# Manual de Análises Microbiológicas

## - OnFarm -


**AUTORES**

Bruno Wesley Ferreira, Luiz Guilherme Silva,
Gabriela da Silva Rolim, André Luis Silva,
Daniele Cristina Fontana, Natalia Coriolano,
Patrícia Diosti, Rafael Guedes,
Janaína Brandão Seibert, Rafael Garcia





AGRO BIOLÓGICA
SUSTENTABILIDADE

# Manual de Análises Microbiológicas OnFarm

AGRO BIOLÓGICA
SUSTENTABILIDADE

## *AGRADECIMENTO*

Agradecemos a Agrobiológica pelo financiamento do livro.

**Autores**

Bruno Wesley Ferreira, Luiz Guilherme Silva,
Gabriela da Silva Rolim, André Luis Silva,
Daniele Cristina Fontana, Natalia Coriolano,
Patrícia Diosti, Rafael Guedes,
Janaína Brandão Seibert, Rafael Garcia

# Manual de Análises Microbiológicas OnFarm

• 2026 •

**SOBRE A AGROBIOLÓGICA**

A Agrobiológica Sustentabilidade foi fundada em 2006 por Engenheiros Agrônomos, com o objetivo de atender a agricultura convencional com produtos sustentáveis e mais eficientes. Atualmente, a empresa possui uma plataforma completa de soluções biológicas para manejo de pragas e doenças de importância agronômica, tanto de produtos formulados como para multiplicação profissional OnFarm.

A Agrobiológica Sustentabilidade tem orgulho em ser pioneira na tecnologia de multiplicação OnFarm.

**ONFARM SERVICE®**

O OnFarm Service® da Agrobiológica Sustentabilidade é um programa de Assistência Técnica de alto padrão para atender com excelência clientes e parceiros OnFarm de forma customizada.

O programa OnFarm Service® visa:

- Viabilizar o melhor projeto OnFarm para cada perfil de produção agrícola;
- Promover um manejo fitossanitário mais equilibrado e sustentável;
- Otimizar a produtividade e lucratividade das propriedades rurais;
- Levar conhecimento, informações técnicas e inovação sobre o uso dos biológicos na agricultura.

1ª edição – março / 2026

APOIO EDITORIAL | Sonia Piacentini
CAPA E DIAGRAMAÇÃO | João Victor C. de Oliveira
COORDENAÇÃO DE PRODUÇÃO EDITORIAL | Gabriela P. S. Lopes Scatamburlo
REVISÃO E FORMATAÇÃO | Amanda Gazito, Aline Spinassi, Bruno Arroyo

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**
**(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Manual de análises microbiológicas : on farm. -- Piracicaba, SP : Agrobiologica Sustentabilidade, 2026.

Vários autores.
Bibliografia.
ISBN 978-65-977141-0-0

1. Diagnóstico de laboratório - Manuais, guias, etc. 2. Microbiologia - Estudo e ensino 3. Microorganismo.

26-385747.0 CDD-579

**Índices para catálogo sistemático:**

1. Microbiologia 579

Aline Graziele Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

# Sumário

**Capítulo 1 - Laboratório microbiológico, equipamentos e insumos**.....15
Equipamentos.....16
Insumos.....20
Referências.....24

**Capítulo 2 - Meios de cultura, composição e modo de preparo**.....25
Formulação e método de preparo.....27
Pós formulados e prontos para uso (TSA, BDA, HiCrome, YMA, King B.).....27
Formulações específicas.....28
Ágar Manitol com Extrato de Levedura e Vermelho Congo *(YMA – Yeast Mannitol Agar with Congo Red)*.....*28*
Ágar King B (KB).....29
Modo de preparo do meio KB.....29
NFB *(Nitrogen Free Bromothymol Blue)*.....31
Rojo Congo (RC).....34
Referências.....35

**Capítulo 3 - Identificação de microrganismos** ..... 37
Fungos ..... 38
Diferenciação baseada em características culturais e morfológicas ..... 38
*Beauveria bassiana* ..... 38
*Metarhizium anisopliae* ..... 39
*Cordyceps fumosorosea (Isaria fumosorosea)* ..... 40
*Purpureocillium lilacinum (Paecilomyces lilacinus)* ..... 41
*Trichoderma asperellum* ..... 42
Bactérias ..... 44
Diferenciação baseada em morfologia de colônias ..... 44
*Bacillus amyloliquefaciens* ..... 44
*Bacillus velezensis* ..... 46
*Bacillus subtilis* ..... 48
*Bacillus licheniformis* ..... 50
*Bacillus pumilus* ..... 52
*Bacillus thuringiensis* ..... 54
*Priestia megaterium* ..... 56
*Priestia aryabhattai* ..... 58
*Pseudomonas fluorescens* ..... 60
*Pseudomonas palleroniana* ..... 62
*Azospirillum brasilense* ..... 64
*Bradyrhizobium japonicum* ..... 66
*Chromobacterium subtsugae* ..... 67
*Considerações finais* ..... 68
Diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por coloração de gram ..... 69
Procedimento ..... 69
Identificação molecular de fungos e bactérias ..... 72
Referências ..... 74

**Capítulo 4 - Quantificação de microrganismos** ..... 75
4.1. Unidade formadora de colônias (ufc) ..... 75
Etapa 1: *Diluição seriada* ..... 76
Etapa 2: *Plaqueamento via Método de espalhamento* ..... 77
Etapa 3: *Tempo de incubação* ..... 79
Etapa 4: *Contagem das Colônias* ..... 81
Cálculo da Concentração em UFC/mL ..... 81
4.1.1. Quantificação de esporos bacterianos ..... 82
Etapa 1: *Aquecimento da amostra* ..... 82
Etapa 2: *Resfriamento rápido* ..... 83
Etapa 3: *Diluição seriada e plaqueamento* ..... 83
Etapa 4: *Incubação e contagem* ..... 83
4.2. Câmara de Neubauer ..... 83
Etapa 1: *Diluição seriada* ..... 84
Câmara de Neubauer ..... 84
Etapa 2: *Preparação da Câmara de Neubauer* ..... 84
Etapa 3: *Adição da amostra na Câmara de Neubauer* ..... 84
Etapa 4: *Microscópio* ..... 84
Etapa 5: *Cálculo dos Resultados* ..... 86
Referências ..... 87

**Considerações Finais** ..... 89

# Glossário

## *Termos técnicos de microbiologia aplicados à produção OnFarm*

A ..... 91
B ..... 92
C ..... 93
D ..... 96
E ..... 96
F ..... 97
G ..... 97
H ..... 98
I ..... 98
L ..... 99
M ..... 99
N ..... 101
O ..... 101
P ..... 101
R ..... 102
S ..... 103
T ..... 104
U ..... 104
V ..... 104

### *Ilustrações*

Ilustração 1 — Formatos de esporos e células ..... 93
Ilustração 2 — Estruturas fúngicas ..... 95
Ilustração 3 — Hifa septada vs asseptada ..... 99
Ilustração 4 — Ramificação simples vs verticilada ..... 100
Ilustração 5 — Conídios em cadeia vs em massa ..... 102

