempre tudo dá certo na ciência, não é mesmo?), sempre me indicando que rumo seguir, como contornar os problemas e buscar as melhores soluções. Agradeço ao meu co-orientador, Mateus, sempre de bom humor, tirando minhas dúvidas, ajudando nos ensaios, auxiliando na escolha do melhor protocolo a seguir (nem sempre é tão óbvio...). Agradeço ao Prof. Diogo, que não me orienta, mas também não desorienta, e aos meus colegas de laboratório: Douglas, que tem o domínio dos números e estatísticas, além de uma super didática e paciência para ajudar os colegas; Caroll e Ísis, com suas playlists da tarde e boas conversas e risadas; Karo, minha nova interlocutora, direto da Colômbia; Igor, meu mais novo BFF, agrônomo da mais fina estirpe, principalmente por sua ajuda na casa de vegetação; e Millena, amiga, se não fosse você, não teria encontrado o caminho dos micróbios agrícolas e silvícolas. Agradeço, também, a todos os amigos do LGM, que sempre nos ajudam (bendito empréstimo de autoclave) e aos amigos do BIOINOVAR, que, sempre solícitos, nos auxiliam com os ensaios bioquímicos, protocolos e reagentes. Agradeço, também, a meu amigo e ex-co-orientador Thiago, que tanto foi instrumental em meus primeiros passos no LABEM, e, agora, faz sucesso em sua carreira profissional. Finalmente, agradeço à UFRJ e à FAPERJ, que tornaram o presente projeto possível.

“We need the tonic of wildness... At the same time that we are earnest to explore and learn all things, we require that all things be mysterious and unexplorable, that land and sea be indefinitely wild, unsurveyed and unfathomed by us because unfathomable. We can never have enough of nature.”

(Thoreau)

**RESUMO:****FLAVIA COSTA CARVALHO DE ANDRADE****AValiação de Meios de Cultura Alternativos para Crescimento Bacteriano em Pequenas e Médias Propriedades Rurais****ORIENTADOR: CAIO TAVORA RACHID COELHO DA COSTA****CO-ORIENTADOR: MATEUS GOMES DE GODOY**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

O desempenho do setor agrícola na economia brasileira contribuiu para o desenvolvimento social visto nas últimas décadas, porém, a maior parte dos avanços recentes no campo aconteceu nas grandes propriedades ligadas ao agronegócio. É necessário, portanto, um estímulo à profissionalização do pequeno produtor, auxiliando-o no uso de novas tecnologias. Além disso, a agricultura está cada vez mais ligada às demandas ambientais, o que se evidencia pelo crescimento do setor de produtos orgânicos e pelo uso de bioinsumos na produção agrícola. Assim, deve-se pensar no uso de inoculantes dentro deste contexto, com a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal, ou PGPB, para substituir fertilizantes químicos, geradores de poluição ambiental e nocivos à saúde humana e de animais. Levando-se em conta os mecanismos promotores de crescimento vegetal das PGPB e o uso consciente de substratos oriundos da própria fazenda, o presente trabalho avaliou o crescimento de estirpes bacterianas modelo dos gêneros *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Paraburkholderia* e *Pantoea* em meios de cultivo à base de insumos disponíveis nas propriedades, em diferentes combinações. Os substratos (caldo de cana-de-açúcar e soro de leite) foram quantificados quanto ao teor de proteínas e carboidratos antes da formulação dos meios de cultivo, por métodos colorimétricos. Além disso, foi pesquisado o efeito de consórcio bacteriano crescido nos diferentes meios sobre o crescimento de feijoeiros em casa de vegetação. Formas de esterilização destes meios de cultivo bacteriano, aplicáveis fora do ambiente laboratorial, também foram testadas, para diminuir o crescimento de microrganismos indesejáveis nos meios de cultivo. Assim, futuramente, poderá ser desenvolvida tecnologia de produção de inoculantes *on farm* que traga maior autonomia econômica e independência de insumos externos para pequenos e médios produtores rurais. Concluiu-se que os substratos estudados podem ser utilizados para crescimento microbiano, pois permitiram o crescimento dos microrganismos testados. Porém, o meio de cultivo elaborado pela simples diluição do caldo de cana-de-açúcar a 33% foi o mais recomendado por ser de simples preparo; apresentar crescimento rápido dos microrganismos; ter tido melhor desempenho no teste preliminar em casa de vegetação e, ainda, não apresentar odor forte após sua fermentação. Além disso, a fervura por 20 minutos se mostrou eficaz para eliminar a presença de microrganismos autóctones. Estes resultados sugerem que o uso de meios para cultivo microbiano elaborados a partir de substratos disponíveis em pequenas e médias propriedades rurais é uma possível solução para baratear a multiplicação de inoculantes *on farm*.

**Palavras-chave:** Inoculantes; PGPB; Agricultura Orgânica; *Bacillus*; *Methylobacterium*.



**ABSTRACT:****FLAVIA COSTA CARVALHO DE ANDRADE****AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA CRESCIMENTO BACTERIANO EM PEQUENAS E MÉDIAS PROPRIEDADES RURAIS****ORIENTADOR: CAIO TAVORA RACHID COELHO DA COSTA****CO-ORIENTADOR: MATEUS GOMES DE GODOY**

**Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The performance of the agricultural sector in Brazilian economy has contributed to the social development seen in the past decades. However, recent advances in the countryside have taken place in large agribusiness-connected properties. It is therefore necessary to stimulate family farmers to professionalize, putting them in touch with new technologies. In addition to that, agriculture is now more integrated to environmental demands, which is made evident through the growth experienced by the organic agriculture sector and the use of bioproducts in agricultural practice. The use of inoculants should also be considered within this context, with the usage of plant growth promoting bacteria (PGPB) as a substitute for chemical fertilizers, which generate pollution and health hazards. Considering PGPB's plant growth promoting mechanisms and the conscientious use of residues from the farms themselves, the present work evaluated the growth of model bacterial strains (*Bacillus*; *Methylobacterium*; *Pantoea* and *Paraburkholderia*) in culture media made with farm products and residues (pressed sugarcane juice and whey), in different compositions. The protein and carbohydrate content of the products was quantified before formulation. This was done through colorimetric assays. Furthermore, the effect of bacterial consortia grown in the studied media was tested in greenhouse experiments, with common bean plants. Different sterilizing methods of the studied media, applicable outside laboratory conditions, were also tested, in order to diminish growth of unwanted microorganisms. Thus, in the future, there may be development of technology that will allow greater economic autonomy and independence from off-farm products to small and medium-sized farmers. The conclusions were that both products studied can be used for bacterial growth, because they allowed the tested microorganisms to grow. Furthermore, the medium containing 33% sugarcane juice was the most recommended: it is of simple preparation, shows fast bacterial growth, performed better in a preliminary greenhouse study, and does not show a strong odor. Besides, boiling the flask containing the non-sterile medium for 20 minutes was most effective in elimination of indigenous microorganisms. These results suggest that the use of bacterial growth media elaborated from products readily available at small and medium-sized farms is, indeed, a possible solution for economically viable on-farm inoculant multiplication.

**Keywords:** Inoculants; PGPB; Organic Agriculture; *Bacillus*; *Methylobacterium*.

**RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS:****FLAVIA COSTA CARVALHO DE ANDRADE****AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVOS PARA CRESCIMENTO BACTERIANO EM PEQUENAS E MÉDIAS PROPRIEDADES RURAIS****ORIENTADOR: CAIO TAVORA RACHID COELHO DA COSTA****CO-ORIENTADOR: MATEUS GOMES DE GODOY**

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Nas últimas décadas, a agricultura vem ganhando cada vez mais importância na economia brasileira, gerando desenvolvimento social e econômico no campo. Porém, esse desenvolvimento vem acompanhado do uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes químicos, produtos que são nocivos ao meio ambiente, e geram poluição. A agricultura orgânica surge como possível solução para estes problemas, gerando produtos sem a adição destes poluentes. Portanto, como alternativa para aumentar a produtividade das fazendas sem prejudicar o meio ambiente, pode-se utilizar produtos naturais que melhorem a produtividade. Estes podem ser inoculantes, ou seja, bactérias do solo que produzem substâncias que ajudam no crescimento das plantas. Assim, as fazendas que usam estes inoculantes e outros produtos naturais em sua produção agregam valor ao seu produto final, que poderá receber o selo de “Orgânico”. Contudo, hoje, muitos agricultores, especialmente de agricultura familiar, não utilizam inoculantes e outros bioprodutos por conta do custo, ou por desconhecimento. Este trabalho vem justamente iniciar a pesquisa sobre algumas formas que poderão permitir ao pequeno produtor multiplicar estes inoculantes em sua fazenda, tornando o uso dessa biotecnologia mais barata e acessível para ele. Para isso, estudamos o uso de caldo de cana-de-açúcar e soro de leite como formas de crescer estas bactérias benéficas, ambos produtos abundantes em propriedades rurais, principalmente fazendas de gado leiteiro. Concluímos que as bactérias conseguem crescer nestes meios estudados, e que nos testes iniciais, o meio de cultivo feito a partir de cana-de-açúcar é mais indicado, por ser mais simples e mais eficiente. Além disso, para evitar que haja multiplicação de organismos indesejáveis, estudamos formas caseiras de eliminar os fungos e bactérias que existem naturalmente nessas substâncias, de forma a não deixar que não cresça nada nocivo para as pessoas ou para a plantação. Observamos que a simples fervura, por 20 minutos, foi eficiente, nos testes realizados.

**Palavras-chave:** Ecologia; Agricultura Orgânica.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
RESUMO PARA LEIGOS.....	x
ÍNDICE.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Agricultura e sustentabilidade no Brasil.....	1
1.2 Agricultura orgânica.....	3
1.3 Microbiologia do solo e plantas.....	6
1.4 Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	9
1.5 Inoculantes.....	12
1.6 Multiplicação <i>on farm</i> de inoculantes.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. HIPÓTESES.....	20
4. OBJETIVO.....	20
4.1. Objetivos específicos.....	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1. Substratos utilizados.....	21
5.2. Determinação do teor de carboidrato do caldo de cana-de-açúcar e do soro de leite.....	21
5.3. Quantificação do teor de proteínas totais do soro de leite e do caldo de cana-de-açúcar.....	22
5.4. Avaliação do crescimento de estirpes modelo, utilizando como substratos o caldo de cana-de-açúcar e o soro de leite em diferentes composições.....	23
5.5. Avaliação da influência dos fermentados por dois meios na promoção do crescimento de plantas em casa de vegetação.....	25
5.6. Avaliação de diferentes técnicas de desinfecção para diminuir a contaminação com microrganismos exógenos.....	26
5.7. Análises estatísticas.....	26
6. RESULTADOS.....	27
6.1. Determinação do teor de carboidrato do caldo de cana-de-açúcar e do soro de leite.....	27
6.2. Quantificação do teor de proteínas totais do soro de leite e do caldo de cana-de-açúcar.....	27
6.3. Avaliação do crescimento de estirpes modelo, utilizando como substrato o caldo de cana-de-açúcar e o soro de leite em diferentes composições.....	27
6.4. Avaliação de promoção do crescimento de plantas em casa de vegetação: uso de consórcios microbianos.....	29
6.5. Avaliação de diferentes técnicas de desinfecção para diminuir a contaminação com microrganismos exógenos.....	34
7. DISCUSSÃO.....	36
8. CONCLUSÕES.....	41
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Agricultura e sustentabilidade no Brasil

O Brasil, desde os tempos da colônia, é um exportador de gêneros agrícolas, inicialmente em um sistema de monocultura, com ênfase em cana-de açúcar, algodão e fumo, e, posteriormente, com perfil cafeeiro (Abreu e Lago, 2001). Nas décadas de 60 e 70, o crescimento acelerado da população urbana não foi acompanhado por um aumento significativo da produtividade agrícola. Para suprir a necessidade alimentar desta população urbana crescente, o país dependia de importações para garantir seu abastecimento interno. O governo brasileiro, então, desenvolveu políticas para aumentar a produção e a produtividade do setor agrícola, tornando o país independente destas importações, atingindo a autossuficiência, e se tornando, novamente, um dos grandes exportadores mundiais de alimentos (Embrapa, 2018). Dados da CONAB para a safra 2020/2021 de soja, estimada em recorde de 135,9 milhões de toneladas (CONAB, 2021), demonstram esse novo papel do país no cenário internacional de *commodities*. O desempenho do setor agrícola na economia nacional contribuiu para o desenvolvimento social visto nas últimas décadas, pois o aumento da produtividade gerou melhoria das condições de vida da população devido à geração de empregos e aumento de renda, além da maior quantidade de produtos disponíveis no mercado exercer pressão para baixo sobre os preços, levando gêneros agrícolas de melhor qualidade e com menor preço final ao consumidor (Embrapa, 2018).

O país investiu em larga escala no setor de agropecuária por conta da segurança alimentar e energética (biocombustíveis), destacando-se o papel da tecnologia enquanto elemento transformador no campo, principalmente através dos esforços da Embrapa, dos institutos de pesquisa e das universidades (Lopes, 2013).

Porém, a maior parte dos avanços recentes no campo aconteceu nas grandes propriedades ligadas ao agronegócio, que conta com uma cadeia produtiva integrada, desde o plantio de gêneros agrícolas e a criação de animais na pecuária, passando pela colheita e abate, cadeia de distribuição, e indústria de produtos processados, até sua distribuição às grandes redes varejistas, em uma verticalização da produção que tende à concentração de capital (Arieira e Fusco, 2010). Assim, na área rural, há ainda muita desigualdade tanto de produtividade quanto de renda, pois os pequenos produtores não têm o mesmo acesso à tecnologia que o grande agronegócio, por conta de seu elevado custo de implementação, além das imperfeições do mercado e, muitas vezes, da inadequação das políticas públicas de incentivo (Alves e Souza,

2015). Para reverter esta desigualdade, faz-se necessário o estímulo à profissionalização do agricultor familiar e do pequeno produtor, levando práticas de empreendedorismo para o campo, o que permitirá o contato com tecnologias e inovações dos processos de produção, levando-os à melhor gestão de suas propriedades (Schinaider, Fagundes e Talamini, 2017).

As inovações permitem que as características climáticas do Brasil sejam mais bem aproveitadas, através de técnicas de manejo do solo aliadas à tropicalização de diversos tipos de cultura, com destaque para manejos e práticas sustentáveis. A adoção destas técnicas permite melhor produtividade, garantindo o protagonismo do país no que tange à segurança alimentar, com vistas tanto para o mercado interno quanto externo (Lopes, 2017).

O setor agrícola brasileiro atualmente apresenta sistemas de produção mais complexos, resilientes e sustentáveis, com tecnologia desenvolvida não só pelo setor público, mas também por empresas privadas, visando baixa emissão de gases de efeito estufa, com uso de sistema de plantio direto, agricultura orgânica, sistemas agroflorestais, controle biológico de doenças e pragas, fixação biológica de nitrogênio, florestas plantadas, recuperação de áreas degradadas, tratamento de dejetos animais, e a recuperação, restauração e adequação ambiental de propriedades rurais. Estas práticas inovadoras permitem a conservação da biodiversidade enquanto se mantém um setor agrícola com produtividade adequada para garantia da segurança alimentar do país (Embrapa, 2018).

Além disso, a produção agrícola está cada vez mais ligada às demandas ambientais e à preservação e recuperação dos recursos naturais, especialmente pela inserção do Brasil no mercado mundial de *commodities*, o que levou o país a promulgar o Decreto nº 6.476, em 2008 (Brasil, 2008), que regulamenta o texto do tratado internacional sobre recursos fitogenéticos para alimentação e agricultura (TIRFAA), aprovado pelos países membros da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2001. Este texto advoga o uso sustentável e conservacionista dos recursos fitogenéticos, para fins alimentares e agrícolas, além da repartição equânime dos benefícios daí derivados, para que haja práticas de agricultura sustentáveis e garantidoras da segurança alimentar (FAO, 2009).

É necessário, contudo, levar-se em conta que o Brasil é um dos principais centros consumidores de agroquímicos (fertilizantes e corretivos) que são utilizados para corrigir a acidez e baixa fertilidade dos solos típicos de áreas tropicais, fornecendo os nutrientes e garantindo a produção vegetal. No atual cenário político, somente no ano de 2019, o país importou quase 335 mil toneladas de inseticidas, fungicidas e herbicidas, quantidade 16% acima

do ano de 2018, além do aumento das vendas deste tipo de produto internamente, na contramão de políticas europeias de diminuição do uso destes produtos (Resende e Pupo, 2020).