# Sumário figuras

**Figura 1.** Aspecto de colônias do fungo ***Beauveria bassiana*** em meio BDA. ..... 38

**Figura 2.** Detalhe do fungo ***B. bassiana*** em microscopia ..... 39

**Figura 3.** Aspecto de colônias do fungo ***Metarhizium anisopliae*** em meio BDA ..... 39

**Figura 4.** Detalhe do fungo ***M. anisopliae*** em microscopia..... 40

**Figura 5.** Aspecto de colônias do fungo ***Cordyceps fumosorosea*** em meio BDA ..... 40

**Figura 6.** Detalhe do fungo ***C. fumosorosea*** em microscopia ..... 41

**Figura 7.** Aspecto de colônias do fungo ***Paecilomyces lilacinus*** em meio BDA ..... 41

**Figura 8.** Detalhe do fungo ***P. lilacinus*** em microscopia ..... 42

**Figura 9.** Aspecto de colônias do fungo ***Trichoderma asperellum*** em meio BDA ..... 43

**Figura 10.** Detalhe do fungo ***T. asperellum*** em microscopia..... 43

**Figura 11.** Aspecto das colônias da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (ASN61) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ..... 45

**Figura 12.** Aspecto das colônias de *Bacillus velezensis* (ASN09) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ..... 47

**Figura 13.** Aspecto das colônias de *Bacillus subtilis* (ASN44) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação..... 49

**Figura 14.** Aspecto das colônias de *Bacillus licheniformis* (ASN12) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação..... 51

**Figura 15.** Aspecto das colônias de *Bacillus pumilus* (ASN13) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ..... 53

**Figura 16.** Aspecto das colônias de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (ASN133) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação..... 55

**Figura 17.** Aspecto das colônias de *Priestia megaterium* cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ..... 57

**Figura 18.** Aspecto das colônias de *Priestia aryabhattai* (ASN10) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ..... 59

**Figura 19.** Aspecto das colônias de *Pseudomonas fluorescens* (ASN15) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ... 61

**Figura 20.** Aspecto das colônias de *Pseudomonas palleroniana* (ASN02) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. ... 63

**Figura 21.** Aspecto das colônias de *Azospirillum brasilense* (ASN11) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação..... 65

**Figura 22.** Aspecto das colônias de *Bradyrhizobium japonicum* (ASN21) cultivadas em meio YMA em diferentes tempos de incubação..... 66

**Figura 23.** Aspecto das colônias de *Chromobacterium subtsugae* (ASN04) cultivadas em diferentes tempos de incubação em meio TSA. ..... 68

**Figura 24.** Etapas para preparação de esfregaço bacteriano ..... 70

**Figura 25.** Esquema Coloração de Gram..... 71

**Figura 26.** Esquema do processo de diluição seriada e plaqueamento. ..77

**Figura 27.** Divisão da câmara de Neubauer ..... 85

**Figura 28.** Contagem de células em câmara de Neubauer ..... 85

# Sumário tabelas

**Tabela 1.** Descrição e funções de equipamentos essenciais em laboratório microbiológico ..... 19

**Tabela 2.** Descrição e funções de insumos essenciais em laboratório microbiológico..... 23

**Tabela 3:** Composição do Meio YMA – *Yeast Mannitol Agar with Congo Red.* ..... *28*

**Tabela 4:** Ingredientes do Meio KB ..... 29

**Tabela 5:** Composição da solução base do meio NFB ..... 31

**Tabela 6:** Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio NFB ..... 32

**Tabela 7:** Composição da solução vitamínica utilizada no meio NFB ....32

**Tabela 8:** Composição da solução de Azul de Bromotimol (0,5%).... 32

**Tabela 9:** Composição da solução de Fe-EDTA 1,64% ..... 33

**Tabela 10:** Composição do meio Rojo Congo (RC)..... 34

**Tabela 11.** Microrganismos, meios de cultivo, tempo de incubação e temperatura. ..... 79

**Tabela 12.** Microrganismos, meios de cultivo, tempo de incubação e temperatura. ..... 80

# Introdução

A crescente adoção de bioinsumos na agricultura tem impulsionado a produção OnFarm — ou seja, a multiplicação de microrganismos diretamente na propriedade rural — como uma alternativa acessível e sustentável para o manejo integrado de pragas e doenças. Esse modelo democratiza o acesso de produtores ao controle biológico, ao mesmo tempo em que permite maior autonomia no uso de agentes microbianos. Entretanto, essa descentralização da produção traz consigo um desafio essencial: **como garantir que esses produtos sejam realmente eficazes, seguros e compatíveis com as exigências biológicas e legais vigentes?** A resposta passa necessariamente pela adoção de procedimentos rigorosos de qualidade.

A qualidade OnFarm é determinada por um conjunto de fatores que envolve desde a seleção correta do microrganismo, sua identidade genética e pureza microbiológica, até as condições de cultivo, fermentação, formulação e armazenamento. Erros em qualquer uma dessas etapas podem comprometer a viabilidade do agente biológico, favorecer contaminações por microrganismos indesejáveis ou mesmo gerar produtos ineficazes — riscos que se tornam ainda mais críticos quando se

considera o uso direto no campo e o impacto potencial sobre ecossistemas agrícolas. Assim, o controle de qualidade deixa de ser uma etapa opcional e passa a constituir o **eixo central** da produção de bioinsumos na fazenda.

Este manual foi elaborado com o objetivo de orientar profissionais, técnicos e produtores sobre os principais aspectos envolvidos no controle de qualidade de bioinsumos produzidos na fazenda. Ao longo dos capítulos, são apresentados os fundamentos do laboratório microbiológico, com destaque para os equipamentos e reagentes essenciais (Capítulo 1), além das formulações e técnicas corretas de preparo dos meios de cultura (Capítulo 2), que são a base para a análise microbiológica. Nos capítulos seguintes, abordam-se os métodos de identificação (Capítulo 3) e quantificação (Capítulo 4) dos microrganismos multiplicados OnFarm, ferramentas fundamentais para assegurar que o produto contenha o agente biológico correto e na concentração adequada.

A correta aplicação dessas técnicas, associada ao conhecimento da legislação vigente e à utilização de métodos validados cientificamente, é indispensável para garantir a segurança, a eficácia e a legalidade dos bioinsumos produzidos na fazenda.

Este livro busca, portanto, contribuir para uma produção OnFarm **mais segura, tecnicamente embasada e alinhada com as boas práticas de manejo biológico**, oferecendo uma abordagem completa que integra fundamentos científicos, aplicação prática e rigor metodológico. Espera-se que este manual fortaleça a profissionalização da produção de bioinsumos no campo e apoie a construção de sistemas agrícolas mais sustentáveis, eficientes e biologicamente equilibrados.

# 1
CAPÍTULO

# Laboratório microbiológico, equipamentos e insumos

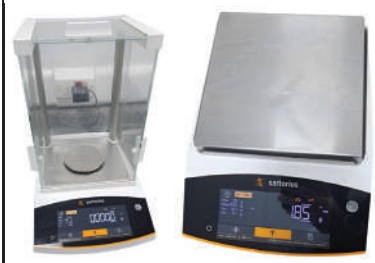
A montagem de um laboratório microbiológico básico é essencial para a realização de análises que garantam a qualidade dos bioinsumos produzidos OnFarm. Este capítulo apresenta uma listagem objetiva dos principais equipamentos, vidrarias e materiais necessários para estruturar um ambiente laboratorial funcional voltado à microbiologia agrícola.

Aqui oferecemos uma referência clara e direta dos itens indispensáveis para a execução de análises microbiológicas, servindo como guia inicial para a organização e aquisição dos recursos necessários. Informações sobre o uso, manutenção e boas práticas serão abordadas em capítulos posteriores.

# Equipamentos

Os equipamentos utilizados em laboratórios microbiológicos referem-se a bens duráveis, que podem ser reutilizados durante a rotina de análises. A descrição e função dos equipamentos pode ser verificada na tabela 1.

| Equipamentos | Descrição/Funções |
|---|---|
| **Agitador magnético**   | Equipamento utilizado para agitação e homogeneização de líquidos. Alguns modelos contém a funcionalidade de aquecimento. Aplicado no preparo de soluções, meios de cultura e dissolução de reagentes em laboratórios microbiológicos e químicos. |
| **Agitador vórtex**   | Equipamento utilizado para realizar a mistura de líquidos, especialmente em tubos de ensaio e microtubos. Promove a homogeneização de amostras por meio de movimento circular vigoroso, formando um vórtice no líquido. |
| **Autoclave**  | Equipamento utilizado para esterilizar materiais através de calor úmido sob pressão, eliminando microrganismos e esporos de forma eficaz. Amplamente utilizado para esterilização de meios de cultura, vidrarias e demais materiais de laboratório. A temperatura e o tempo de exposição devem ser ajustados conforme a natureza e a necessidade do material a ser esterilizado. |

| | |
|---|---|
| **Câmara de Fluxo Laminar**<br> | Câmara equipada com sistema de ventilação que proporciona um ambiente estéril, permitindo a manipulação asséptica de culturas, preparo de meios e transferência de microrganismos. |
| **Balança de Laboratório**<br> | Equipamento de precisão utilizado para a pesagem de amostras biológicas, reagentes, substâncias químicas, e outros materiais. Existem diferentes modelos, como a balança analítica e a balança semi-analítica que variam em sensibilidade e aplicação conforme a necessidade do procedimento. |
| **Bico de Bunsen e Lamparina**<br> | Bico de Bunsen: fonte de chama alimentada por gás, usada para esterilizar instrumentos e realizar experimentos que necessitem de altas temperaturas. A intensidade da chama pode ser ajustada. Lamparina: Equipamento simples que utiliza álcool como combustível para gerar uma chama. |
| **Estufa de Secagem**<br> | Equipamento que utiliza calor seco para esterilizar e secar materiais. Pode ser utilizado em esterilização de vidrarias ou secagem de amostras. |

| | |
|---|---|
| **Incubadora BOD**<br> | Equipamento que mantém condições ambientais controladas, como temperatura e umidade. Utilizado para criar e manter um ambiente estável para o cultivo de culturas microbiológicas. A temperatura é ajustada dependendo do microrganismo cultivado e pode variar entre 25ºC e 37ºC. |
| **Mesa agitadora ou agitador orbital**<br> | Equipamento utilizado para homogeneização e multiplicação de microrganismos, por meio de agitação orbital controlada. Permite ajustes de temperatura e rotação (RPM), dependendo do equipamento. |
| **Microscópio Óptico**<br> | Equipamento usado para ampliar amostras microscópicas. Utilizado para a observação de microrganismos, como bactérias e fungos. Equipado com diferentes objetivas (4x, 10x, 40x, 100x), com variados níveis de ampliação. Na objetiva de 100x, é necessário o uso de óleo de imersão. |

| | |
|---|---|
| **Micropipetas**<br> | Equipamento utilizado para transferência de pequenos volumes de líquidos de forma precisa. Possuem diferentes faixas de volume, geralmente expressos em microlitros (µL), e permite ajuste de volume desejado. |
| **Geladeira**<br> | Necessário para armazenamento de amostras biológicas, meios de cultura e soluções que exigem condição refrigerada. |
| **Medidor de pH (pHmetro)**<br> | Equipamento essencial em laboratório, utilizado para medir pH, que mede o grau de alcalinidade, neutralidade ou acidez, baseado em uma escala que compreende os valores de 0 a 14. |

**Tabela 1.** Descrição e funções de equipamentos essenciais em laboratório microbiológico

# Insumos

Para a rotina laboratorial de preparo de meios e quantificações, recomenda-se o uso de insumos específicos, como descritos na tabela 2.

| Insumos | Descrição/Funções |
|---|---|
| **Alça de Drigalski**  | Instrumento em formato de "L" ou "T", pode ser de vidro, inox ou plástico. As versões de vidro e inox são reutilizáveis após esterilização, enquanto as de plástico são descartáveis após o uso. Utilizado para espalhar de maneira uniforme uma amostra líquida sobre a superfície de uma placa de Petri contendo meio de cultura sólido por técnicas de espalhamento superficial. |
| **Alça de platina ou Alça de inoculação**  | Instrumento metálico ou plástico, usado para transferir ou coletar a superfície de microrganismos, além de inoculação de microrganismos em meios de cultura sólidos ou líquidos. Os instrumentos metálicos devem ser esterilizados antes de cada uso no bico de Bunsen ou lamparina. O plástico deve ser descartado após o uso. |
| **Béquer**  | Recipiente de vidro ou plástico, usado no preparo de soluções, dissolução de substâncias e esterilização de materiais. |

| | |
|---|---|
| **Erlenmeyer**<br> | Recipiente de vidro, com fundo liso, formato cônico, e boca estreita. Usado no preparo de soluções, bem como em processos de cultivo e multiplicação de microrganismos. |
| **Estante para tubos**<br> | Suporte para acomodar tubos de diversos tamanhos. |
| **Frasco reagente graduado**<br> | Frasco de vidro borossilicato (Boro 3.3), resistente a choques térmicos e agentes químicos, utilizado para a homogeneização ou o armazenamento de amostras líquidas. |
| **Lâminas e lamínulas**<br> | Lâmina de vidro fina usada para visualização de amostras sob microscópio. A lamínula é colocada sobre a amostra na lâmina, para protegê-la e facilitar a observação. |

| | |
|---|---|
| **Meios de Cultura**<br> | Substratos contendo substâncias nutritivas, utilizados para o cultivo de microrganismos. Fornecem os nutrientes necessários para o crescimento bacteriano, fúngico ou de outros microrganismos. Podem ser líquidos (caldo/broth) ou sólidos (ágar/agar). |
| **Placas de Petri**<br> | Recipientes circulares e rasos, geralmente feitos de vidro ou plástico, com uma tampa que se encaixa sobre a base. As placas de vidro são reutilizáveis após esterilização, enquanto as de plástico são descartáveis. São utilizadas para conter meios de cultura que suportam o crescimento de microrganismos, como bactérias e fungos. Comumente preenchidas com meio de cultura solidificado à base de ágar, são ideais para o cultivo, isolamento e análise de colônias individuais de microrganismos em condições controladas. |
| **Ponteiras**<br> | Acessórios plásticos descartáveis, utilizados em conjunto com micropipetas para transferência precisa de pequenos volumes de líquidos. Disponíveis em diferentes tamanhos e volumes. |
| **Proveta**<br> | Cilindro graduado, geralmente de plástico ou vidro, utilizado para medir e transferir volumes definidos de líquidos com precisão. |

| | |
|---|---|
| **Tubo de ensaio**<br> | Vidraria utilizada para conter, agitar ou armazenar amostras biológicas. É frequentemente empregado no processo de diluição seriada. |
| **Microtubo**<br> | Pequeno tubo graduado, com capacidade para armazenar de 0,5 mL a 5 mL. Geralmente utilizado em análises de biologia molecular que requerem volumes menores, mas também pode ser empregado para armazenar amostras concentradas. |
| **Tubo falcon**<br> | Tubo plástico graduado, disponível nos modelos com volumes máximos de 15 mL e 50 mL. Utilizado para o armazenamento, centrifugação e manipulação de amostras líquidas em procedimentos laboratoriais, podendo substituir o tubo de ensaio em determinadas aplicações. |

**Tabela 2.** Descrição e funções de insumos essenciais em laboratório microbiológico

# Referências

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 6. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2021.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; BAIR III, W. B.; WEBER, D.; FUNKE, B. R. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2024.