O uso de agrotóxicos e fertilizantes, além da poluição no local de sua aplicação, têm efeitos em áreas distantes, por conta da lixiviação que carrega os nutrientes em excesso e possíveis contaminantes para lençóis freáticos e rios, gerando a eutrofização de corpos d'água (Marquette e Castaman, 2016). Deve-se buscar, portanto, cada vez mais alternativas de menor impacto ambiental a estes métodos tradicionalmente empregados, combatendo a poluição e eutrofização dos corpos hídricos, além de seu assoreamento, causado pela prática de revolvimento do solo (Carneiro, Pignati e Rigotto, 2012). Além destes problemas, os produtores devem levar em conta o alto custo do uso intensivo de insumos químicos na lavoura, que não é apenas econômico, mas também afeta a saúde da população: a alta do dólar tem levado ao crescimento do uso de agrotóxicos ilegais, que entram no Brasil pela fronteira com o Paraguai na busca de maximização dos lucros (Toledo, 2021), uma vez que os altos custos dos insumos cotados em moeda estrangeira têm grande impacto econômico sobre a produção agrícola (Esalq/USP e CNA, 2015).

Os fertilizantes químicos foram chave em permitir a “Revolução Verde” ocorrida desde a década de 1960, mas seus efeitos de aumento da produtividade trouxeram, além dos problemas supracitados, o aumento da emissão de gases estufa. Segundo a US/EPA, a agricultura foi, em 2019, fonte de 10% das emissões, sendo a maior parte proveniente da pecuária, da produção de arroz e dos solos agriculturáveis, estes últimos por conta do uso intensivo de fertilizantes (US/EPA, 2021).

Deve haver, além disso, uma adequação ambiental, prevista no Código Florestal (Brasil, 2012). Para alcançar estes objetivos, devem-se adotar técnicas sustentáveis de manejo conservacionista do solo, principalmente seguindo-se os princípios da agricultura orgânica.

## 1.2 Agricultura orgânica

O desenvolvimento sustentável no campo depende da conservação e do bom manejo dos recursos naturais, o que é possível graças a novas tecnologias e manejos aplicados à produção agrícola, com o objetivo de assegurar a satisfação das necessidades humanas no presente e das futuras gerações (FAO, 2017). Tais práticas se organizam em sistemas integrados de produção, adequados a determinados ambientes, tudo isso feito de forma a integrar os ciclos

e controles biológicos naturais para sustentar a viabilidade econômica dos processos agrícolas, gerando melhor qualidade de vida aos produtores rurais e à sociedade como um todo (Cornell Law School, 2017).

O desenvolvimento tecnológico para a sustentabilidade no campo visa a adaptar o setor a um novo mercado consumidor, em que se exige melhoria na qualidade dos produtos, com rastreabilidade dos mesmos, restrição ao uso de antimicrobianos, fertilizantes químicos e agrotóxicos (Embrapa, 2018).

A produção de alimentos orgânicos, tanto vegetais quanto animais, torna-se importante fonte de renda para pequenos e médios produtores justamente porque existe um novo perfil de consumo, que agrega valor ao produto certificado, sendo o público-alvo formado por pessoas com preocupadas com questões ambientais e com relação à própria saúde. Dados do Research Institute of Organic Agriculture mostram que o mercado mundial de orgânicos em 2018 atingiu mais de 96 bilhões de euros, estando este tipo de prática agrícola presente em 186 países, com 71,5 milhões de hectares de terra sob este tipo de manejo, contando com cerca de 2,8 milhões de fazendeiros empregados no setor, em todo o mundo (Research Institute of Organic Agriculture, 2020).

A tendência do mercado de orgânicos é de crescimento, devido à mudança de hábitos de consumo acima mencionada. Além disso, este tipo de agricultura gera desenvolvimento local, pois há estímulo para a instauração de circuitos de cadeia curta de comércio: o produtor muitas vezes vende diretamente ao consumidor final, através de cooperativas e feiras de produtos orgânicos (Embrapa, 2018). Esta tendência está ligada à valorização do *buy local* (compra local) o que é mais um fator agregador de valor à produção orgânica oriunda de pequenas propriedades, pois elimina-se, assim, o intermediário, responsável por comprar a produção do pequeno produtor por um valor geralmente baixo, e revendê-la com alta lucratividade ao comércio varejista. O bom exemplo neste caso vem dos EUA, onde há um programa importante do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos), chamado *Farmers Markets*, que estimula a venda direta dos produtos dos pequenos produtores aos consumidores finais em diversas feiras espalhadas por todo o país (EUA, 2018).

A agricultura orgânica é definida, na Lei nº10.831, de 23 de dezembro de 2003, como aquela em que técnicas específicas são adotadas, otimizando-se o uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis, respeitando-se a cultura local das comunidades rurais, com objetivo de garantir a sustentabilidade econômica e ecológica, aumentando benefícios sociais,

e diminuindo a dependência de energia não-renovável, empregando, quando possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, ao invés de materiais sintéticos (Brasil, 2003). Assim, há a proibição total do uso de pesticidas, sendo a utilização de adubos orgânicos e a adoção de práticas agrícolas que visam a gerar e manter a biodiversidade em equilíbrio um dos principais pilares da agricultura orgânica, pois esta respalda-se em melhor manejo e gestão da terra, utilizando-se, preferencialmente, de insumos locais. Isto agrega valor aos produtos e gera práticas de comércio mais justas (Queiroga, 2018).

Outra forma de pensar a agricultura orgânica é como um sistema abrangente de produção de gêneros agropecuários, em que a saúde do agroecossistema é melhorada. Isso inclui a biodiversidade, os ciclos biogeoquímicos e a atividade biológica do solo, justamente por dar ênfase às práticas de manejo *in loco*, na propriedade agrícola, ao invés do uso intensivo de insumos externos. Estas práticas são culturais e biológicas e evitam o uso de insumos sintéticos, oriundos da indústria química, para cumprir funções específicas no sistema de produção agrícola (Queiroga, 2018).

Deve-se, portanto, pensar em agricultura orgânica como agregadora de valor aos produtos oriundos de pequenas propriedades, levando em conta que há dois tipos de agricultura orgânica: certificada e natural (agroecológica). A certificada se baseia em práticas de não-utilização de agroquímicos e antibióticos, e passam por certificação de insumos, manejo e gestão técnica da propriedade. Já a natural se baseia em uso de estrume como fertilizante, além do uso de inseticidas e fertilizantes biológicos, e envolve questões sociopolítico-ideológicas. Porém, para que haja agregação de valor aos produtos, deve haver certificação da propriedade e de sua produção, garantindo, assim, que os principais objetivos do sistema orgânico de produção sejam atingidos, como a conservação e aumento da fertilidade do solo, a diminuição da poluição, a não-utilização de fertilizantes e defensivos químicos e sintéticos e a preservação da biodiversidade do sistema agroecológico como um todo, com ênfase para a microbiota do solo e a polinização, o que permite a produção de alimentos em quantidade suficiente e com qualidade superior (Queiroga, 2018).

Com o passar dos anos, aumenta o número de propriedades agrícolas que são certificadas como orgânicas, devido ao aumento do consumo de tais produtos. No Brasil, entre os Censos Agropecuários de 2006 e 2017, o número de propriedades declaradas orgânicas e certificadas nesse período aumentou de 5.106 para 68.716, segundo dados do IBGE. As vendas de produtos orgânicos no varejo cresceram cerca de 11% entre 2000 e 2017, período em que a área dedicada a esse tipo de cultivo no mundo cresceu a uma média anual de 10%. O Brasil



ocupava o 12º lugar entre os países com maior área dedicada à produção de orgânicos em 2017, liderando a produção mundial de açúcar orgânico e é o país com mais colmeias para a produção de mel orgânico (Lima et al, 2020).

A certificação da produção garante a procedência e o respeito a todos os preceitos da agricultura orgânica. Porém, os produtores ainda têm que lidar com o custo da certificação e fiscalização, cuja normatização iniciou-se com a Lei nº10.831 de dezembro de 2003 (Brasil, 2003), com regulamentação pelo Decreto nº6.323 de 27 de dezembro de 2007 (Brasil, 2007). Essa legalização da agricultura orgânica impulsionou o setor, que tem crescido cerca de 25% ao ano desde 2009, movimentando cerca de R\$3 bilhões em 2016 (Bacoccina, 2017). A legislação que regula o ramo levou ao estabelecimento do selo SisOrg para os produtos certificados pelo Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) como orgânicos (Brasil, 2014).

A tendência contínua de crescimento do setor leva ao aperfeiçoamento dos mecanismos de controle deste tipo de produção, incluindo aí os órgãos de certificação participativa. Tudo isso insere o Brasil em um contexto maior de propensão mundial de apoio à agricultura sustentável, devido à busca não só de sustentabilidade ambiental e conservação da biodiversidade, mas também por conta da procura de alimentos mais saudáveis (Villela et al, 2019). Outro tema importante é o bem-estar animal, discutido em mesas-redondas que incluem produtores rurais, chefs renomados de cozinha e pesquisadores de diversas áreas ligadas ao tema (Slow Food, 2018).

Além disso, os pequenos produtores que adotam as práticas de agricultura orgânica apresentam maior eficiência energética em sua produção em relação à monocultura em larga escala, o que reforça que a adoção destas práticas sustentáveis é de suma importância também do ponto de vista energético (FAO e ITPS, 2015).

### 1.3. Microbiologia do Solo e Plantas

Os ecossistemas, tanto naturais quanto modificados pela ação antrópica, têm os microrganismos como elemento chave, e estes têm papéis importantes na ciclagem de nutrientes, na manutenção da fertilidade do solo e no sequestro de carbono, além de afetar direta e indiretamente a saúde de plantas e animais nos ecossistemas terrestres (Fierer, 2017).

A diversidade do microbioma do solo, termo que define o conjunto de microrganismos aí presentes, que incluem tanto bactérias quanto arqueias, vírus, fungos, protozoários e outros

microrganismos eucariotos (Fierer, 2017), realiza as funções bioquímicas que garantem os serviços ecossistêmicos, que compõem características essenciais do solo, como sua formação (pedogênese), os serviços de ciclagem de nutrientes e as transformações da matéria orgânica. Quanto maior for a biodiversidade do microbioma presente no solo, maior pode ser a diversidade metabólica do sistema solo como um todo, permitindo que ocorram aí todas as transformações necessárias para seu funcionamento enquanto um ecossistema integrado, garantindo melhor resiliência da comunidade como um todo frente a eventuais mudanças das condições ambientais (Cardoso e Andreoti, 2016). É muito comum encontrar funções ecológicas específicas distribuídas entre muitos *taxa*, como, por exemplo, a capacidade de fixar nitrogênio e a capacidade de desnitrificação (Konopka, 2009).

A redundância funcional existente em ecossistemas no solo pode ser relacionada à capacidade que este sistema terá de resistir a mudanças ambientais, pois quanto maior for a diversidade, maior será esta redundância, e maior deverá ser a resistência do ecossistema após a imposição de estresses, sendo maior sua estabilidade (Konopka, 2009). Em outras palavras, altos níveis de redundância para funções ecossistêmicas podem ser relacionados à continuação do desempenho destas funções frente a mudanças ambientais, pois se parte dos microrganismos que desempenhem uma função em especial não resistirem a estas mudanças, ainda há chance que outra parte dos microrganismos presentes na comunidade resista a elas, garantindo a continuidade desta função (Naeem, Kawabata e Loreau, 1998).

A diversidade dos microrganismos do solo em dada área sofre influência direta do pH, da qualidade e quantidade de carbono orgânico, da concentração de oxigênio molecular e do status redox do solo, da disponibilidade de umidade, de nitrogênio e de fósforo no solo, além da textura e estrutura do solo, da temperatura, das espécies de plantas que ocorrem na área e da predação e lise por vírus, em ordem decrescente de importância (Fierer, 2017). Além disso, a concentração de bactérias presente nas regiões do solo próximo às raízes da planta, a rizosfera, é tipicamente muito maior do que a que ocorre em outras regiões do solo, pois os exsudatos radiculares, nutrientes como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outras pequenas moléculas, atraem bactérias para esta área, sendo ela mais abundante em microrganismos do que o *bulk soil* em seu entorno (Glick, 2012). Define-se a rizosfera, então, como a região do solo que sofre influência direta da raiz da planta, através de seus exsudatos, que atraem biomassa microbiana para esta região, pois aí há alta disponibilidade de nutrientes em relação ao solo circundante, o que leva a relações de benefício ou prejuízo entre bactérias do solo e plantas, afetando diretamente a agricultura (Barret, Morrissey e O' Gara, 2011).

Portanto, o desenvolvimento vegetal está ligado à abundância e diversidade microbiana, pois dela dependem a degradação da matéria orgânica do solo, a mineralização de nutrientes, a fixação de nitrogênio, e até mesmo o controle de patógenos e a proteção das plantas contra pragas, dentre outros processos. Em contrapartida, a comunidade vegetal presente afeta a diversidade microbiana do solo através de exsudatos radiculares, compatibilidade entre simbiontes e hospedeiros e pelo tipo de deposição de matéria orgânica via serapilheira, dentre outros fatores (Berg e Smalla, 2009; Rachid et al., 2015), através da variação na composição e quantidade destes exsudatos radiculares, que permite a modulação, por parte da planta, da composição e da abundância da microbiota associada à rizosfera, sendo esta variação também temporal, ou seja, nos diferentes estágios de desenvolvimento da planta (Bakker et al., 2012). Estes exsudatos agem como substratos e moléculas sinalizadoras para os microrganismos, o que leva à criação de uma relação complexa e integrada entre plantas e microbiota do solo (Chaparro et al., 2012). A atração por quimiotaxia dos microrganismos para a rizosfera é chamada “efeito rizosférico”, sendo as interações entre plantas e microrganismos do solo regidas pelos exsudatos radiculares, em um processo em que os compostos orgânicos secretados pela planta têm importante papel na colonização das raízes e também no controle biológico de patógenos (Hassan, McInroy e Kloepper, 2019).

A estrutura da comunidade de microrganismos na rizosfera difere do restante do solo em seu entorno, podendo apresentar maior abundância de microrganismos, como acima mencionado, mas com diversidade biológica menor, pois trata-se de organismos recrutados a partir do solo adjacente pela planta, ou seja, é um subconjunto destes (Fierer et al., 2007). Cabe ressaltar que os efeitos que uma espécie microbiana terá sobre a planta dependerá das condições ambientais como um todo, sendo passíveis de mudança conforme as condições ambientais mudem (Glick, 2012).

Resumindo, microrganismos que fazem parte da microbiota rizosférica podem ter efeitos profundos no crescimento, nutrição e saúde das plantas, tanto em ambientes naturais quanto em agroecossistemas (Phillippot et al., 2013), podendo haver alterações na produtividade das plantas, com a contrapartida de modulação dessa biomassa microbiana por parte das plantas, que moldam essa comunidade microbiana na região da rizosfera, aumentando as funções aí presentes, em um verdadeiro processo de seleção destes microrganismos (Zak et al., 2003). Porém, estas relações podem ser tanto de prejuízo quanto de benefício para ambas as partes, e microrganismos benéficos em um conjunto de condições podem tornar-se prejudiciais ou até patogênicos sob condições diferentes (Fierer, 2017). Desta forma, a interação

entre as plantas e o ambiente que as circunda é um processo dinâmico, através de sinais químicos emitidos pelos microrganismos do solo. Esses sinais são reconhecidos pelas plantas, e têm como resposta a liberação dos exsudatos radiculares (Bais et al., 2006), cujo processo de secreção varia desde difusão, canais iônicos e transporte por vesículas, mecanismos com baixo ou nenhum gasto energético para as plantas, até transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*), que utilizam a energia química contida em moléculas de ATP para que a exsudação ocorra (Chaparro et al., 2012).

#### 1.4. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

Dentre os microrganismos encontrados associados às plantas, destacam-se as PGPB, bactérias que promovem o crescimento vegetal. Trata-se de bactérias de vida livre, ou simbióticas, como as encontradas nos nódulos radiculares de algumas espécies vegetais (por exemplo, *Rhizobium spp.* e algumas leguminosas), além de bactérias endofíticas que colonizam partes dos tecidos internos das plantas sem a formação de estruturas visíveis.

As PGPB são capazes de gerar promoção do crescimento das plantas por mecanismos diretos, como a facilitação da aquisição de nutrientes e a modulação dos níveis de fitormônios, ou por mecanismos indiretos, através da inibição de patógenos, dentre outros meios (Glick, 2012). Além disso, as PGPB ajudam potencialmente no combate às doenças das plantas, podendo auxiliar na forma como as mesmas lidam com estresses abióticos no solo, o que é possível pela produção de fitormônios e metabólitos associados. Ademais, podem atuar sobre as raízes, causando-lhes mudanças morfológicas capazes de melhorar a relação planta-água e o estado nutricional da planta, através do estímulo das defesas da própria planta contra os estresses ambientais (Goswami e Deka, 2019).