# 2

CAPÍTULO

# Meios de cultura, composição e modo de preparo

Os meios de cultura são componentes fundamentais nas análises microbiológicas voltadas ao controle de qualidade de bioinsumos. Eles fornecem os nutrientes e condições adequadas para o crescimento, isolamento e identificação dos microrganismos de interesse, sendo essenciais tanto para a verificação da presença de microrganismos desejados quanto para a detecção de contaminantes.

Neste capítulo, serão apresentados os principais meios utilizados em laboratório microbiológico, suas composições básicas e as formas de preparo. Os meios podem ser adquiridos prontos, diretamente de fornecedores especializados, ou preparados no próprio laboratório, a partir da pesagem e mistura dos componentes individuais. A escolha entre essas opções depende da estrutura disponível, da frequência de uso e da necessidade de padronização nas análises.

Os principais meios de cultura utilizados em análises microbiológicas de controle de qualidade incluem:

**Ágar Triptona de Soja (TSA):** meio de cultura comumente utilizado na microbiologia para o cultivo e isolamento de uma ampla variedade de microrganismos, especialmente bactérias heterotróficas.

**Ágar Batata Dextrose (BDA):** meio de cultura comumente utilizado na microbiologia para o cultivo e isolamento de uma ampla variedade de microrganismos, com ênfase em fungos filamentosos e leveduras.

**HiCrome Bacillus Agar (M1651):** meio de cultura seletivo para o gênero *Bacillus*, comumente utilizado para facilitar a diferenciação morfológica de bactérias do gênero *Bacillus*.

**Ágar Manitol com Extrato de Levedura e Vermelho Congo *(YMA — Yeast Mannitol Agar):*** meio seletivo composto por extrato de levedura e manitol, utilizado para o cultivo de bactérias inoculantes e co-inoculantes, como *Bradyrhizobium* spp.

**Ágar King B:** meio de cultura semisseletivo utilizado para o isolamento e a diferenciação de bactérias do gênero *Pseudomonas*, especialmente aquelas produtoras de pigmentos fluorescentes, como *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa*.

**Ágar Livre de Nitrogênio com Azul de Bromotimol (NFB - *Nitrogen Free Bromothymol Blue*):** meio de cultura semissólido, isento de fonte nitrogenada, utilizado para o isolamento e cultivo de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum*.

**Rojo Congo (RC):** meio de cultura semisseletivo para bactérias co-inoculantes do gênero *Azospirillum*. Meio indicado para análises de *Azospirillum* pelo Ministério da agricultura e pecuária (MAPA) (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 13 DE ABRIL DE 2018).

# Formulação e método de preparo

## Pós formulados e prontos para uso (TSA, BDA, HiCrome, YMA, King B.)

a. Para preparar os meios de cultura prontos, recomenda-se pesar a quantidade em gramas indicada pelo fabricante, conforme embalagem.

   **NOTA:** verificar a validade e quantidade do meio a ser utilizado.

b. Deve-se dissolver o conteúdo pesado em água destilada utilizando um agitador mecânico ou magnético (quantidade em gramas indicada pelo fabricante). Fazer ajustes no pH, se necessário.

c. Após a completa dissolução, esterilizar por autoclavagem a 121 °C e 1 atm de pressão, por um período entre 15 e 25 minutos, conforme as recomendações específicas do fabricante, uma vez que estas podem variar.

d. Após a autoclavagem, aguardar o meio fundente resfriar, ao ponto de conseguir pegar o recipiente sem se queimar. Cuidado para que o meio não resfrie demais e comece a solidificar no frasco, impedindo a transferência para as placas de Petri.

e. Em câmara de fluxo laminar, distribuir o meio de cultura esterilizado em placas de Petri e aguardar a solidificação. Em seguida, armazenar as placas preferencialmente em geladeira, com a tampa direcionada para baixo a fim de evitar acúmulo de gotículas de água.

# Formulações específicas

## Ágar Manitol com Extrato de Levedura e Vermelho Congo *(YMA — Yeast Mannitol Agar with Congo Red)*

O meio Ágar Manitol com Extrato de Levedura e Vermelho Congo (YMA — *Yeast Mannitol Agar with Congo Red*) é amplamente utilizado para o isolamento e caracterização de bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* e outros microrganismos diazotróficos, devido à presença do corante que auxilia na diferenciação de colônias pela absorção diferencial do vermelho congo. Segundo Baldani et al. (1998) e Ferreira et al. (2024), o preparo do YMA deve ser realizado mediante a pesagem criteriosa dos componentes listados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Composição do Meio YMA – *Yeast Mannitol Agar with Congo Red.*

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Extrato de levedura | 0,4 g |
| Manitol ($C_6H_{14}O_6$) | 5,0 g |
| Fosfato de potássio dibásico ($K_2HPO_4$) | 0,5 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$) | 0,2 g |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 0,1 g |
| Solução de Vermelho Congo 0,25% | 10,0 mL |
| Ágar | 20,0 g |
| Água destilada | q.s.p.1000,0 mL |
| **pH final ajustado para 6,8 – 7,0** | |

Antes do preparo do meio de cultura, uma solução estoque contendo vermelho congo deve ser preparada a partir da pesagem de 0,25 g deste componente, dissolvido em 100 mL de água destilada. Em seguida, 10 mL dessa solução estoque deve ser adicionada aos outros ingredientes para composição do meio de cultura, conforme descrito na tabela 3.

Dissolva completamente os ingredientes e, em seguida, ajuste o pH na faixa 6,8 a 7,0.

**NOTA:** Para a elevação do pH, recomenda-se a adição gradual de solução de NaOH 0,1 M, utilizando pipeta ou bureta, sob agitação constante, a fim de evitar variações bruscas. Da mesma forma, para a redução do pH, deve-se empregar solução de HCl 0,1 M, também em pequenas alíquotas sucessivas e sob homogeneização. A aferição do pH deve ser feita com pHmetro devidamente calibrado, assegurando precisão no processo.

Esterilizar por autoclavagem a 121 °C a 1 atm de pressão, por um período entre 20 e 25 minutos. Após a autoclavagem, distribuir o meio de cultura esterilizado em placas de Petri e aguardar a solidificação, em seguida, armazenar as placas preferencialmente em geladeira.

## Ágar King B (KB)

O Ágar King B (KB), também chamado de King's Medium B, é um meio clássico utilizado para isolamento e diferenciação de espécies de *Pseudomonas*, especialmente pela capacidade de induzir a produção de pigmentos fluorescentes sob luz ultravioleta (UV).

### *Modo de preparo do meio KB*

Pesar os componentes descritos na tabela 4.