A adição de PGPB ao solo cultivado pode aumentar a absorção de nutrientes pelas plantas, aumentando sua taxa de crescimento e, ao inocular estas bactérias vivas no solo, elas são potencialmente autossustentáveis, de forma que pode haver pouca necessidade de repetidas aplicações à área cultivada. O uso de PGPB pode, também, preencher nichos vazios no solo degradado, minimizando a instalação de microrganismos danosos às plantas (Fließbach et al., 2009), aumentando a resistência do sistema à invasão por parte de patógenos, tudo isso aliado ao potencial de crescimento vegetal promovido por diversos mecanismos. Há, também, PGPB que podem aumentar a capacidade fotossintética das plantas, conferir tolerância à alta salinidade, a condições de seca e aumentar sua capacidade de absorção de ferro (Chaparro et

al., 2012). Algumas PGPB também produzem osmólitos, que ajudam no combate a condições severas de seca. Estas moléculas bacterianas trabalham em conjunto com os osmólitos produzidos pelas plantas, auxiliando no crescimento vegetal (Goswami e Deka, 2019). Além disso, as PGPB muitas vezes facilitam a aquisição de nutrientes pelas plantas, tais como nitrogênio, ferro, fósforo e potássio (Chaparro et al., 2012).

Um dos mecanismos bacterianos de maior importância ecossistêmica é a fixação biológica de nitrogênio, sendo um dos efeitos mais estudados das PGPB. A fixação de N ocorre de forma simbiótica entre rizobactérias e leguminosas. Estas plantas fornecem C reduzido às bactérias, além do microambiente anaeróbico nos nódulos das raízes, que permite a atividade da enzima nitrogenase, tornando possível às bactérias fornecer nitrogênio biologicamente disponível para as plantas (Oke e Long, 1999).

Grande parte do fósforo presente no solo está sob forma insolúvel, como um mineral inorgânico (apatita) ou sob formas orgânicas incluindo o fitato, fosfomonoésteres e fosfotriésteres (Khan, Zaidi e Wani, 2007). Normalmente, há ampla fertilização com uso de rocha fosfática retirada de minas, cuja maior parte se encontra no Marrocos e no Sahara Ocidental, sendo um recurso limitado. Como solução para o dilema do recurso de fonte esgotável, podem ser utilizados PSMs (*phosphate solubilizing microorganisms*, ou microrganismos solubilizadores de fosfato), que tornam possível o acesso das plantas aos depósitos de P não-lábil existentes nos solos, pois são capazes de metabolizar as substâncias recalcitrantes aí presentes. Isso se dá pela solubilização de P inorgânico complexado a Ca, Fe ou Al, realizada por ácidos orgânicos ou íons H<sup>+</sup>, ou pela ação da enzima fitase, que libera P reativo de compostos orgânicos (Backer et al., 2018).

Outro nutriente importante é o ferro, necessário para funções vitais da planta, como a fotossíntese e a respiração, além de ser cofator para muitas enzimas. Trata-se de um elemento de difícil absorção nos solos aeróbicos, pois aí ele se encontra sobre a forma de íon férrico ( $Fe^{3+}$ ), predominante na natureza, mas pouco solúvel e de difícil absorção tanto pelas plantas quanto por microrganismos (Ma, 2005). Para contornar esta situação e absorver ferro do ambiente, bactérias são capazes de sintetizar sideróforos, moléculas com alta afinidade ao elemento, e de baixo peso molecular, tornando-as capazes de sequestrar  $Fe^{3+}$  do solo em seu entorno, além de possuírem receptores de membrana que se ligam ao complexo Fe-sideróforo para sua internalização pelo microrganismo (Hider e Kong, 2010). Ao associar-se com plantas, estas bactérias produtoras de sideróforos melhoram a absorção do elemento pelas plantas, o que

se torna extremamente importante em solos contaminados com metais pesados, de forma que estas moléculas diminuem o estresse sobre as plantas causado por altos níveis destes poluentes (Burd, Dixon e Glick, 2000).

Muitas bactérias da rizosfera excretam fitormônios, que têm grande importância na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal, funcionando, além disso, como sinais moleculares de resposta a estresses ambientais que podem limitar o crescimento das plantas ou até mesmo levar à morte das mesmas quando fora de controle. Estes hormônios produzidos pelas bactérias são absorvidos pelas raízes, de forma que podem permitir melhoras no crescimento vegetal e na resposta ao estresse (Backer et al., 2018). O estímulo do crescimento vegetal e da aquisição de nutrientes por PGPB foi relacionado à biossíntese de moléculas como auxinas, giberelinas, citocininas e ABA (ácido abscísico), atuando de forma a modular os níveis de fitormônios nos tecidos da planta (Egamberdieva et al., 2017).

O ácido indolacético (AIA), uma auxina, afeta a divisão celular, extensão e diferenciação dos tecidos da planta, estimulando a germinação das sementes e de tubérculos, além de estimular o desenvolvimento do xilema e das raízes. Está ligado à floração, afetando a fotossíntese, formação de pigmentos e resistência a estresses ambientais. Há PGPB produtoras de AIA, e este fitormônio de origem microbiana melhora o acesso das plantas aos nutrientes do solo, afrouxando a parede celular do tecido radicular, aumentando a exsudação das raízes, o que também facilita o crescimento dos microrganismos aí presentes (Glick, 2012).

O fitormônio etileno, mesmo em concentrações muito baixas, como  $0,05\mu\text{L/L}$  (Abeles, Morgan e Saltveit Jr., 1992), tem efeito sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal, promovendo a iniciação do crescimento radicular, gerando amadurecimento de frutos e abscisão de folhas, estimulando a germinação das sementes e estimulando a síntese de outros fitormônios. Porém, em altas concentrações, como nas situações de estresse ambiental, o etileno pode afetar negativamente esse crescimento: trata-se do “etileno de estresse”, que reduz o crescimento de raízes e brotos, em condições de seca, alta salinidade, contaminação por metais pesados, escassez de nutrientes, dentre outras situações de estresse (Glick, 2014). As PGPB podem produzir a enzima ACC deaminase, que permite o crescimento vegetal mesmo sob condições de estresse, quando os níveis internos de etileno nas plantas poderiam inibir seu crescimento, e cujo mecanismo é: a ACC deaminase é capaz de clivar ACC, que é o precursor do etileno nas plantas, gerando como produtos amônia e  $\alpha$ -cetobutirato, dessa forma, diminuindo os níveis de etileno na planta sob estresse, funcionando como um dreno para o ACC

(Glick, 2004). A presença desta enzima em bactérias do solo é comum, tendo sido isoladas bactérias produtoras de ACC deaminase em diferentes habitats (Etesami e Maheshwari, 2018).

As PGPB são capazes de produzir antimicrobianos, prevenindo o crescimento de patógenos que afetam os vegetais, principalmente de fungos. Além disso, muitos destes microrganismos produzem enzimas líticas que afetam a parede celular fúngica, como quitinases, celulasas,  $\beta$ -1,3 glucanases, proteases e lipases, podendo, desta forma, ser utilizadas para o controle biológico na agricultura (Kim et al., 2008). O controle de patógenos também ocorre por competição pelo nicho colonizado pelas PGPB, que terminam por utilizar a maior parte dos nutrientes disponíveis, por serem mais bem adaptadas, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (Innerebner, Knief e Vorholt., 2011).

A resistência sistêmica induzida (RSI) pode, também, ser induzida por PGPB, e ocorre de maneira parecida com a resistência sistêmica adquirida que ativa os mecanismos de defesa das plantas quando da infecção por patógenos (Pieterse et al., 2009). A RSI faz as plantas responderem de forma mais forte e rápida a infecções por microrganismos causadores de doenças, tratando-se de uma resposta não-específica, e protege de forma mais geral contra uma ampla gama de microrganismos patogênicos. As PGPB podem induzir a RSI através da ativação de genes relacionados à patogênese, mediados por sinalização de fitormônios e proteínas regulatórias de defesa, o que prepara a planta para futuros ataques de outros patógenos (Backer et al., 2018).

### 1.5. Inoculantes

Um problema que move as pesquisas na área de agropecuária é a pressão da população humana em constante crescimento, principalmente nos países em desenvolvimento, sobre a produção de alimentos. Há risco para que todos possam ter sua nutrição básica garantida, o que é uma questão de segurança alimentar, devendo haver aumento da produtividade, mas sem causar consequências negativas ao meio-ambiente (Glick, 2012). O crescimento da população mundial ocorre ao lado do aumento dos danos ambientais resultantes da industrialização e urbanização aceleradas, e, para suprir as necessidades nutricionais de toda essa população, tem-se utilizado, de forma indiscriminada, fertilizantes químicos na produção agrícola, o que, aliado aos estresses abióticos ligados à mudança climática e ao aquecimento global, impede que as plantas cultivadas atinjam todo seu potencial genético de qualidade e produtividade (Goswami e Deka, 2019).

Um possível caminho para a solução destes dilemas é que o aumento das taxas de produção de alimentos ocorra de forma sustentável, sem agredir a biodiversidade. Isto pode ser conseguido com a aplicação de práticas cada vez mais dependentes de biotecnologia, como o uso de plantas transgênicas ou o uso de inoculantes, com PGPB, que permite o crescimento vegetal e a produtividade, mesmo sob estresses abióticos, promovendo, também, a estabilidade ambiental, o que ajuda no desenvolvimento sustentável das propriedades rurais (Goswami e Deka, 2019). Estas PGPB podem ser utilizadas não apenas como substitutivos de fertilizantes e pesticidas químicos, mas também em estratégias de biorremediação contra contaminantes depositados no solo (Glick, 2012).

Outra forma de utilizar o potencial das PGPB é através da seleção de microrganismos baseada em métodos moleculares, como a identificação de genes-chave por sequenciamento genético (NGS) (Balestrini et al., 2021), além do uso de técnicas rápidas e precisas de alterações genômicas que não deixam traços de DNA exógeno, como as novas técnicas de reprodução (*new breeding techniques*, NBTs), que compreendem nucleases do tipo *zinc finger* (ZFNs), nucleases do tipo *transcriptional activator-like effector* (TALENs) e o sistema CRISPR/Cas9 (Gaj, Gersbach e Barbas, 2013). Isto pode ser feito pela introdução de genes funcionais a bactérias residentes das plantas, ao invés de introduzir bactérias exógenas ao ecossistema, pois há sempre o risco de que as novas espécies microbianas introduzidas não consigam realizar a colonização de novos hospedeiros, ou mesmo de ser afetadas pelas condições ambientais. Assim, a engenharia de microrganismos pode ser aplicada para uma agricultura mais sustentável (Zhang et al., 2021).

Inoculantes comerciais à base de *Azospirillum sp.*, espécies fixadoras de nitrogênio, têm sido produzidos por empresas de pequeno e médio porte em todo o mundo, e seu uso tem aumentado a produtividade de diversas lavouras de cereais (Backer et al., 2018). Outros grupos bacterianos, mesmo os não-fixadores de N, têm demonstrado que há um aumento na absorção de nitrogênio pelas plantas, provavelmente por conta de melhora no crescimento radicular, o que permite maior acesso e absorção de nutrientes a partir do solo (Beattie, 2015).

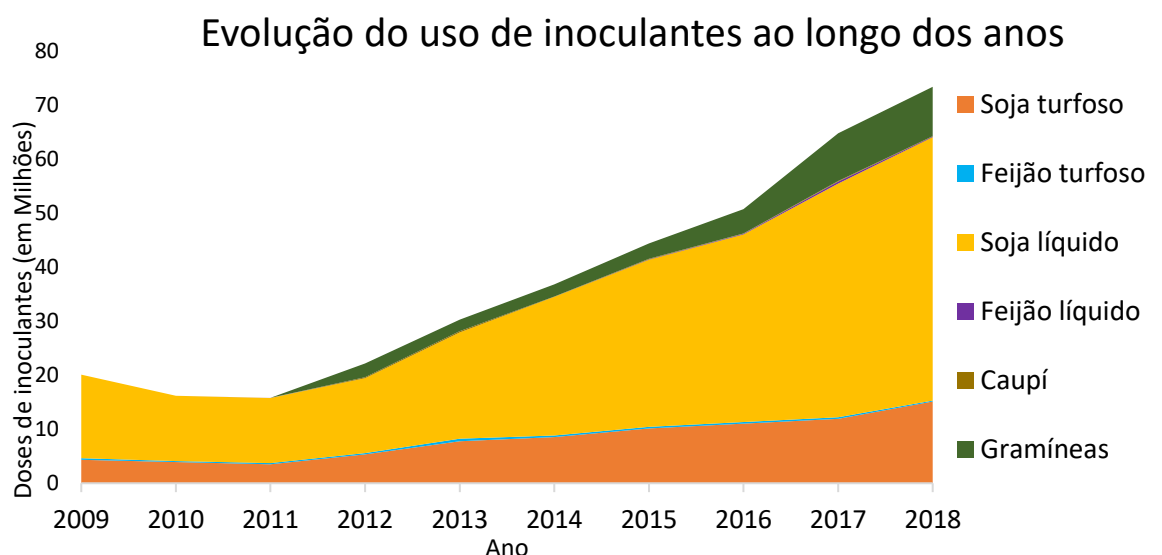
Assim, as PGPB podem ser eficazes na indução de uma ou mais das estratégias de promoção do crescimento vegetal acima descritas. Por este motivo, vem-se estudando o uso das mesmas como inoculantes em diversos tipos de lavouras e também na silvicultura, para que, cada vez menos, sejam utilizados fertilizantes químicos e agrotóxicos prejudiciais ao meio ambiente.



O mercado mundial de inoculantes representa 5% do mercado total de fertilizantes, sendo mais de 150 produtos baseados em cepas microbianas registrados para finalidades agrícolas. A maior parte destes produtos, cerca de 79% da demanda mundial, é constituída por rizóbios, com biofertilizantes solubilizadores de fosfato tendo cerca de 15% do mercado mundial, e outros biofertilizantes, como fungos micorrízicos arbusculares, representando cerca de 7% do mercado. Em 2017, o mercado mundial de biofertilizantes movimentou mais de um bilhão de dólares, com expectativa de crescimento para mais de 2 bilhões de dólares até 2023, com taxa de crescimento anual cumulativa projetada de 10,1% para o período de 2018-2023, crescimento este suportado pela crescente demanda de alimentos orgânicos a nível mundial (Macik, Gryta e Frac, 2020).

No Brasil, segundo dados de 2019, o mercado interno de bioinsumos movimentou 675 milhões de reais, crescendo 15% em relação ao ano anterior, acima da média de crescimento mundial do setor, de cerca de 11%, sendo o número de defensivos biológicos registrados no MAPA de 275 produtos, entre bioacaricidas, bioinsecitidas, biofungicidas e bioformicidas, e 321 inoculantes promotores de crescimento das plantas (Sartori, 2020).

Para evidenciar o crescimento do setor no Brasil, dados da Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) demonstram o uso de doses de inoculantes em diferentes lavouras, como se observa na Figura 1.



**Figura 1** - Doses de diferentes tipos de inoculantes utilizados em cultivo de feijão, soja, e gramíneas. Tugoso, e líquido são formas de veiculação do inóculo. Caupí é uma variedade de feijão. Fonte Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>)

## 1.6. Multiplicação *on farm* de inoculantes

No agronegócio brasileiro, o uso da biotecnologia tende ao aumento de cerca de 25% ao ano, gerando demanda para o setor de produção de bioinsumos, com a finalidade de aumentar a capacidade industrial instalada no segmento. Isso se deve à busca de tecnologias cada vez mais avançadas, em consonância com a agenda de sustentabilidade, que se torna cada vez mais importante, especialmente no âmbito do mercado internacional de *commodities*. Isso fica evidente quando se toma como exemplo a fixação biológica de nitrogênio com o emprego de inoculantes na cultura da soja, que representa uma economia de 15 bilhões de dólares ao ano, pela redução no uso de fertilizantes nitrogenados, com o benefício de deixar de emitir 165 milhões de toneladas de  $CO_2$  (Pauli, 2021). Além disso, o Mapa lançou, recentemente, o Programa Nacional de Bioinsumos, que visa o aumento do uso de recursos biológicos no setor agropecuário nacional, levando à redução da dependência de insumos importados e ampliando a oferta de matéria-prima para o segmento (Brasil, 2020).

Na cultura da soja, o uso de inoculantes gera economia da ordem de sete bilhões de dólares por ano. Mas não é apenas no grande agronegócio, como na cultura de soja, feijão e milho, que o uso de bioinsumos pode melhorar a produtividade e reduzir custos, de forma sustentável (Sartori, 2020). Especialmente na agricultura familiar, o uso de inoculantes ainda não é muito disseminado, e, para levar o conhecimento sobre os bioinsumos e seu uso a estes pequenos proprietários, há iniciativas na Comissão de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Desenvolvimento Rural da Câmara dos Deputados, com a finalidade de discutir a importância da formulação de políticas públicas e da troca de informações entre os diversos atores do setor, incluindo Embrapa, Instituto Brasil Orgânico, Confederação Nacional de Trabalhadores na Agricultura e Câmara Temática de Agricultura Orgânica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), evidenciando a necessidade de aproximar os diferentes segmentos de pesquisa, extensão, empresariado, agricultores ou técnicos, para que se pense em maneiras de estimular o setor (Bello, 2021).

O uso de inoculantes multiplicados localmente nas propriedades, *on farm*, seria uma alternativa para o pequeno agricultor (a agricultura familiar é responsável por 60% da produção de alimentos no Brasil) que dificilmente tem acesso a inoculantes comerciais, além do difícil acesso às tecnologias e do uso reduzido de insumos externos, o que torna os níveis de produtividade, em geral, mais baixos do que os obtidos pela agricultura empresarial (Ferreira, 2017).

Desenvolver a tecnologia de multiplicação de bioprodutos localmente, nas fazendas, pode ser uma alternativa viável para pequenos e médios produtores que queiram trabalhar com agricultura orgânica, pois pode haver o aproveitamento de resíduos ou fontes baratas de produtos da fazenda, tais como soro de leite ou caldo-de-cana, como fontes potenciais de nutrientes para o crescimento de microrganismos *in loco*. Esse processo pode reduzir bastante o custo de produção, não só pela utilização de insumos já existentes na fazenda, como pela economia com o transporte de grandes volumes das biofábricas até as propriedades. Além disso, a utilização de resíduos diminui a poluição, além de reduzir o uso de fertilizantes e pesticidas químicos na cadeia produtiva, gerando benefícios ambientais (Santos, Nogueira e Hungria, 2019).

O uso de bioprodutos, ao invés de produtos químicos tradicionais, permite, também, que os produtores obtenham certificação de orgânico para seus produtos, o que agrega valor aos mesmos, como explicitado mais acima, e o uso de insumos locais lhes dá autonomia econômica para obter o necessário para sua produção.

A utilização de microrganismos indígenas à propriedade (autóctones) é típica na agricultura natural asiática, especialmente no método KFN, ou *Korean Natural Farming*, desenvolvido pelo Dr. Cho, e utiliza equipamentos e materiais disponíveis na própria fazenda (Keliikuli et al., 2019). Porém, este método de produção *on farm* de fertilizante natural utiliza um conjunto microbiano desconhecido, não-identificado laboratorialmente, que vem sendo usado de forma puramente empírica. Desta maneira, o proprietário não tem conhecimento exato do que está utilizando em suas terras.

Hoje, no Brasil, a legislação permite a produção de bioinsumos *on farm* e sua utilização no âmbito da agricultura e pecuária, segundo o Decreto nº 6.913, de 23 de julho de 2009 (Brasil, 2009), pois se trata de reproduzir microrganismos que são encontrados na natureza, de forma que se busca a manutenção das diversas funções originalmente encontradas no solo.

Os microrganismos eficientes podem ser procariotos ou eucariotos (fungos) isolados do solo de áreas de matas virgens ou regiões com baixa ação antrópica, e que apresentam capacidade de decomposição da matéria orgânica do solo e outros serviços ecossistêmicos ligados à ciclagem de nutrientes, e, ao serem utilizados, agem de forma rápida, vivificando o solo (Dias e Schwengber, 2018). Ao se realizar a multiplicação *on farm* destes microrganismos isolados localmente, garante-se que, desde o momento de sua produção em meios de cultivo, em biorreatores, até sua aplicação no solo, o tempo que se passa é muito curto, ou seja, há maior

chance da manutenção da atividade metabólica destes microrganismos, não havendo perda significativa da mesma por conta de transporte a longas distâncias, armazenamento a temperaturas baixas e outros problemas, o que leva a uma melhoria da atividade destes inóculos em relação a inoculantes industrializados que possam vir a ser adquiridos pelo proprietário rural para aplicação na fertilização de suas terras. Esta facilidade da produção de inoculantes ocorrer na própria fazenda leva também a grande diminuição de custos, o que gera economia para o produtor, aumentando sua renda e gerando mais capital para que haja reinvestimento na melhoria de sua produção, em um ciclo economicamente virtuoso.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento tem normas para a produção de tais inóculos *on farm*, e destaca-se o Decreto 6.913, de 23 de julho de 2009, em cujo Parágrafo 8 isenta-se de registros os produtos fitossanitários com uso aprovado para agricultura orgânica que sejam produzidos para uso próprio, inclusive para o uso na própria fazenda, como fertilizante ou pesticida biológico. Ou seja, o agricultor pode multiplicar *on farm* os microrganismos isolados de sua fazenda, ou mesmo realizar esta multiplicação a partir de inóculos adquiridos de indústrias, não podendo, contudo, comercializá-los com terceiros (Brasil, 2009).

Para que tal multiplicação de inóculos aconteça na propriedade, vários procedimentos e condutas de boas práticas devem ser aplicadas, a fim de impedir contaminações dos inóculos iniciais e evitar que se multipliquem microrganismos indesejáveis nos biorreatores, garantindo a pureza das culturas. Da mesma forma, deve ser realizado controle de qualidade periódico, garantindo, assim, que o inoculante produzido esteja em perfeitas condições para ser aplicado ao solo da propriedade.

Para isso, deve haver a instalação de uma infraestrutura apropriada, com água controlada, higienização dos ambientes onde ocorrerão os processos microbiológicos, formas de esterilizar os meios de cultivo e os biorreatores, da mesma forma que um treinamento dos funcionários da propriedade que entrarão em contato com a multiplicação de microrganismos, de forma que eles observem e garantam o bom funcionamento destas boas práticas de produção na área da biofábrica.

Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de protocolos acessíveis ao pequeno e médio produtor, como a produção de cartilhas que tragam as informações necessárias para que possam multiplicar os inóculos de forma segura em suas propriedades, com eficiência e reduzindo ao máximo os riscos de contaminação, com aproveitamento dos resíduos de suas

propriedades, levando a maior independência de insumos externos à propriedade, aumentando, também, sua independência econômica.

## 2. JUSTIFICATIVA:

A agropecuária no Brasil, país de solos tropicais tipicamente ácidos e pobres em alguns nutrientes, faz utilização intensiva de fertilizantes químicos. Estes são caros, com preços atrelados à variação do dólar e tornam-se inacessíveis em momentos de altas de preços internacionais. Além disso, quando utilizados de forma incorreta, são prejudiciais ao meio ambiente, pois geram poluição, como a eutrofização de corpos d'água e o aumento na emissão de óxido nitroso, um importante gás de efeito estufa.

Como alternativa para reduzir ou até eliminar o uso dos insumos químicos, podem ser utilizados inoculantes e outros bioinsumos a base de microrganismos benéficos às plantas, que podem melhorar sua nutrição, proteger contra pragas e patógenos, aumentar sua tolerância contra estresses abióticos e ainda estimular seu crescimento. Como tratam-se de microrganismos, e não de insumos químicos industrializados, preserva-se a biodiversidade dos solos, garantindo um sistema mais saudável e sustentável. Adicionalmente, é um sistema que pode ser aplicado à agricultura orgânica, o que gera produtos com maior valor agregado.

Contudo, hoje a utilização de inoculantes ainda é focada em grandes produtores, principalmente na monocultura da soja. O pequeno agricultor tem baixo acesso a esses produtos, principalmente por questões técnicas e de custos.

Uma das formas de garantir a democratização do acesso ao uso dos inoculantes é levar o conhecimento sobre a importância do uso dessa biotecnologia ao agricultor, e também garantir que ele tenha condições econômicas de utilizá-la. Para tanto, é necessário conseguir baratear ao máximo o produto, e uma das principais maneiras é dar ao agricultor as ferramentas e o conhecimento para que ele possa, de forma segura e eficiente, fazer a multiplicação e o escalonamento de inoculantes na sua propriedade.

Assim, o presente trabalho é o primeiro passo no desenvolvimento de uma tecnologia para a multiplicação de inóculos *on farm* dentro do conceito de biorrefinaria, ou seja, utilizando resíduos e substratos da própria fazenda, de modo a ampliar a viabilidade do uso de inoculantes e aumentar a autonomia do pequeno e médio produtor rural.

### 3. HIPÓTESES:

- Diferentes matérias-primas de propriedades rurais, como caldo de cana-de-açúcar e soro de leite, podem ser meios de cultivo para multiplicação *on farm* de inoculantes.
- Os substratos podem influenciar na capacidade de promoção do crescimento vegetal.

### 4. OBJETIVO:

Verificar o efeito das diferentes combinações de substratos sobre a multiplicação de PGPBs e sobre a biomassa de plantas. Além de identificar técnica(s) de desinfecção capazes de reduzir a carga microbiana de microrganismos exógenos.

#### 4.1. Objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento de estirpes modelo, utilizando como matéria-prima o caldo de cana-de-açúcar e o soro de leite em diferentes composições;
- Avaliar o efeito de consórcio bacteriano crescido nos meios de cultivo testados sobre a biomassa de feijoeiros em casa de vegetação;
- Avaliar diferentes técnicas de desinfecção das matérias-primas para minorar a contaminação com microrganismos exógenos.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS:

### 5.1 Substratos utilizados

Para a execução deste experimento, foram utilizados como substratos o caldo de cana-de-açúcar, rico em carboidratos, além do soro de leite, que é um subproduto da produção de queijos de propriedades rurais, rico em proteínas.

O caldo-de-cana utilizado neste experimento foi gerado através da simples moagem da cana-de-açúcar, *in natura*, e foi obtido em uma feira-livre, no município do Rio de Janeiro. Já o soro do leite foi produzido a partir de leite pasteurizado integral, adquirido em supermercado. 4 litros do leite foram aquecidos a 35°C, em uma panela grande. Acrescentaram-se 4mL de coalho HA-LA, mexendo para misturar bem. Após 1 hora, a massa coalhada foi cortada com uma faca limpa, em todas as direções, de forma a liberar o soro. Após 40 minutos, a mistura foi coada, com auxílio de um pano de cozinha limpo, separando-se, assim, o soro do queijo.

O soro foi, então, filtrado em bomba de vácuo com kitasato, com gaze, em algumas camadas, utilizada como filtro. Os 4 litros iniciais de leite renderam cerca de 2,8L de soro de leite filtrado.

Tanto o caldo de cana-de-açúcar quanto o soro de leite, visualmente, apresentaram alta turbidez. Além da turbidez, o caldo de cana apresentou significativa quantidade de material particulado em suspensão. Decidiu-se utilizar os substratos desta forma, para que não se perdesse seu valor nutritivo para o crescimento bacteriano.

### 5.2. Determinação do teor de carboidrato do caldo de cana-de-açúcar e do soro de leite

A quantificação dos açúcares redutores no caldo de cana-de-açúcar (*in natura*) e no soro de leite (obtido a partir da coagulação de leite integral pasteurizado) foi determinada pelo método DNS, baseada na metodologia descrita por Miller e modificada para excluir o uso de fenol (Miller, 1959). Foi utilizada glicose como padrão.

A solução de DNS foi preparada utilizando-se 10g de DNS dissolvidos a frio em 500mL de água deionizada. A esta solução, foram adicionados 200mL de solução de NaOH 2M. Após esta dissolução, 30g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) foram adicionados a esta solução, que foi avolumada para 1000mL em balão volumétrico. A solução foi armazenada em frasco escuro e mantida ao abrigo da luz.



Para a realização da quantificação de açúcares redutores, foi feita uma curva padrão com glicose a 0, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{mol/mL}$ : 500  $\mu\text{L}$  de reagente DNS foram adicionados a 500  $\mu\text{L}$  de cada uma destas soluções, em tubos de ensaio de vidro. As amostras a serem dosadas foram preparadas em paralelo, da mesma forma, em diferentes diluições (10x diluído, 50x diluído e 100x diluído). Toda a análise foi feita em triplicata. Os tubos de ensaio foram fervidos ao mesmo tempo, por 5 minutos, e, imediatamente, transferidos para banho de gelo. Após esfriar, foram adicionados 5,5 mL de água deionizada a cada tubo, e o conteúdo de cada tudo foi lido em espectrofotômetro, individualmente, a 540nm. Foi construída uma curva-padrão e obtida uma equação da reta, a partir da qual foram calculadas as concentrações de açúcares redutores nas amostras.

Porém, para realizar a quantificação de açúcares redutores na amostra de caldo de cana-de-açúcar, rico em sacarose, foi necessário realizar a hidrólise da sacarose, pois trata-se de açúcar não-redutor. Para tal, 2mL de amostra foram adicionados a 2mL de HCl 2M em tubos de ensaio de vidro, em triplicata, e aquecidos em banho maria em ebulição por 10 minutos e, em seguida, resfriados em banho de gelo. Logo, foram acrescentados 2 mL de NaOH 2M a cada tubo, os quais foram agitados. Foram retiradas de cada um destes tubos alíquota necessária para realizar a dosagem de açúcares redutores pelo método DNS acima descrito.

### 5.3. Quantificação do teor de proteínas totais do soro de leite e do caldo de cana-de-açúcar

A quantidade de proteínas totais do soro de leite e do caldo de cana-de-açúcar foi determinada pelo método de Bradford utilizando BSA (*bovine serum albumin*) como padrão (Bradford, 1976).

Para tal, foi preparado o reagente de Bradford da seguinte forma: diluiu-se 0,1g de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50mL de água deionizada. A esta solução foram adicionados 100mL de ácido fosfórico. Avolumou-se, então, esta solução para 1000mL em balão volumétrico ao abrigo da luz, com água deionizada. Após uma hora decantando no balão, a solução foi filtrada com bomba de vácuo, papel filtro e funil, e o filtrado guardado em garrafa âmbar e mantido na geladeira. A solução deve ficar 24h em repouso antes de ser utilizada em dosagem.

Foi feita uma curva padrão com BSA nas concentrações de 0mg/mL, 0,05mg/mL, 0,1mg/mL, 0,15mg/mL, 0,2mg/mL, 0,25mg/mL e 0,3mg/mL. Foram adicionados 3mL do reagente de Bradford a 300µL de cada solução, em triplicata, agitados no vórtex e, após 5 minutos, lidos a 595nm em espectrofotômetro, individualmente. O mesmo foi feito para as amostras, em triplicata. A partir dos valores dos padrões, foi construída uma curva padrão, que forneceu uma equação da reta. A partir desta, foram calculadas as concentrações proteicas das amostras.

#### 5.4. Avaliação do crescimento de estirpes modelo, utilizando como substratos o caldo de cana-de-açúcar e o soro de leite em diferentes composições

Para este experimento, foram utilizadas estirpes pertencentes à coleção de bactérias do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana - LABEM, que foram previamente isoladas de plantas, e caracterizadas quanto ao seu potencial promotor de crescimento vegetal. Foram selecionadas estirpes do gênero *Bacillus* e *Paraburkholderia* por serem alguns dos gêneros mais utilizados como inoculantes, e estirpes dos gêneros *Methylobacterium* e *Pantoea*, por terem capacidade PGPB comprovadas e facilidade morfológica de identificação, pois produzem cor rosa e alaranjada, respectivamente.

As estirpes bacterianas utilizadas, da coleção do LABEM, têm a sua designação taxonômica mais fina encontrada e as atividades PGPB relacionadas a cada uma na listagem abaixo. As estirpes 1, 2 e 5 estão registradas no SisGen sob o número de cadastro A4FE135.

1. F128 (*Pantoea sp.*) - Produtor de AIA, atividade antagônica contra *Ralstonia sp.*
2. F230 (*Bacillus sp.*) - Atividade ACC-deaminase.
3. 1.2 (*Paraburkholderia caribensis*) - Solubilizador de fosfato, mineralizador de fitato, atividade ACC-deaminase.
4. 21 A (*Methylobacterium sp.*) – Solubilizador de fosfato, mineralizador de fitato.
5. F292 (*Bacillus sp.*) – Produtor de AIA, atividade antagônica contra *Ralstonia sp.*

As bactérias foram reativadas em placas, em meio TSA, a partir das quais foram feitos os pré-inóculos em meio TSB estéril. Para tanto, frascos foram inoculados e mantidos por 24h, sob agitação de 160rpm, a 32°C.

Os substratos, previamente caracterizados, foram testados de forma combinada, empiricamente, de maneira a determinar a melhor concentração de cada componente para permitir o crescimento de estripes modelo que podem ser utilizadas como inoculantes. As misturas empíricas buscaram manter teor de carboidratos próximo à 6°BRIX, que é aproximadamente o valor utilizado pela indústria sucro-alcooleira para fermentações em larga escala.

Assim, baseados nas quantificações de proteínas e carboidratos previamente obtidas, foram formulados três meios de cultivo experimental (esterilizados por autoclavação por 15 minutos).

Meio A: caldo de cana-de-açúcar a 33% (6°BRIX e 0,3g/L de proteínas)

Meio B: soro de leite a 100% (6°BRIX e 7g/L de proteínas)

Meio C: caldo de cana-de-açúcar a 12,5% e soro de leite a 50% (5,25°BRIX e 3,6g/L de proteínas)

Todo o ensaio foi feito em triplicata. As composições (A, B e C) foram testadas em volume total de 20 mL, em frascos do tipo Erlenmeyer de 50 mL de capacidade e foram esterilizadas, por meio de autoclavação, por 15 min. Cada um destes frascos recebeu um inóculo de cada estirpe, com densidade ótica de 0,04, que foi obtida a partir do pré-inóculo anteriormente descrito. Os meios inoculados foram mantidos em agitação, a 160 rpm e 32°C.