**Tabela 4:** Ingredientes do Meio KB

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Peptona | 20,0 g |
| Glicerina bidestilada | 10,0 mL |
| Fosfato de potássio dibásico ($K_2HPO_4$) | 1,5 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 1,5 g |
| Ágar | 20,0 g |
| Água destilada | q.s.p.1000,0 mL |

O preparo do meio King B deve ser realizado dissolvendo-se inicialmente a peptona, o fosfato de potássio ($K_2HPO_4$) e o sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) em aproximadamente 800 mL de água destilada. Em seguida, adiciona-se o ágar e a mistura é aquecida sob agitação até completa dissolução. Após esse passo, incorpora-se a glicerina previamente medida (10 mL) e a solução é homogeneizada, completando-se o volume para 1.000 mL com água destilada. O pH deve ser ajustado para 7,2 ± 0,2 antes de a solução ser distribuída em frascos apropriados, que, por fim, devem ser esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

***Observações:***

- Após preparo e solidificação em placas de Petri, o meio pode ser semeado e incubado a 26–28 °C.
- A fluorescência característica de *Pseudomonas* spp. pode ser observada sob lâmpada de UV (365 nm).
- O meio deve ser armazenado em local fresco e escuro para evitar degradação do glicerol e oxidação.

**Preparo de formulação pronta (meio de cultura comercial):** O meio King B encontra-se disponível comercialmente em formulação pronta. Para seu preparo, basta dissolver 33 g de meio de cultura comercial em aproximadamente 900 mL de água destilada. Após dissolução completa, adicionar 10 mL de glicerina bidestilada. Complete com água destilada até o volume final de 1 litro e misture novamente para promover melhor homogeneidade.

Esterilizar por autoclavagem a 121°C a 1 atm de pressão, por um período de 20 a 25 minutos.

**NOTA:** As instruções de preparo podem variar de acordo com fabricante.

Após a autoclavagem, distribua o meio de cultura esterilizado em placas de Petri e aguarde a solidificação, em seguida, armazene as placas preferencialmente em geladeira.

## NFB *(Nitrogen Free Bromothymol Blue)* (Döbereiner, 1991; instrução normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010; embrapa, 2024).

O meio NFB contém três soluções, sendo: meio de cultura, micronutrientes e solução de vitaminas, conforme tabela 5.

**Tabela 5:** Composição da solução base do meio NFB

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Ácido málico ($C_4H_6O_5$, forma DL racêmica) | 5,00 g |
| Fosfato de potássio dibásico ($K_2HPO_4$) | 0,50 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$) | 0,10 g |
| Cloreto de cálcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$) | 0,02 g |
| Solução de micronutrientes (ver Tabela 6) | 2,00 mL |
| Azul de bromotimol (0,5%) (ver Tabela 8) | 2,00 mL |
| Solução de Fe-EDTA (1,64%) (ver Tabela 9) | 4,00 mL |
| Solução de vitaminas (ver Tabela 7) | 1,00 mL |
| Hidróxido de potássio (KOH) | 4,00 g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0 mL |

Dissolver completamente os componentes listados na tabela 5 e, em seguida, ajustar o pH mantendo-o entre 6,5 e 6,8. Nas tabelas 6, 7, 8 e 9 são descritos os componentes da solução de micronutrientes, da solução de vitaminas, da solução de azul de bromotimol e da solução de Fe-EDTA, respectivamente.

**Tabela 6:** Composição da solução de micronutrientes utilizada no meio NFB

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Sulfato de cobre(II) pentahidratado ($CuSO_4.5H_2O$) | 0,008 g |
| Sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4.7H_2O$) | 0,024 g |
| Ácido bórico ($H_3BO_3$) | 0,280 g |
| Molibdato de sódio dihidratado ($Na_2MoO_4.2H_2O$) | 0,200 g |
| Sulfato de manganês(II) monohidratado ($MnSO_4.H_2O$) | 0,235 g |
| Água destilada | q.s.p.200,0 mL |

**Tabela 7:** Composição da solução vitamínica utilizada no meio NFB

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Biotina (vitamina $B_7$) | 10 mg |
| Piridoxina (vitamina $B_6$) | 20 mg |
| Água destilada | q.s.p.100 mL |

Após dissolver completamente a solução, submeter a mistura a banho-maria até total dissolução dos compostos em água.

NOTA: Após resfriamento, armazenar em geladeira por até 6 meses.

**Tabela 8:** Composição da solução de Azul de Bromotimol (0,5%)

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Azul de bromotimol P.A. | 5,00 g |
| Solução de hidróxido de potássio 0,2 N (KOH) | q.s.p. 1000,00 mL |

**Azul de bromotimol a 0,5%:** Pesar 5 g de azul de bromotimol e adicionar aproximadamente 900 mL de solução de KOH 0,2 N (Hidróxido de Potássio), manter sob agitação no agitador magnético até dissolver. Transferir para um balão volumétrico e completar o volume final para 1.000 mL com a mesma solução de KOH 0,2 N.

**NOTA:** Armazenar em geladeira por até 6 meses.

**Tabela 9:** Composição da solução de Fe-EDTA 1,64%

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Fe-EDTA P.A. | 16,4 g |
| Água destilada | q.s.p1000 mL |

Adicionar 16,4 g de Fe-EDTA em 500 mL de água destilada, agitar até completar a solubilização. Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume com água destilada.

Ajustar o pH para 6,8.

**NOTA:** Armazenar em geladeira por até 6 meses.

É possível utilizar duas metodologias de avaliação com o meio NFB. O meio semissólido é utilizado para avaliações pelo método do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady. O meio sólido é utilizado para avaliação por UFC/mL (Cap. 4). Portanto, a avaliação escolhida pode alterar o preparo do meio de cultura:

- **Meio semissólido**
  Para produzir o meio semissólido, após pesar todos os ingredientes descritos na tabela 5, em um béquer, adicionar 4 g de ágar por litro de solução. Levar ao micro-ondas até ferver, observando total dissolução do ágar. Distribuir 5 mL do meio em tubos de ensaio de 7,5 mL, tampar com algodão e autoclavar.
- **Meio sólido**
  Para produzir o meio sólido, adicionar 15 g de ágar e 200 mg de extrato de levedura para cada litro de meio NFB. Autoclavar a 121 °C a 1 atm de pressão, por 20-25 minutos. Após autoclavagem, distribuir o meio esterilizado em placas de Petri. Aguardar solidificação e armazenar em geladeira.

## Rojo Congo (RC)

O meio semisseletivo RC deve ser utilizado para detecção e quantificação de *Azospirillum* spp., conforme estabelece a Instrução Normativa MAPA nº 14/2018.

**Tabela 10:** Composição do meio Rojo Congo (RC)

| Componente | Quantidade |
|---|---|
| Fosfato de potássio dibásico ($K_2HPO_{4)}$ | 0,500 g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$) | 0,200 g |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 0,100 g |
| Extrato de levedura | 0,500 g |
| Cloreto de ferro(III) hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$) | 0,015 g |
| Ácido málico ($C_4H_6O_5$, forma DL racêmica) | 5,000 g |
| Hidróxido de potássio (KOH) | 4,800 g |
| Solução Vermelho Congo 0,25%* | 15,000 mL |
| Ágar | 20,000 g |
| Água destilada | q.s.p.1000 mL |

* Para o preparo da solução de Vermelho Congo, dissolver 0,25 g de Vermelho Congo em 100 mL de água destilada.

Após pesar todos os componentes do meio RC (tabela 10), dissolver a solução completamente, e em seguida, ajustar o pH na faixa 6,8 a 7,0.

**NOTA:** Utilizar solução de KOH 0,1M para elevar o pH e solução de HCl 0,1M para baixar o pH do meio de cultura.

Esterilizar por autoclavagem a 121°C a 1 atm de pressão, por um período entre 20 e 25 minutos. Após a autoclavagem, distribuir o meio de cultura esterilizado em placas de Petri e aguardar a solidificação, em seguida, armazenar as placas preferencialmente em geladeira.

# Referências

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, *M. Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes.* 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2024.

BALDANI, V. L. D.; ANDRADE, V. D. O.; NEVES, M.; BARBOSA, A.; PEIXOTO, R.; OLIVEIRA, E. C. R. de. *Manual de soluções e reagentes da Embrapa Agrobiologia.* Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1998.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrucao Normativa SDA n. 14, de 13 de abril de 2018. Altera os arts. 4o, 21, 35 e o Anexo da Instrucao Normativa SDA n. 30, de 12 de novembro de 2010. Diario Oficial da Uniao, Brasilia, DF, 16 abr. 2018. Secao 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Manual de metodologias de bioinsumos. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Laborat%C3%B3rios/Metodologia/Bioinsumos/Bioinsumos_Manual. Acesso em: 22 abr. 2026.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrucao Normativa SDA n. 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os metodos oficiais para analise de inoculantes, sua contagem, identificacao e analise de pureza. Diario Oficial da Uniao, Brasilia, DF, 17 nov. 2010. Secao 1.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock.* 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.* 6. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2021.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; BAIR III, W. B.; WEBER, D.; FUNKE, B. R. *Microbiologia.* Porto Alegre: Artmed, 2024.

# 3
CAPÍTULO

# Identificação de microrganismos

A identificação correta dos microrganismos presentes nos bioinsumos produzidos OnFarm é fundamental para garantir a qualidade, a eficácia e a segurança do produto aplicado no campo. Esse processo envolve o reconhecimento das características morfológicas e fisiológicas típicas de cada grupo microbiano, permitindo diferenciar os microrganismos de interesse daqueles indesejados ou contaminantes.

Neste capítulo, são abordadas as principais estratégias utilizadas para identificação de fungos e bactérias, com ênfase no estudo da morfologia das estruturas produzidas — como esporos, hifas, formas celulares e pigmentações — e na caracterização das colônias em meios de cultura. Também são apresentados alguns métodos bioquímicos e moleculares que complementam a análise morfológica, aumentando a precisão na identificação e auxiliando na validação da presença do microrganismo-alvo no bioinsumo.

# Fungos

## Diferenciação baseada em características culturais e morfológicas

### *Beauveria bassiana*

Fungo entomopatogênico que cresce como uma massa micelial branca, a qual se torna pulverulenta com a maturação dos conídios (Figura 1). Apresenta conidióforos ramificados de forma irregular, formando conídios arredondados em formato de esferas, globosos ou elipsoidais. Os conídios aparecem em cadeias curtas, às vezes com hilo imperceptível na base, hialinos (transparentes), asseptados, paredes finas e lisas, medindo 2 a 3 µm de comprimento e 2 a 3 µm de largura (Figura 2).

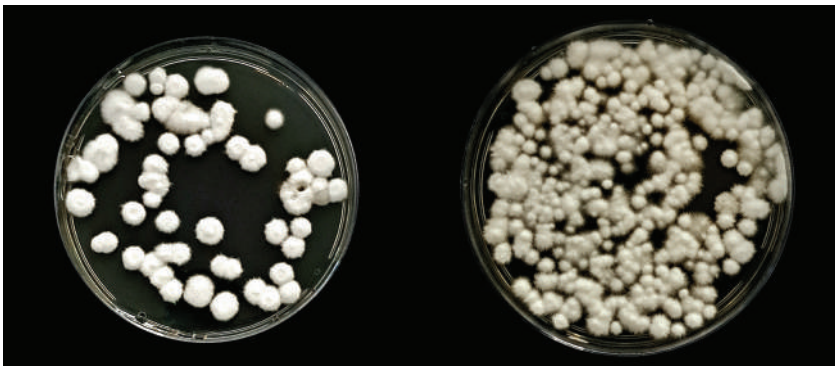


**Figura 1.** Aspecto de colônias do fungo ***Beauveria bassiana*** em meio BDA**.**

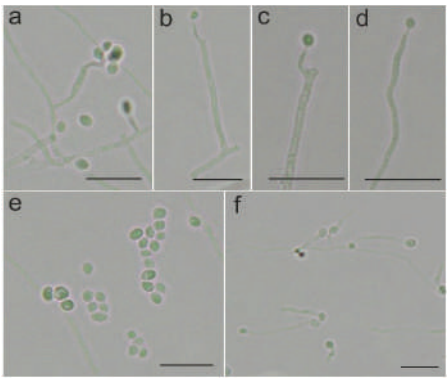



**Figura 2.** Detalhe do fungo ***B. bassiana*** em microscopia, em aumento 100 vezes. Legenda: **a. b. c.** e **d**. conidióforos hialinos com conídios imaturos aderidos. **f.** conídios germinados. Escala de 10 µm.

### *Metarhizium anisopliae*

Apresenta micélio inicialmente branco, tornando-se verde a verde-oliva, com textura aveludada e crescimento micelial rápido (Figura 3). Conidióforos agregados em tufos densos, com ramificações repetidas, mais ou menos verticiladas; fiálides em arranjo denso e paralelo. Conídios produzidos em cadeias, cilíndricos, medindo 5 a 8 µm de comprimento e 2,5 a 3,5 µm de largura, com paredes espessas, hialinos (transparentes) ou verdes (Figura 4).

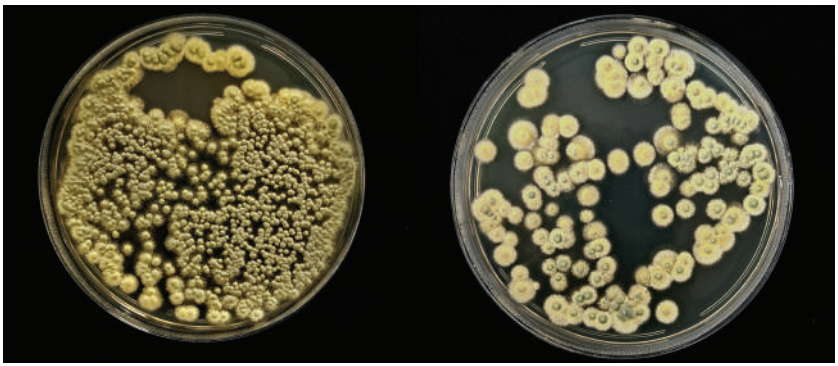


**Figura 3.** Aspecto de colônias do fungo ***Metarhizium anisopliae*** em meio BDA**.**

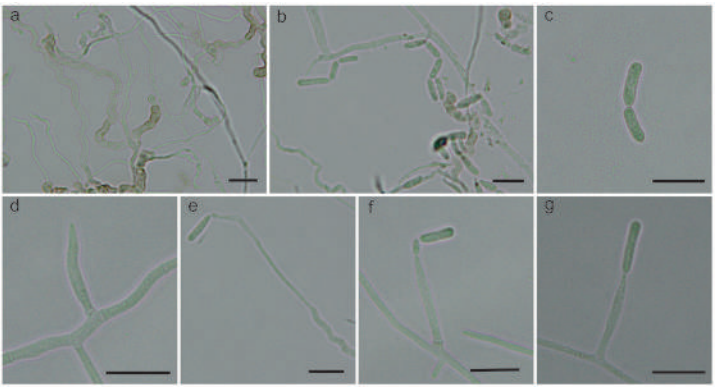



**Figura 4.** Detalhe do fungo ***M. anisopliae*** em microscopia. Legenda: **a.** Micélio. **b.** e **c.** Esporos produzidos em cadeias. **d.** Célula conidiogênica. **e. f.** e **g.** Conídio aderido à célula conidiogênica. Barras: 10 µm, exceto b (20 µm).