O crescimento bacteriano foi medido por contagem de UFC/mL, pois os meios são turvos em demasia, e a tentativa de medição por aumento de densidade ótica ao longo do tempo não resultou em dados confiáveis. Desta forma, após 24h e 48h, foram retirados 0,1mL de cada amostra, diluídos de forma seriada em água destilada estéril, em microtubos esterilizados, até a diluição de  $10^{-8}$ . Foram plaqueados 0,1mL das três maiores diluições, para cada triplicata, em placas de Petri contendo 20mL de meio TSA estéril, pela técnica de espalhamento, com auxílio de alça de Drigalski. As placas, uma vez prontas, foram mantidas em estufa a 30°C por 24h, para posterior contagem.

### 5.5. Avaliação da influência dos fermentados por dois meios na promoção do crescimento de plantas em casa de vegetação

Após avaliar o crescimento das estirpes bacterianas estudadas, foram feitos consórcios bacterianos com os Meios A e C. Para tal, as amostras com o caldo com as bactérias crescidas, na ordem de  $10^9$  UFC/mL, foram diluídas 100x, em PBS (tampão fosfato-salino).

Foram preparados 3 consórcios bacterianos idênticos para cada meio, mas que tiveram seu crescimento independente, a partir das triplicatas do caldo fermentado pelas bactérias F230, 21A e F292 do experimento de crescimento bacteriano, nos meios A e C. Além disso, foram feitas 9 amostras controle, em que um mesmo volume de PBS foi aplicado, mas sem nenhuma amostra microbiana.

Para o plantio, foram utilizadas sementes de feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*), plantadas em substrato com fertilizante (NPK) na concentração de 3g/litro de substrato. Utilizaram-se tubetes com capacidade para 800mL de substrato, e foram plantadas 3 sementes por tubete. O substrato foi inoculado com os consórcios bacterianos 2 semanas antes do plantio das sementes de feijão. As sementes foram previamente deixadas de molho com as amostras do consórcio bacteriano acima descritas, por cerca de 1 hora, em béqueres. Cada vaso recebeu 3 sementes e cerca de 250 mL de inoculante, aplicado com auxílio de regador (750 mL de inoculante de cada amostra no regador, distribuídos entre 3 vasos). Após o plantio, foi feita a randomização do experimento em relação à distribuição das amostras nas bandejas para mudas. As plantas foram irrigadas por gotejamento, e o tempo decorrido entre o plantio e a colheita foi de 28 dias.

Após a colheita, as plantas tiveram a parte aérea separada com tesoura de poda e pesada em balança (massa úmida, logo após colheita, e massa seca, após 72 horas em estufa de secagem a 65°C, em embalagens de papel), e as raízes lavadas com água corrente, peneiradas para retirada total do substrato e pesadas (massa seca, após 72 horas em estufa de secagem a 65°C, em embalagens de papel), de forma a verificar a biomassa total com os diferentes tratamentos, e em comparação com as plantas controle.

## 5.6. Avaliação de diferentes técnicas de desinfecção para diminuir a contaminação com microrganismos exógenos

Fora do ambiente laboratorial, a manipulação asséptica de materiais é inviável. Assim, testaram-se formas caseiras de redução da carga microbiana associada aos diferentes substratos. Foram testados os seguintes métodos de desinfecção do substrato:

- Fervura por 20 minutos;
- Adição de metabissulfito de sódio na concentração 200mg/L, seguido por 24 horas de estabilização antes da inoculação;
- Controle (sem tratamento).

Cada tratamento foi feito em frascos do tipo Erlenmeyer de 50 mL de capacidade, com 20mL de meio de cultivo cada, em triplicata. O meio A foi eleito para este experimento, pois resultados prévios do experimento de crescimento bacteriano permitiu a eliminação de um dos meios de cultura estudados (meio B), e os resultados parciais do experimento de crescimento de plantas, após 14 dias da data do plantio, permitiu a exclusão do meio C.

Não foi feito nenhum inóculo, pois a capacidade dos métodos de eliminar a contaminação endógena dos meios de cultura foi testada. O desenvolvimento das comunidades foi medido a partir do monitoramento do número de unidades formadoras de colônia, retirando-se alíquotas de 0,1mL, e diluindo-as até  $10^{-8}$ . As seis maiores diluições foram plaqueadas em placas de Petri com 20mL de meio de cultivo TSA estéril, para contagem de número de unidades formadoras de colônia e avaliação do padrão de morfotipos formados.

## 5.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados no software Past 4.09 (Hammer, Harper e Ryan, 2001). Os resultados dos experimentos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Turkey, após a verificação de normalidade e a homocedasticidade dos dados.

## 6. RESULTADOS:

### 6.1. Determinação do teor de carboidrato do caldo de cana-de-açúcar e do soro de leite

Após a hidrólise da sacarose das amostras de caldo de cana-de-açúcar, as amostras tanto de caldo de cana quanto de soro de leite foram dosadas pelo método DNS (Figura 2). O caldo de cana-de-açúcar apresentou 18° BRIX, e o soro de leite 6° BRIX.



**Figura 2** – Quantificação de açúcares redutores pelo método DNS. Curva padrão e amostras (10x, 50x e 100x diluídas), em triplicata.

### 6.2. Quantificação do teor de proteínas totais do soro de leite e do caldo de cana-de-açúcar

As amostras de soro de leite dosadas pelo método de Bradford apresentaram 7mg/mL de proteínas totais, e o caldo de cana-de-açúcar 0,9mg/mL.

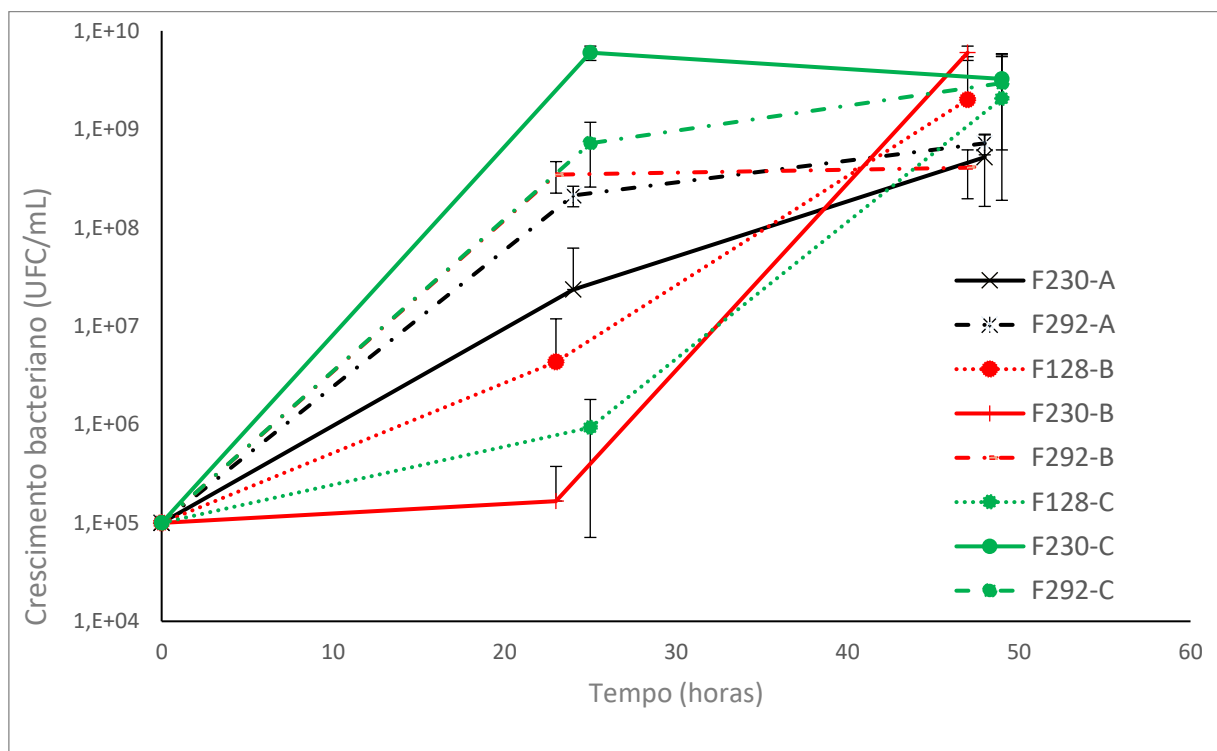
### 6.3. Avaliação do crescimento de estirpes modelo, utilizando como substrato o caldo de cana-de-açúcar e o soro de leite em diferentes composições

Para o meio A (caldo de cana-de-açúcar a 33%), a estirpe F128 não apresentou crescimento. As estirpes F230 e F292 apresentaram crescimento expressivo, da ordem de  $10^8$  UFC/mL em 24h e  $10^9$  UFC/mL em 48, em todas as triplicatas (Figura 3).

No meio B, soro de leite a 100%, após 48 horas, as estirpes F230 e F292 apresentaram crescimento mais acentuado, da ordem de  $10^{10}$  e  $10^8$  UFC/mL, respectivamente, enquanto a estirpe F128 chegou a  $10^9$  UFC/mL após 48 horas (Figura 3).

No meio C, a saber, 12,5% caldo de cana-de-açúcar e 50% soro de leite, a estirpe F230 chegou a  $10^{10}$  UFC/mL após 24 horas, decrescendo para  $10^9$  UFC/mL após 48 horas. Já a estirpe F128 apresentou crescimento de  $10^6$  UFC/mL após 24 horas e  $10^9$  UFC/mL após 48 horas. A estirpe F292 também apresentou crescimento da ordem de  $10^9$  UFC/mL após 48 horas (Figura 3).

As estirpes 1.2 e 21A não apresentaram crescimento nas placas de Petri, portanto não foram apresentadas contagens. É importante notar que a estirpe 21A, por sua coloração rosa, modifica bem a coloração do meio fermentado, e era possível verificar que ela havia se multiplicado em todas as misturas. Contudo, ela não apresentou crescimento no meio TSA.



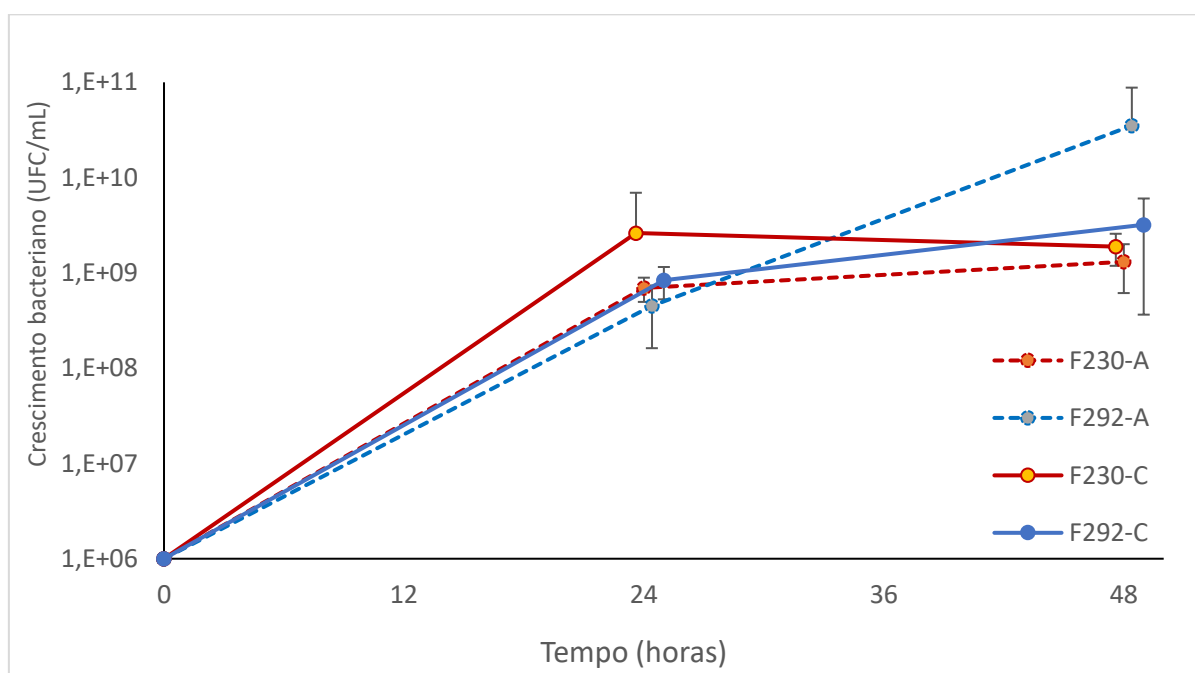
**Figura 3** – Crescimento bacteriano das estirpes F128, F230 e F292 nos meios A, B e C. Os pontos representam médias (n=3) e as barras de desvio representam o desvio padrão da triplicata.

A partir dos dados obtidos neste experimento, foi excluído o meio B, pois ele apresentou menor crescimento em 24h para a maior parte dos microrganismos, e foi realizado o crescimento bacteriano nos meios A e C.

Por não ter crescido no primeiro experimento, a estirpe 1.2 foi excluída deste segundo, mas optou-se por manter a estirpe 21A, na tentativa de ver se ela se desenvolveria no TSA nessa segunda tentativa.

Já neste segundo experimento, após 48 horas de crescimento, a estirpe F128 não apresentou crescimento nos meios líquidos. A estirpe 21A, todavia, apesar de ainda não crescer nas placas com meio de cultivo TSA, estava presente no pellet formado após centrifugação do meio de cultivo após este tempo, o que ficou evidente pela cor rósea que esta estirpe bacteriana apresenta.

As outras duas estirpes estudadas apresentaram crescimento quantificável, e com dinâmica bastante similar em abas as composições (Figura 4). Após 24h de crescimento, as populações já tinham chegado próximo à ordem de  $10^9$  UFC/mL. Apenas a estirpe F292 continuou crescendo entre 24 e 48h, no meio A, à ordem de  $10^{10}$  UFC/mL.



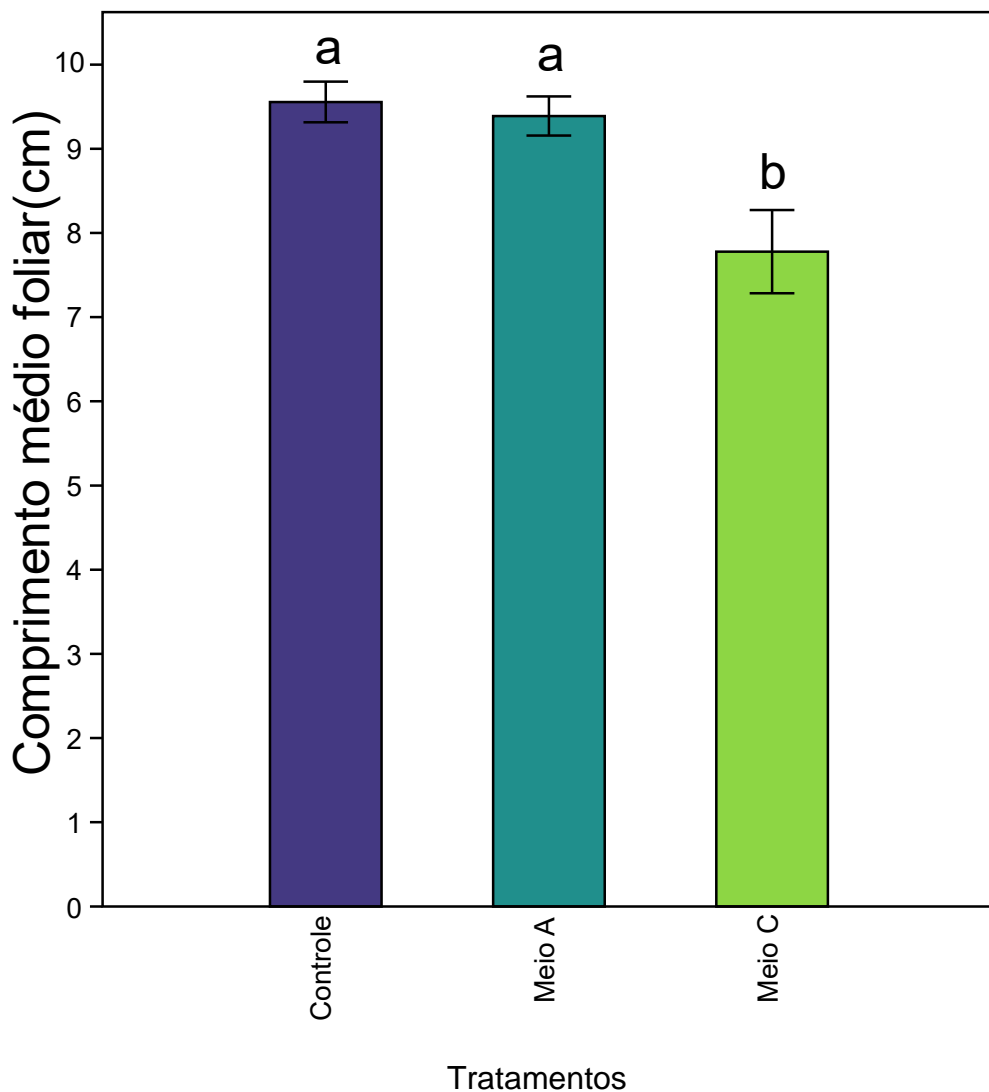
**Figura 4** – Crescimento bacteriano das estirpes F230 e F292 nos meios A e C. Os pontos representam médias ( $n=3$ ) e as barras de desvio representam o desvio padrão da triplicata.

#### 6.4. Avaliação de promoção do crescimento de plantas em casa de vegetação: uso de consórcios microbianos

As plantas foram observadas 14 dias após o plantio, e foi verificada uma aparente inibição do desenvolvimento inicial das plantas tratadas com o consórcio bacteriano crescido



no meio de cultivo C. Percebeu-se uma diferença de tamanho dos caules, tamanho médio das folhas e quantidade de plantas entre os vasos contendo as amostras com consórcio crescido no meio C, que se apresentaram menores, para o tamanho das plantas do controle e tratadas com o consórcio crescido no meio de cultivo A, que se apresentaram maiores. Análises estatísticas indicaram que média do comprimento foliar das amostras controle foi de 9,6cm, enquanto a média do comprimento foliar das amostras A e C foi de 9,4cm e 7,8cm, respectivamente, representando diferenças significativas entre o comprimento foliar das plantas inoculadas com o consórcio crescido no meio C quando comparado com o crescido no meio A e com o controle (Figuras 5 e 6).



**Figura 5** – Gráfico com médias do comprimento das folhas das plantas de feijão vermelho (n=27, 9 para cada tratamento) inoculadas com os diferentes tratamentos ( $p < 0,05$  entre a e b).



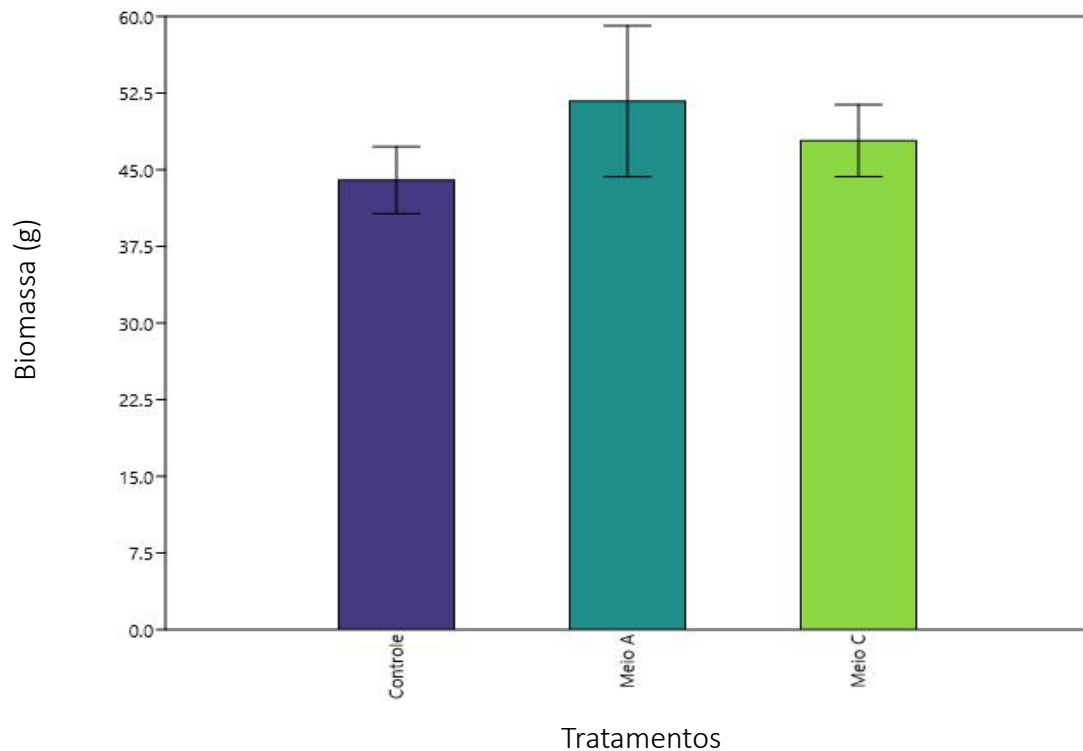
**Figura 6** – Plantas de feijão vermelho inoculadas com o consórcio de estirpes crescidas no Meio C, no Meio A e o tratamento controle, 14 dias após o plantio (n=27).

Após 28 dias em casa de vegetação, a colheita foi feita e mediu-se a biomassa úmida aérea das amostras. Verificou-se que as amostras tratadas com ambos os consórcios bacterianos apresentaram biomassa úmida com médias numericamente superiores do que as amostras do controle (média=43,9g/vaso) e, apesar de haver mais biomassa úmida nas plantas com o consórcio crescido no meio A (média=51,7g/vaso, 17,8% de incremento) do que no meio C (média=47,8g/vaso, 8,8% de incremento), apresentando valores numericamente maiores, a diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,57$ ) (Figuras 7 e 8).



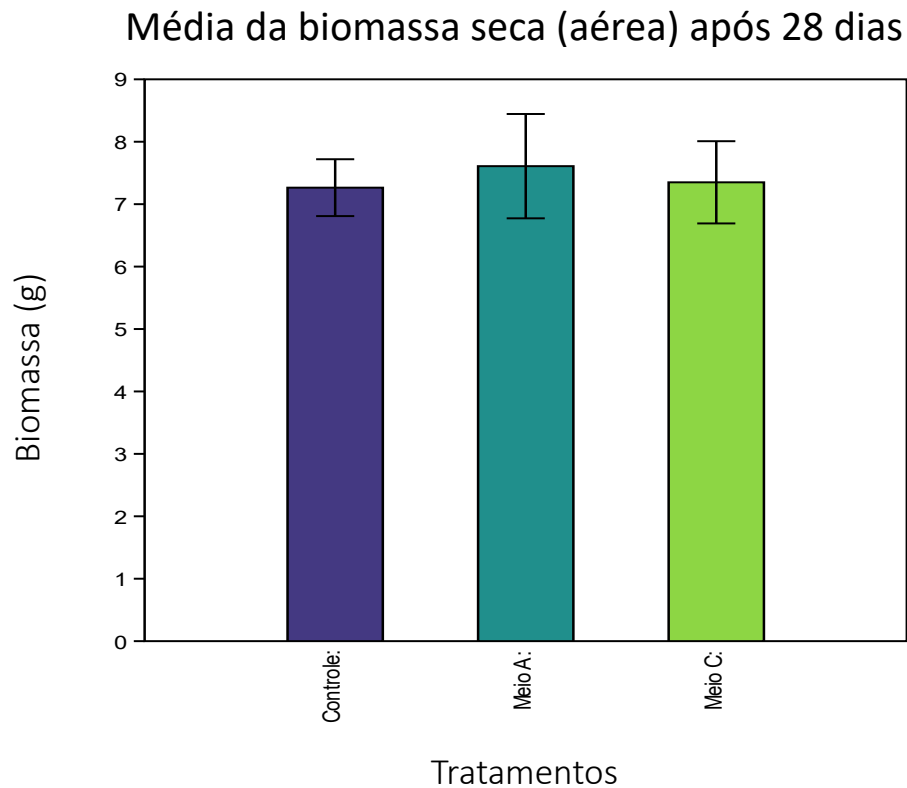
**Figura 7** – Plantas de feijão vermelho após 28 dias do plantio. Controle (esq.), meio A (centro), meio C (dir.); (n=27).

### Média da biomassa úmida (aérea) por vaso após 28 dias



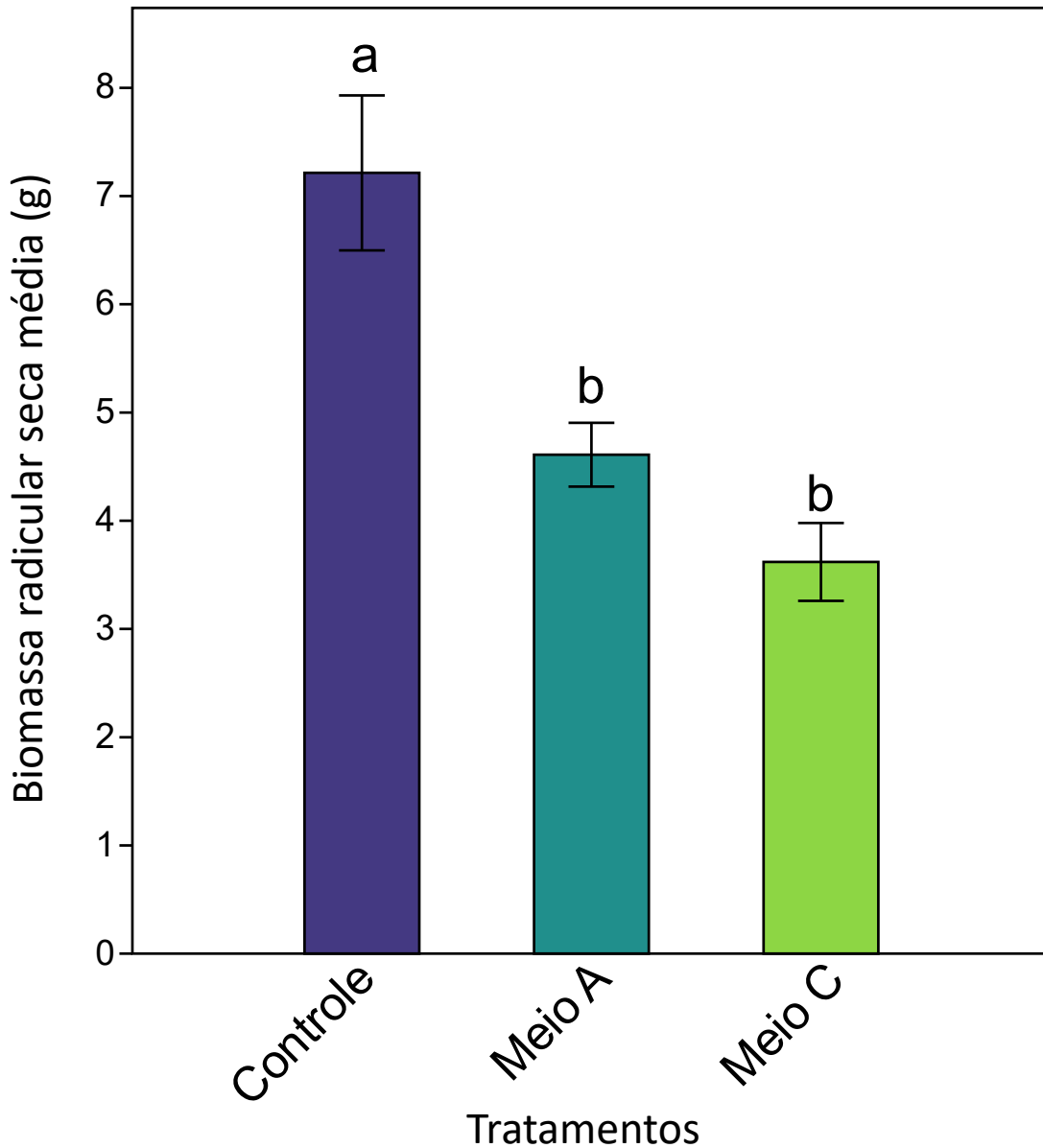
**Figura 8** – Dados da biomassa úmida aérea das amostras de feijão vermelho após 28 dias do plantio: controle e consórcio crescido nos meios A e C (n=27). As barras de erro indicam apenas uma tendência de maior crescimento nas plantas tratadas (p=0,57).

A biomassa seca da parte aérea das plantas apresentou uma tendência de menor diferenciação que a vista na biomassa úmida. As plantas controle (média=7,2g/vaso) tiveram basicamente o mesmo valor que as plantas crescidas no meio C (média=7,3g/vaso). Apenas as plantas tratadas com o consórcio bacteriano crescido no meio A apresentaram tendência maior de massa aérea seca (média=7,6g/vaso, incremento de 5,5%) (Figura 9). As diferenças nas médias não foram estatisticamente significativas, indicando apenas uma tendência (p=0,93).



**Figura 9** - Dados da biomassa seca aérea das amostras de feijão vermelho após 28 dias do plantio: controle e consórcio crescido nos meios A e C (n=27). As barras de erro indicam apenas uma tendência de maior crescimento nas plantas tratadas (p=0,93).

Já os dados para a biomassa seca das raízes das plantas de feijão vermelho, após 28 dias do plantio, demonstraram que a inoculação teve um efeito supressor na biomassa radicular. As plantas controle apresentaram média de 7,2g/vaso, enquanto as plantas tratadas com o consórcio bacteriano crescido no meio A apresentaram média de 4,6g/vaso (redução de 36%), as plantas tratadas com o consórcio bacteriano crescido no meio de cultivo C apresentaram média de 3,6g/vaso (redução de 50%) (Figura 10).

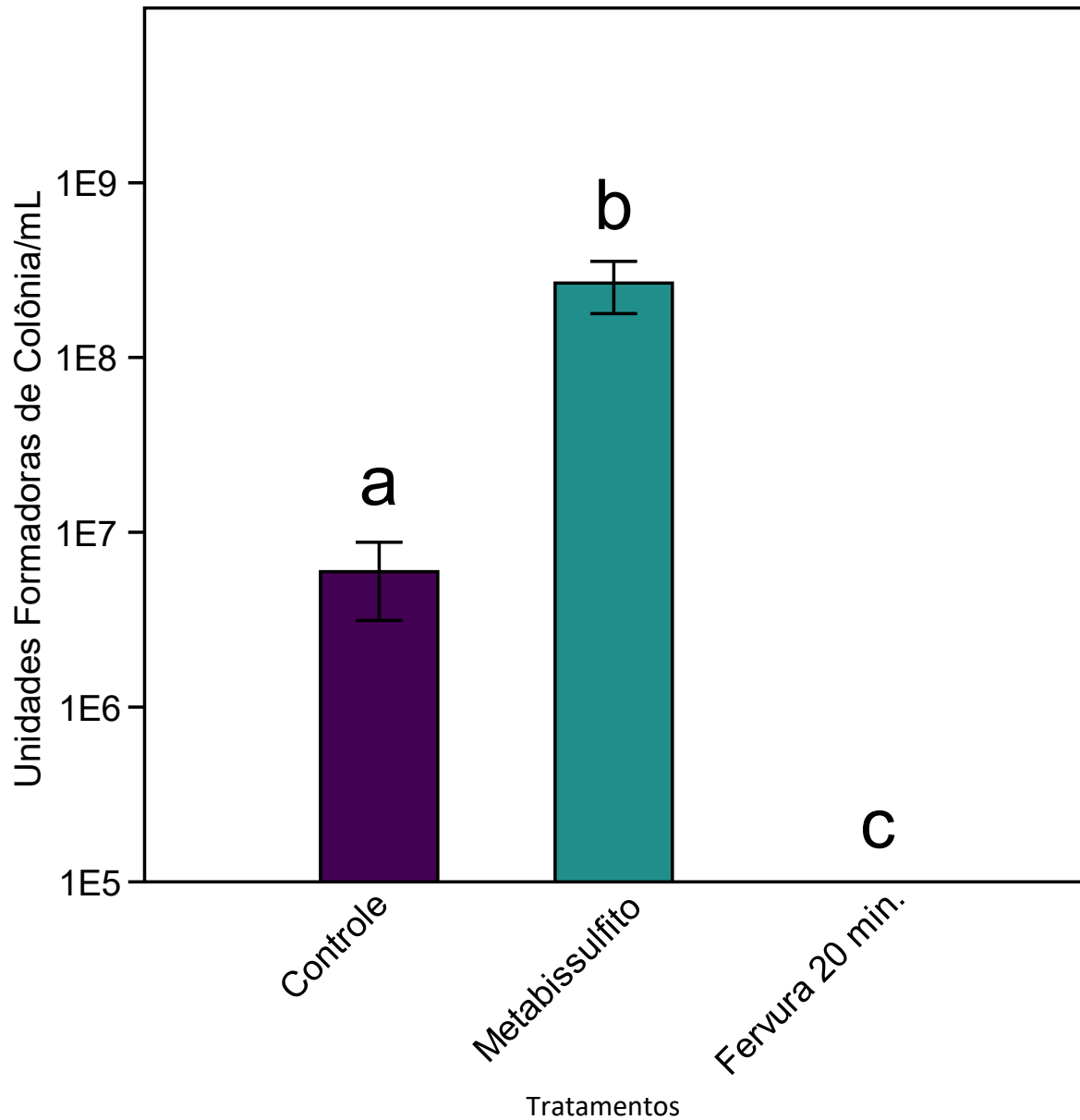


**Figura 10** - Dados da biomassa seca radicular das amostras de feijão vermelho após 28 dias do plantio: controle e consórcio crescido nos meios A e C (n=27). Letras iguais representam diferenças não significativas pelo teste de Tukey ( $p > 0.05$ ).