### *Cordyceps fumosorosea (Isaria fumosorosea)*

***Isaria fumosorosea***, atualmente renomeado para ***Cordyceps fumosorosea***, produz inicialmente micélio de cor branca, tornando-se rosa-acinzentada com o tempo (Figura 5). Seus conidióforos são longos, ramificados e verticilados. Produz conídios cilíndricos a fusiformes, com paredes lisas, hialinos (transparentes) a rosa claro, e medem cerca de 3 a 4µm de comprimento e 1 a 2 µm de largura (Figura 6).

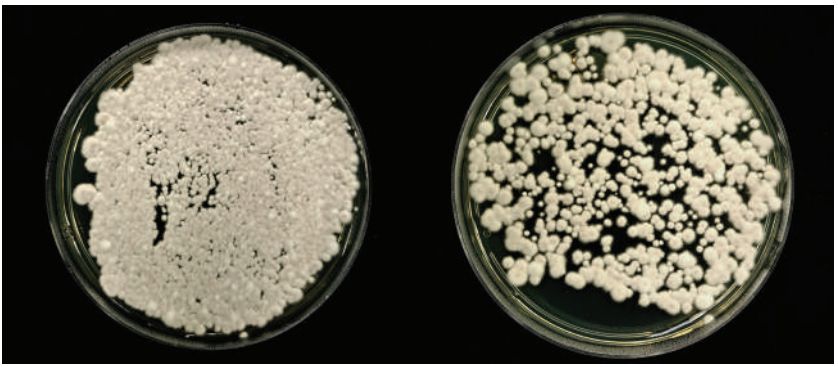


**Figura 5.** Aspecto de colônias do fungo ***Cordyceps fumosorosea*** em meio BDA.

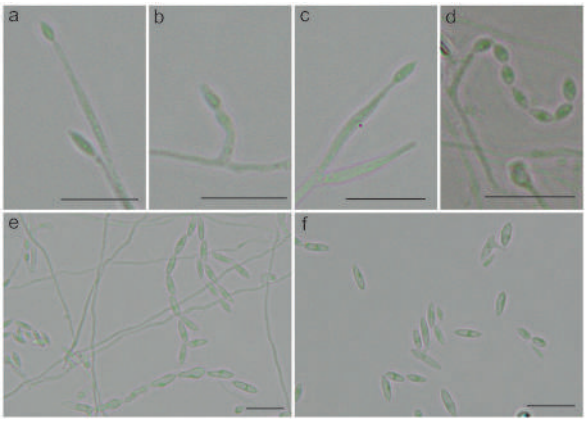



**Figura 6.** Detalhe do fungo ***C. fumosorosea*** em microscopia. Legenda: **a. b.** e **c.** Conídios aderidos a célula conidiogênica. **d.** Conídios produzidos em cadeia **e.** Micélio e cadeia de esporos; **f.** Conídios germinando. Barras: 10 µm.

### *Purpureocillium lilacinum (Paecilomyces lilacinus)*

*Paecilomyces lilacinus* atualmente reclassificado como *Purpureocillium lilacinum*, apresenta colônias lilás e textura aveludada (Figura 7). Os conidióforos são longos, finos e verticilados. Os conídios são formados em cadeias, de formato elipsoidal a fusiforme (forma de limão), hialinos (transparentes) ou roxos, medindo em torno de 2,5 a 3,0 µm de comprimento e 2,0 a 2,2 µm de largura (Figura 8).



**Figura 7.** Aspecto de colônias do fungo ***Paecilomyces lilacinus*** em meio BDA.

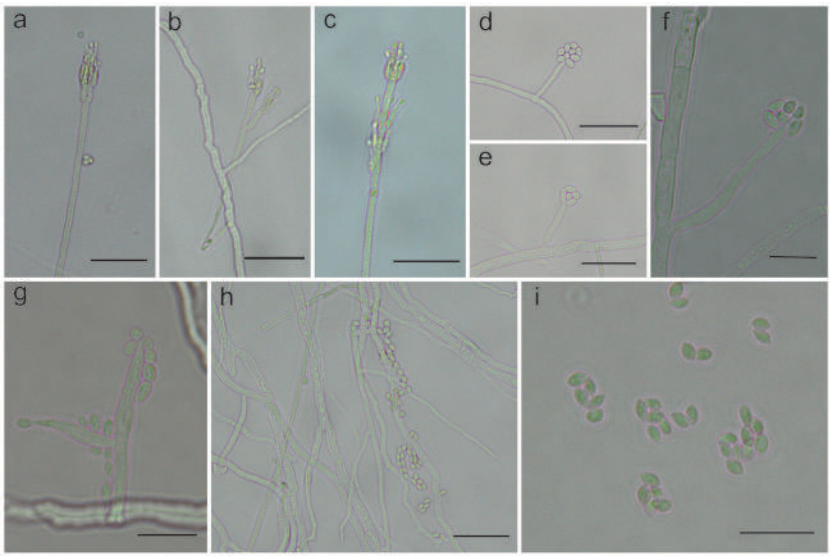



**Figura 8.** Detalhe do fungo ***P. lilacinus*** em microscopia. Legenda: **a. b.** e **c.** Conidióforos. **d. e. f.** e **g. Células** conidiogênicas. **h.** Micélios e conídios. **i.** Conídios. Barras: 20 µm, exceto f,g e i (10µm).

### *Trichoderma asperellum*

Apresenta colônias que crescem rapidamente, inicialmente brancas, mas tornando-se rapidamente de coloração verde (Figura 9). Seus conidióforos são eretos com ramificações que terminam em duas ou mais fiálides (células em forma de frasco que dão origem aos conídios). Os conídios são globosos a subglobosos ou ovais, hialinos (transparentes) a esverdeados, com dimensões de 3,7 a 6,0 µm de comprimento e 3,0 a 5,0 µm de largura. Este fungo tem a capacidade de produzir clamidósporos (esporos de resistência) que o ajuda a sobreviver em condições ambientais adversas.