#### 6.5. Avaliação de diferentes técnicas de desinfecção para diminuir a contaminação com microrganismos exógenos

Após 72 horas, foi verificado crescimento bacteriano da ordem de  $10^6$  no controle, enquanto o meio tratado com metabissulfito de sódio apresentou crescimento bacteriano da

ordem de  $10^8$ . O meio que foi fervido por 20 minutos não apresentou crescimento bacteriano (Figura 11). Análises estatísticas demonstraram que as diferenças obtidas entre os diferentes tratamentos foram significativas ( $p=0,04$ ), com diferenças entre todos os tratamentos.



**Figura 11** – Contagem de unidades formadoras de colônias microbianas após teste de esterilidade com meio de cultivo A ( $n=3$ ). As barras de erro indicam diferença estatisticamente significativa entre a, b e c ( $p < 0,05$ ).

## 7. Discussão

Apesar do grande número de estudos sobre a multiplicação *on farm* de fungos micorrízicos (Douds et al., 2021; Douds, Nagahashi e Hepperly, 2010; Goetten, Moretto e Stürmer, 2016; Moreira et al., 2019), há poucos estudos sobre multiplicação *on farm* de inoculantes bacterianos. Além disso, as recentes leis promulgadas no Brasil em relação à multiplicação de inóculos *on farm* permitem que o presente estudo tenha aplicação prática que pode vir a auxiliar o pequeno e médio produtor rural (Brasil, 2009 e 2020). Desta forma, o presente estudo busca desenvolver meios de cultivo para inoculantes a partir de produtos facilmente encontrados no meio rural, principalmente em fazendas de gado leiteiro e produção de queijos, como a cana-de-açúcar, que é utilizada na alimentação animal (Embrapa, 1997) e o soro de leite, que é um subproduto da produção do queijo (Nassu, 2006).

Iniciou-se o trabalho pela avaliação do teor de açúcares redutores e de proteínas de ambos os substratos, para que pudessem ser formulados os meios de cultivo a serem testados, de forma a manter uma concentração de açúcar próxima a 6° BRIX, e níveis de proteínas variados. Scheidt et al. (2020) estudaram meios de cultura para o crescimento de espécie bacteriana promotora de crescimento vegetal, e encontraram boas taxas de crescimento em meios com cerca de 5,5°BRIX de açúcares. Após a formulação dos meios de cultivo líquidos, passou-se ao teste destes meios para o crescimento bacteriano.

Ao iniciar o processo de controle do crescimento das estirpes utilizadas, foi encontrada a primeira dificuldade: devido à turbidez dos meios de cultivo, não foi possível utilizar a medição da densidade óptica a 600nm para acompanhar o crescimento microbiano nas amostras. Estudos como o de Stevenson et al. (2016) indicam que as correlações feitas entre a  $DO_{600}$  e o número de unidades formadoras de colônia só se mostram verdadeiras em um conjunto limitado de condições, sendo a turbidez uma das principais barreiras encontradas, o que torna necessário o desenvolvimento de técnicas de calibragem para garantir estas correlações. No presente trabalho, ocorreu até o decréscimo de  $DO_{600}$  em relação ao meio puro, sem inóculo bacteriano (dados não mostrados), quando da medição em espectrofotômetro, mesmo quando o plaqueamento indicava número crescente de unidades formadoras de colônias. Desta forma, foi decidido que o crescimento bacteriano seria medido apenas pela contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro. Assim, para cada frasco e para cada ponto de tempo, foram realizadas sucessivas diluições e foi então possível obter dados estatisticamente confiáveis, devido ao número de réplicas do estudo.

Avaliando os dados do primeiro experimento de crescimento, chegou-se à conclusão de que o meio B, soro de leite 100%, seria excluído do estudo. Além de apresentar um odor muito forte, o que poderia tornar seu uso inviável como meio de cultivo para os inoculantes em fazendas, este meio de cultivo apresentou números menores de unidades formadoras de colônias nos tempos iniciais de cultivo, quando comparado com as outras composições. Os meios A e C, por conterem o caldo de cana-de-açúcar diluído, ainda apresentavam bastante material vegetal em suspensão. Isso pode ter contribuído para o crescimento das estirpes de PGPB, corroborando o estudo de Eevers et al. (2015), que demonstraram que meios de cultivo contendo tecido de planta triturado apresentam compostos que não estão presentes em meios de cultivo sintéticos, mas que são necessários para o crescimento de bactérias associadas a plantas, principalmente endofíticas.

O teor proteico dos diferentes meios estudados não pareceu afetar significativamente o crescimento bacteriano, não sendo, portanto, um fator limitante para o crescimento das estirpes utilizadas no presente estudo. Há diversos estudos que demonstram que o potencial promotor de crescimento de plantas por PGPB, principalmente no que tange a produção de fitormônios como o ácido indol-acético, que está ligado à presença de triptofano no meio de cultivo bacteriano (Barazani e Friedman, 2000; Idris et al., 2007). Desta forma, apesar dos resultados positivos nos experimentos de crescimento bacteriano, há necessidade de mais estudos para avaliação dos subprodutos formados nos sobrenadantes das culturas bacterianas. Seria possível, então, avaliar a presença ou não de auxinas pelas estirpes crescidas nos meios aqui estudados, permitindo melhor avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal das estirpes crescidas nos meios com as diferentes composições aqui testadas.

De fato, sabe-se que o meio de cultivo, por conta da sua composição, pode afetar não a produção microbiana de substâncias, mas também o crescimento de estirpes bacterianas. Até mesmo a sucessão ecológica de comunidades microbianas fluviais modelo pode ser afetada pelo uso de diferentes meios de cultivo, conforme nos demonstra o estudo de Goetghebuer et al. (2019).

Assim, ao avaliar os resultados do experimento de crescimento bacteriano, a ausência de crescimento da estirpe 1.2, que não apresentava crescimento nem no meio TSA nem nos meios líquidos estudados, pode-se inferir que, provavelmente, estes meios não apresentavam composição ideal para o crescimento desta estirpe. De fato, como apontado por Brudzynski e Sjaarda (2014), algumas substâncias naturais, como o mel de abelhas, têm efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano de algumas espécies bacterianas. O mesmo pode ser dito para a estirpe



21A em relação ao meio TSA, porém, seu visível crescimento nos meios estudados foram razão suficiente para mantê-la no presente estudo.

Assim, o segundo experimento de crescimento bacteriano foi realizado, pois foi tomada a decisão de obter mais amostras e, dessa forma, diminuir a probabilidade de chegar-se a conclusões equivocadas, pois o método científico preza pela validação de hipóteses através de repetições de experimentos (Flick, 2013). A estirpe F128 desta vez não apresentou crescimento nos meios de cultivo testados. Uma hipótese para esse fato é a dificuldade de crescimento que a estirpe costuma apresentar em laboratório: inicialmente, ela foi selecionada para fazer parte do estudo, pois apresenta coloração alaranjada, o que seria interessante para auxiliar no monitoramento do estudo. Porém, em condições de laboratório, esta estirpe frequentemente passa de condição cultivável para não-cultivável, necessitando de esforços redobrados para voltar a ser cultivada. .

As culturas bacterianas das estirpes que cresceram nos meios A e C foram, então, testadas em relação a seu potencial de promoção de crescimento vegetal, com plantio de sementes de feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris*), em casa de vegetação. O potencial destas estirpes para afetar positivamente o crescimento de plantas já havia sido testado pela equipe do LABEM, porém, não em feijoeiro. Da mesma forma, estas estirpes não haviam sido crescidas nos meios de cultivo aqui testados antes do presente estudo. Além disso, é sabido que algumas das substâncias promotoras de crescimento de plantas, principalmente os fitormônios, alguns deles compostos indólicos, podem ser induzidas pelo meio de cultivo, principalmente se este for rico em triptofano (Chaiharn e Lumyong, 2011).

Ao medir-se o comprimento foliar, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os diferentes tratamentos, sendo as plantas tratadas com o consórcio crescido no meio C detentoras de folhas menores. Essa inibição inicial do crescimento para este tratamento pode ter ocorrido por diversos fatores, como a alteração do pH do substrato, como aponta o estudo de Garau et al. (2012). Além disso, Fugeria e Stone (2004) indicam ser ideal, para plantio de feijoeiro, o pH em torno de 6,6. Outra possibilidade seria a produção de alguma substância bacteriana inibitória para o desenvolvimento inicial das plantas, como alguma enzima degradadora. Myo et al. (2019) apontam para a produção de enzimas secretadas por espécie de *Bacillus* que afetam a parede celular de células fúngicas, que também são eucariotos.

Após 28 dias do plantio, foi feita a colheita das plantas e verificou-se a biomassa dos diferentes tratamentos. A parte aérea das plantas não apresentou diferenças estatisticamente

significativas após a realização do teste ANOVA, mas sim uma tendência de maior produção de biomassa para ambos os tratamentos (A e C) em relação às plantas controle. Porém, significativa diferença foi verificada entre a biomassa radicular, sendo as raízes das plantas controle significativamente maiores do que as tratadas. Assim, pode-se inferir que, para um desenvolvimento aéreo similar, as plantas tratadas provavelmente precisaram de sistema radicular menos desenvolvido do que as plantas controle, indicando possível efeito das PGPB consorciadas no aumento da absorção de nutrientes das plantas tratadas. Conforme Olmo et al. (2016) apontam, o aumento da disponibilidade de nutrientes pode afetar a estrutura e arquitetura radicular, tanto de forma positiva (aumento do comprimento radicular) quanto negativa (diminuição do diâmetro e da massa radiculares). Nielsen, Amram e Lynch (2001) apontam para a baixa disponibilidade de fósforo como fator que estimula a alocação relativa de biomassa para as raízes em feijoeiros, o que levaria à maior aquisição deste nutriente, porém, às custas do crescimento de tecidos fotossintéticos, de forma que o carbono fixado é dirigido para tecidos heterotróficos da planta. Isto poderia exemplificar possível motivo de as plantas sem tratamento desenvolverem biomassa radicular significativamente maior do que as com tratamento.

A esterilização do meio de cultura a ser utilizado para produção *on farm* de inoculantes é um tema de suma importância. Há estudos, como o de Bocatti et al (2022), que verificou, com base em 18 amostras obtidas em cinco diferentes estados brasileiros, que 44% destas amostras de inoculantes continham espécies potencialmente prejudiciais a seres humanos, sendo que 34 das espécies bacterianas isoladas pertenciam a gêneros potencialmente patogênicos e, dentre estas, 6 possuíam resistência intrínseca a antibióticos, enquanto 18 destas eram resistentes a pelo menos um dos antibióticos testados. Para minimizar a possibilidade do crescimento de espécies indesejáveis e potencialmente prejudiciais, realizaram-se dois tratamentos de esterilização: fervura por 20 minutos e adição de metabissulfito de sódio, que, além de ser um estabilizante utilizado na indústria alimentícia, também pode ser utilizado no controle do crescimento de microrganismos indesejáveis (Góes et al, 2006). Porém, o meio controle, sem nenhum tratamento, apresentou crescimento microbiano menor do que o meio tratado com metabissulfito de sódio, o que leva à formulação da hipótese que o reagente trazia em si uma contaminação microbiana, que, ao ser adicionado ao meio rico em carboidratos (caldo de cana-de-açúcar), cresceu geometricamente, gerando o grande número de UFC/mL contadas. Já a fervura por 20 minutos demonstrou ser uma boa forma de eliminar os microrganismos presentes no caldo de cana-de-açúcar e na água utilizados para a formulação do meio de cultivo utilizado

neste experimento, pois não se verificou crescimento bacteriano a partir do meio A fervido, em várias diluições.

Após os experimentos e a pesquisa bibliográfica realizada, pode-se concluir que o meio mais adequado para o crescimento de estirpes de PGPB foi o meio A, rico em carboidratos e contendo apenas caldo de cana-de-açúcar diluído, o que foi possível graças aos experimentos de crescimento bacteriano e de plantio de feijoeiros em casa de vegetação, tratados com consórcios bacterianos crescidos no meio A. O método de esterilização mais simples possível em condições de campo, nas pequenas propriedades rurais é a fervura por 20 minutos. Há, todavia, necessidade de continuar com estudos de melhoria das condições de turbidez deste meio e obtenção da relação C:N do mesmo, além do estudo dos produtos bacterianos presentes nos sobrenadantes deste meio de cultivo, como compostos indólicos e outros fitormônios, de forma a melhor compreender os motivos da promoção do crescimento vegetal observada. Da mesma forma, pode ser testado o crescimento de outras estirpes bacterianas neste meio, principalmente as estirpes autóctones das propriedades modelo, parceiras do grupo que conduz este estudo no LABEM. Outras espécies de planta podem ser tratadas com estas estirpes, principalmente forrageiras, o principal alvo dos inoculantes deste estudo, realizado em fazendas de gado leiteiro.

## 8. Conclusões

Os substratos estudados (caldo de cana-de-açúcar e soro de leite) podem ser utilizados para crescimento bacteriano, pois foram capazes de gerar populações elevadas dos microrganismos estudados, em até 48h de fermentação. Além disso, o meio de cultivo elaborado pela simples diluição do caldo de cana-de-açúcar a 33% é o mais recomendado dentre as formulações testadas, por ser de simples preparo, apresentar crescimento rápido dos microrganismos, ter tido melhor desempenho no teste preliminar em casa de vegetação; e, ainda não apresentar odor forte após sua fermentação. Também foi verificado que, dentre os métodos testados, a fervura do substrato por 20 minutos se mostrou eficiente na eliminação dos microrganismos autóctones.

## 9. Referências Bibliográficas:

- Abeles, F. B., Morgan, P. W. e Saltveit Jr., M. E. (1992). Ethylene in Plant Biology. Academic Press, New York, NY, USA, 2<sup>nd</sup> edition.
- Abreu, M. P. e Lago, L. A. C. (2001). A economia brasileira no Império, 1822-1889. Texto para Discussão. Caderno de Economia. PUC- Rio. Disponível em: <  
<http://www.econ.pucrio.br/uploads/adm/trabalhos/files/td584.pdf>> Acesso em: 24 setembro 2021.
- Alves, E., Santana, C. A. M. e Contini, E. (2016). Extensão rural – seu problema não é a comunicação. In: Vieira Filho, J. E. R.; Gasques, J. G. (Org.). Agricultura, transformação produtiva e sustentabilidade. Brasília, DF: Ipea.
- Alves, E. e Souza, G. S. (2015). O semiárido segundo o censo agropecuário 2006 e os censos de população 1991, 2000 e 2010. Revista de Política Agrícola, ano 24, n. 1: 74-85.
- Arieira, J. O. e Fusco, J. P. A. (2010). Cadeia Produtiva do Agronegócio: Uma Caracterização dos Agentes Atuantes na Região Noroeste do Paraná sob o Enfoque das Redes Simultâneas. XXX Encontro Nacional de Engenharia de Produção. Maturidade e desafios da Engenharia de Produção: competitividade das empresas, condições de trabalho, meio ambiente. São Carlos, SP, Brasil.
- Backer, R., Rokem, J., S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. e Smith D. L. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. Front. Plant Sci. 9, 1473.
- Baccocina, D. (2017). O dilema dos orgânicos. Plant Project, 05: 28-35.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L.G., Gilroy, S. e Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol., 57:233-66.
- Bakker, M. G., Manter, D. K., Sheflin, A. M., Weir, T. L., and Vivanco, J. M. (2012). Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. Plant Soil 360, 1–13.
- Balestrini, R., Brunetti, C., Cammareri, M., Caretto, S., Cavallaro, V., Cominelli, E., De Palma, M., Docimo, T., Giovinazzo, G. e Grandillo, S. (2021) Strategies to Modulate Specialized Metabolism in Mediterranean Crops: From Molecular Aspects to Field. Int. J. Mol. Sci., 22, 2887.
- Barazani, O., e Friedman, J. (2000) Effect of exogenously applied L-tryptophan on allelochemical activity of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Journal of Chemical Ecology, Vol. 26, No. 2.
- Barret, M., Morrissey, J. P. e O' Gara, F. (2011). Functional genomic analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. Biology and Fertility of Soils, 47: 729–743.
- Barros Góes, L. M. N., Paula Mendes, P., Shinozaki Mendes, E., Freitas Ribeiro, C. M. e Pinheiro e Silva, R. P. (2006) Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Acta Scientiarum. Biological Sciences, vol. 28, núm. 2,153-157.
- Beattie, G. A. (2015). Microbiomes: curating communities from plants. Nature 528, 340–341.
- Bell, T. H., Kaminsky, L. M., Gugino, B. K., Carlson, J. E., Malik, R. J., Hockett, K. L. e Trexler, R. V. (2019) Factoring Ecological, Societal, and Economic Considerations into Inoculant Development. Trends in Biotechnology, Vol. 37, No. 6, 572-573.
- Bello, Liliane (2021). Câmara dos Deputados escuta entidades e produtores ligados à agricultura familiar e orgânica. Embrapa Agrobiologia, Notícias, 21/09/2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/65037209/camara-dos-deputados-escuta-entidades-e-produtores-ligados-a-agricultura-familiar-e-organica>. Acesso em: 23 setembro 2021.
- Berg, G. e Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology, 68: 1–13.
- Bocatti, C.R., Ferreira, E., Ribeiro, R.A. (2022) Microbiological quality analysis of inoculants based on *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* produced “on farm” reveals high contamination with non-target microorganisms. Braz J Microbiol.
- Bolan, N., Adriano, D. e Mahimairaja, R. (2015). Distribution and bioavailability of trace elements in livestock and poultry manure by-products. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 34: 291–338.

- Brudzynski, K. e Sjaarda, C. (2014) Antibacterial Compounds of Canadian Honeys Target Bacterial Cell Wall Inducing Phenotype Changes, Growth Inhibition and Cell Lysis That Resemble Action of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. PLOS ONE 9(9): e106967.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* May 7;72:248-54.
- BRASIL (2007). Decreto de regulamentação da produção orgânica. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2007/Decreto/D6323.htm)>. Acesso em: 11 agosto 2021.
- BRASIL (2008). Decreto nº 6.476, de 5 de junho de 2008. Promulga o Tratado Internacional sobre Recursos Fitogenéticos para a Alimentação e a Agricultura, aprovado em Roma, em 3 de novembro de 2001, e assinado pelo Brasil em 10 de junho de 2002. Diário Oficial da União, 6 jun 2008. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/decreto/d6476.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/decreto/d6476.htm) Acesso em: 06 setembro 2021.
- BRASIL (2009). Decreto nº 6.913, de 23 de julho de 2009. Acresce dispositivos ao Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial da União, 24 jul 2009. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6913.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6913.htm)>. Acesso em: 06 setembro 2021.
- BRASIL (2003). Lei federal da produção e comercialização dos orgânicos. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/L10.831.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm)>. Acesso em: 11 agosto 2021.
- BRASIL (2012). Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Diário Oficial da União, 28 mai 2012. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm)>. Acesso em: 06 setembro 2021.
- BRASIL (2020). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Bioinsumos é lançado e vai impulsionar uso de recursos biológicos na agropecuária. Disponível em : <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/programa-nacional-de-bioinsumos-e-lancado-e-vai-impulsionar-uso-de-recursos-biologicos-na-agropecuaria-brasileira>>. Acesso em: 15 setembro 2021.
- BRASIL (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regularização da produção orgânica. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/regularizacao-da-producao-organica>>. Acesso em: 11 agosto 2021.
- Burd, G. I., Dixon, D. G. e Glick, B. R. (2000). Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, n. 3: 237-245.
- Cardoso, E. J. B. N. e Andreotti, F. D. (2016). *Microbiologia do solo*. 2 ed. Piracicaba: ESALQ.
- Carneiro, F. F., Pignati, W. e Rigotto, R. M. (2012). Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1. Agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde. Rio de Janeiro: Abrasco.
- Chaiarn, M. e Lumyong, S. (2011) Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. *Curr Microbiol* 62:173–18.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K. e Vivanco, J. M. (2012) Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biol Fertil Soils* 48:489–499.
- Cornell Law School. 7 U.S. Code § 3103 - definitions. Disponível em: <<https://www.law.cornell.edu/uscode/text/7/3103>>. Acesso em: 04 de agosto de 2021.
- Dias, G. e Schwengber, I. (2018). *Agropecuária Catarinense*, Florianópolis, v.31, n.1, jan./abr. 2018. Disponível em: < <https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/RAC/issue/view/9/56>>. Acesso em: 23 setembro 2021.
- Douds, D. D., Nagahashi, G., Hepperly, P. R. (2010) On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. *Bioresource Technology* 101, 2326–2330.

- Douds, D. D., Wilson, D. O., Seidel, R., Ziegler-Ulsh, C. (2016) A method to minimize the time needed for formation of mycorrhizas in sweet corn seedlings for outplanting using AM fungus inoculum produced on-farm. *Scientia Horticulturae* 203, 62–68.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. e Smith, F. (1951) A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*. Jul 28;168(4265):167.
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J. C., Vangronsveld, J. e Weyens, N. (2015). Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media. *Microbial Biotechnology* 8(4), 707–715.
- Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., AbdAllah, E. F. e Hashem, A. (2017). Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Front. Microbiol.* Vol. 8, 2104.
- Embrapa (1997) Utilização da cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. Gado de corte divulga, Campo Grande, MS, nº 23. Disponível em: <https://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/divulga/GCD23.html>. Acesso em 03 fevereiro 2022.
- Embrapa (2018). Visão 2030 : o futuro da agricultura brasileira. Brasília, DF: Embrapa.
- Esalq/USP e CNA (2015). Relatório Custos da Produção Agrícola, Safra 2015/16. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/upload/revista/pdf/0002109001468869744.pdf>. Acesso em: 10 setembro 2021.
- Estados Unidos da América (2021). Department of Agriculture. Local food directories: national farmers market directory. Disponível em: <<https://www.ams.usda.gov/local-food-directories/farmersmarkets>>. Acesso em: 04 de agosto de 2021.
- Etesami, H. e Maheshwari, D. K. (2018). Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156, 225–246.
- Fageria, N. K. e Stone, L. F. Produtividade de feijão no sistema plantio direto com aplicação de calcário e zinco. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.39, n.1, p.73-78, jan. 2004.
- FAO (2009). International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. (Tirfaa).
- FAO (2017). FAOSTAT: land use. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RL>>. Acesso em: 6 setembro 2021.
- FAO; ITPS (2015). Status of soil world's resources. Rome: Intergovernmental Technical Panel on Soils (ITPS). Main Report.
- Ferreira, A. L. (2017). Inoculante feito na propriedade rural aumenta produtividade de feijão-caupi em até 33%. *Embrapa Notícias*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/26033659/inoculante-feito-na-propriedade-rural-aumenta-produtividade-de-feijao-caupi-em-ate-33>. Acesso em: 15 setembro 2021.
- Fierer, N., Breitbart, M., Nulton, J., Salamon, P., Lozupone, C., Jones, R., Robeson, M., Edwards, R. A., Felts, B., Rayhawk, S., Knight, R., Rohwer, F. e Jackson, R. B. (2007). Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 73: 7059-7066.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol* 15, 579–590.
- Flick, U. Introdução à metodologia de pesquisa: um guia para iniciantes. Porto Alegre: Penso, 2013.
- Fliessbach A., Winkler M., Lutz M. P., Oberholzer H. R. e Mader P. (2009) Soil amendment with *Pseudomonas fluorescens* CHA0: lasting effects on soil biological properties in soils low in microbial biomass and activity. *Microb Ecol* 57: 611–623.
- Gaj, T., Gersbach, C.A. e Barbas, C.F., (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, 31, 397–405.
- Garau, G., Castaldi, P., Deiana, S., Campus, P., Mazza, A., Deiana, P. e Pais, A. (2012) Assessment of the use potential of edible sea urchins (*Paracentrotus lividus*) processing waste within the agricultural system: Influence on soil chemical and biological properties and bean (*Phaseolus vulgaris*) and wheat (*Triticum vulgare*) growth in an amended acidic soil. *Journal of Environmental Management*, Volume 109, Pages 12-18.

- Glick B. R., Patten C. L., Holguin G. e Penrose D. M. (1999). Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK.
- Glick, B.R. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv. Appl. Microbiol.* 56, 291–312.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*. Vol. 2012. Article ID 963401.
- Glick, B.R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–39.
- Barros Góes, L. M. N., Paula Mendes, P., Shinozaki Mendes, E., Freitas Ribeiro, C. M., Pimentel Pinheiro e Silva, R. (2006) Uso do metabissulfito de sódio no controle de microorganismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, vol. 28, núm. 2, pp. 153-157.
- Goetghebuer, L., Bonal, M., Faust, K., Servais, P. e George, I. F. (2019) The Dynamic of a River Model Bacterial Community in Two Different Media Reveals a Divergent Succession and an Enhanced Growth of Most Strains Compared to Monocultures. *Microbial Ecology*, 78:313–323.
- Goetten, L. C., Moretto, G. e Stürmer, S. L. (2016) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi inoculum produced on-farm and phosphorus on growth and nutrition of native woody plant species from Brazil. *Acta Botanica Brasilica* - 30(1): 9-16.
- Goswami, M. e Deka, S. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria|alleviators of abiotic stresses in soil: A review. *Pedosphere* 30, 40–61.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. e Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4.
- Hassan, M. McInroy, J. A. e Klopper, J. W. (2019). The Interactions of Rhizodeposits with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Rhizosphere: A Review. *Agriculture* 2019, 9, 142.
- Hider R. C. e Kong X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27, n. 5: 637–657.
- Idris, E.E., Iglesias, D.J., Talon, M., e Borriss, R. (2007) Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 619–626.
- Innerebner G., Knief C. e Vorholt J. A. (2011). Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, n. 10: 3202-3210.
- Keliikuli, A., Smith, K., Li, Y e Lee, C. N. (2019). Natural Farming: The Development of Indigenous Microorganisms Using Korean Natural Farming Methods. University of Honolulu, CTAHR. Sustainable Agriculture - 19.
- Khan M. S., Zaidi A. e Wani P. A. (2007). Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27, n. 1: 29-43.
- Khatounian, C. A. (2001). A reconstrução ecológica da agricultura. *Agroecológica, Botucatu*.
- Kim Y. C., Jung H., Kim K. Y. e Park S. K. (2008). An effective biocontrol bioformulation against *Phytophthora* blight of pepper using growth mixtures of combined chitinolytic bacteria under different field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 120, n. 4: 373-382.
- Konopka, A. (2009). What is microbial community ecology? *The ISME Journal* 3, 1223–1230.
- Lima, S. K., Galiza, M., Valadares, A. e Alves, F. (2020). TD 2538 – Produção e Consumo de produtos Orgânicos no Mundo e no Brasil. IPEA. Fev/2020.
- Lopes, M. A. (2013). Apresentação. In: Alves, E. R. A.; Souza, G. S. e Gomes, E. G. (Ed.). *Contribuição da Embrapa para o desenvolvimento da agricultura no Brasil*. Brasília, DF: Embrapa.
- Lopes, M. A. (2017). Escolhas estratégicas para o agronegócio brasileiro. *Revista de Política Agrícola*, ano 26, n. 1: 151-154.



- Ma J. F. (2005). Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24, n. 4: 267-281.
- Macik, M., Gryta, A. e Frac, M. (2020). Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. *Advances in Agronomy*, Volume 162.
- Marquette, L. e Castaman, A. (2016). Diferentes fontes de fertilizantes utilizadas na cultura do milho. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 10, n. 10, p. 10-20.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428.
- Moreira, B. C., Prates Junior, P., Jordão, T. C., Soares da Silva, M. C., Ribeiro, A. P. F., Stürmer, S. L., Salomão, L. C. C., Otoni, W. C. e Kasuya, M. C. M. (2019) Effect of Inoculation of Pineapple Plantlets with Arbuscular Mycorrhizal Fungi Obtained from Different Inoculum Sources Multiplied by the On-Farm Method. *Rev Bras Cienc Solo* 43:e0180148.
- Morgan, P. W. e Drew M. C. (1997). Ethylene and plant responses to stress. *Physiologia Plantarum*, 100, n. 3: 620-630.
- Myo, E. M., Liu, B., Ma J., Shi L., Jiang M., Zhang K. e Ge, B. (2019) Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion **Biological Control** Volume 134, July 2019, Pages 23-31.
- Naeem S, Kawabata Z, Loreau M. (1998). Transcending boundaries in biodiversity research. *Trends Ecol Evol* 13: 134–135.
- Nielsen, K. L., Eshel, A., Lynch, J. P. (2001) The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Journal of Experimental Botany*, Volume 52, Issue 355, pages 329–339.
- Nassu, R. T., Macedo, B. A. e Lima, M. H. P. (2006) Queijo de Coalho. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica.
- Olmo, M., Villar, R., Salazar, P. e Alburquerque, J. A. (2016) Changes in soil nutrient availability explain biochar's impact on wheat root development. *Plant and Soil*. Vol. 399, Issue 1-2.
- Phillippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P. e van der Putten, W.H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 11, 789-799.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., van der Ent S. e van Wees S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5, n. 5: 308-316.
- Queiroga, V. P. (2018). Amendoim orgânico: Tecnologia de produção para o Nordeste brasileiro. Org.: Queiroga, V. P., Almeida, F. A. C., Girão, E., G., Figueiredo Neto, A., e Albuquerque, E., M., B. Fortaleza: AREPB.
- Rachid, C. T. C. C., Balieiro, F. C., Fonseca, E. S., Peixoto, R. S., Chaer, G. M., Tiedje, J. M., e Rosado, A. S. (2015). Intercropped Silviculture Systems, a Key to Achieving Soil Fungal Community Management in Eucalyptus Plantations. *PLoS ONE* 10(2): e0118515.
- Research Institute of Organic Agriculture (2020). The world of organic agriculture 2020. Willer. Disponível em: <<https://www.fibl.org/en/shop-en/5011-organic-world-2020.html>>. Acesso em: 04 agosto 2021.
- Resende, T. e Pupo, F. (2020). Brasil tem importação recorde de agrotóxicos no primeiro ano de Bolsonaro. Folha de São Paulo, São Pulo, 01 de março de 2020. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2020/03/brasil-tem-importacao-recorde-de-agrotoxicos-no-primeiro-ano-de-bolsonaro.shtml>>. Acesso em 10 setembro 2021,
- Ribeiro, J. M. e Bastos, D. C. (2008). Biorreatores: aspectos gerais e sua utilização para cultura de tecidos vegetais. Petrolina: Embrapa Semi-Árido.
- Rodrigues, W. O. P., Garcia, R. G., Nããs, I. A., Rosa, C. O. e Caldarelli, C. E. (2014). Evolução da avicultura de corte no Brasil. *Enciclopédia Biosfera*, 10, n. 18: 1666-1684.
- Sandegren, L. (2014). Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups. J. Med. Sci.*, 119: 103–107.

- Santos, M. S., Nogueira, M. A. e Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9: 205.
- Sartori, J (2020). Bioinsumos podem ser aliados da produtividade em culturas orgânicas e convencionais. Mapa. Reportagem especial, 20/08/2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/bioinsumos-podem-ser-aliados-da-produtividade-em-culturas-organicas-e-convencionais>>. Acesso em: 23 setembro 2021.
- Scheidt, W., Pedroza, I. C. P. S., Fontana J., Meleiro, L. A. C., Soares, L. H. B. e Reis, V. M. (2020) Optimization of culture medium and growth conditions of the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* BR11417 for its use as an agricultural inoculant using response surface methodology (RSM). *Plant Soil*. 451:75–87.
- Schneider, A. D., Fagundes, P. M. e Talamini, E. (2017). O perfil do futuro empreendedor rural e fatores de influência na busca de qualificação. *Revista Livre de sustentabilidade e Empreendedorismo*, 2: 42-65.
- Slow Food (2021). Preserve biodiversity. Disponível em: <<https://www.slowfood.com/what-we-do/preserve-biodiversity/>>. Acesso em: 14 agosto 2021.
- Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S. e Pilzota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers *Scientific Reports* 6:38828.
- Toledo, M. (2021). Dólar alto e demanda fazem agrotóxicos ilegais avançarem no Brasil. *Folha de São Paulo*, São Paulo, 09/01/2021. Disponível em: [https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2021/01/dolar-alto-e-demanda-fazem-agrotoxicos-ilegais-avancarem-no-brasil.shtml?\\_ga=2.168364385.1507410471.1631310582-160486388.1631310582&\\_mather=73059c17cecc34a0&origin=folha](https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2021/01/dolar-alto-e-demanda-fazem-agrotoxicos-ilegais-avancarem-no-brasil.shtml?_ga=2.168364385.1507410471.1631310582-160486388.1631310582&_mather=73059c17cecc34a0&origin=folha). Acesso em 10 setembro 2021.
- US-EPA (United States – Environmental Protection Agency) (2021). Sources of Greenhouse Gas Emissions. Disponível em: <https://www.epa.gov/ghgemissions/sources-greenhouse-gas-emissions>. Acesso em 10 setembro 2021.
- Vilela, G. F., Mangabeira, J. A. C., Magalhães, L. A. e Tôsto, S. G. (2019). Agricultura orgânica no Brasil: um estudo sobre o Cadastro Nacional de Produtores Orgânicos. Embrapa Territorial. Campinas.
- Zak, D.R., Holmes, W. E., White, D. C., Peacock, A. D. e Tilman, D. (2003). Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? *Ecology*, 84, n. 8: 2042-2050.
- Zhang, C., Wang, M.-Y., Khan, N., Tan, L.-L. e Yang, S. (2021) Potentials, Utilization, and Bioengineering of Plant Growth-Promoting *Methylobacterium* for Sustainable Agriculture. *Sustainability*, 13, 3941.