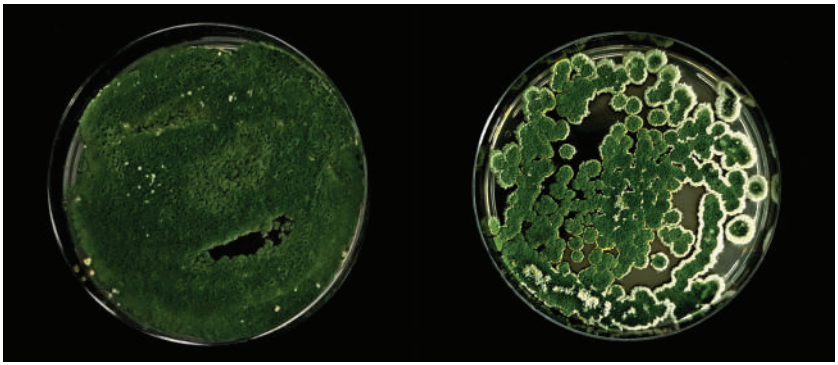


**Figura 9.** Aspecto de colônias do fungo ***Trichoderma asperellum*** em meio BDA.

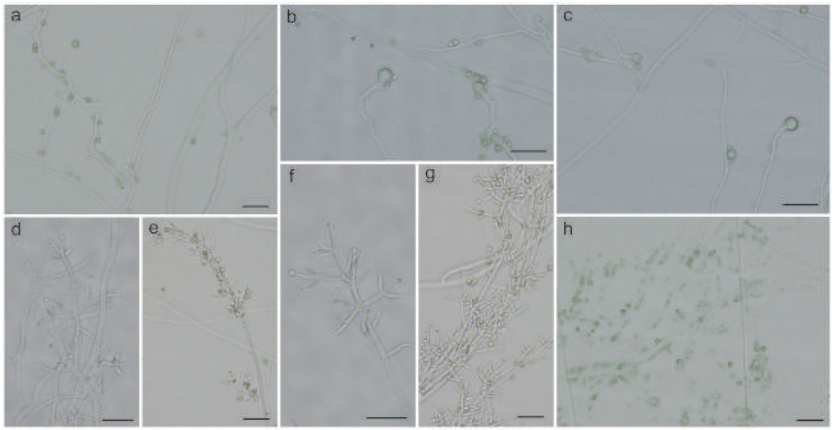



**Figura 10.** Detalhe do fungo ***T. asperellum*** em microscopia. Legenda: **a.** micélio e conídio esverdeados. **b.** e **c.** micélio e clamidósporos. **d. e. f.** e **g.** conidióforo e células conidiogênicas. **h.** conídios. Barras: 20 µm.

# Bactérias

## Diferenciação baseada em morfologia de colônias

### *Bacillus amyloliquefaciens*

Bactéria Gram-positiva amplamente utilizada na agricultura, devido à produção de metabólitos antimicrobianos, que atuam no controle biológico de fitopatógenos. Além disso, estimula o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios e pode promover indução de resistência sistêmica nas plantas. *B. amyloliquefaciens* apresenta colônias grandes, opacas, de bordas irregulares, superfície lisa ou rugosa, dependendo das condições de crescimento. Em meio TSA, apresenta geralmente, aparência esbranquiçada a bege. A figura 11 ilustra o aspecto das colônias da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (ASN61) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 11-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas e em início de crescimento. Em 11-B, após 24 horas no mesmo meio, observam-se colônias maiores, com crescimento mais evidente e distribuição homogênea. Na imagem 11-C, com 48 horas em TSA, as colônias estão bem desenvolvidas, apresentando aspecto rugoso e bordas irregulares características da espécie. A imagem 11-D ilustra o crescimento após 48 horas em meio HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia), onde as colônias exibem coloração rosada/esbranquiçada, crescimento aéreo acentuado e formação de estruturas filamentares, evidenciando a diferença morfológica conferida pelo meio cromogênico.

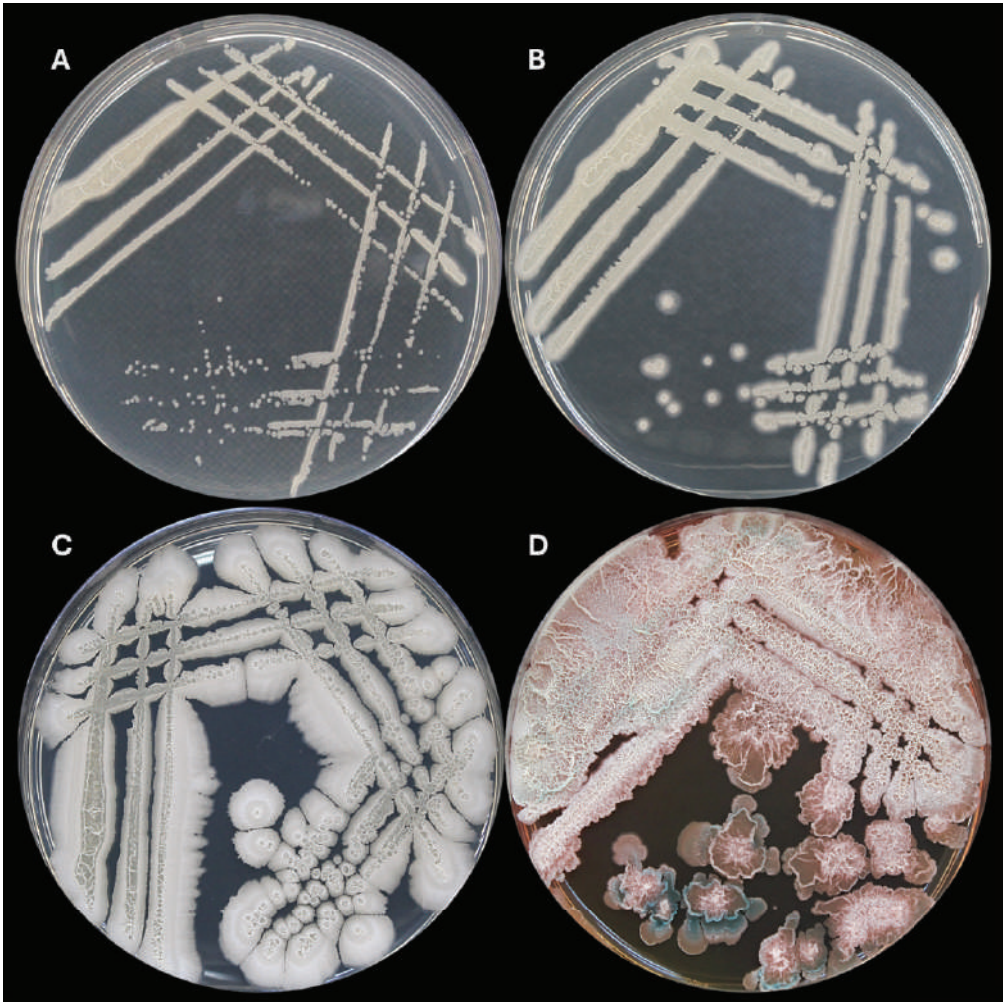



**Figura 11.** Aspecto das colônias da bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* (ASN61) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Bacillus velezensis*

Bactéria Gram-positiva, com características semelhantes à *B. amyloliquefaciens*. Trata-se de uma espécie bacteriana reconhecida por seu alto potencial como agente de controle biológico e promotor de crescimento vegetal. Ela produz uma ampla gama de compostos antimicrobianos, eficazes contra diversos nematoides, fungos e bactérias fitopatogênicas. Em meio sólido (TSA), apresenta geralmente, aspecto de vela derretida, colônias rugosas e coloração branca a ligeiramente bege, com bordas onduladas. A figura 12 ilustra o aspecto das colônias de *Bacillus velezensis* (ASN09) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 12-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, de superfície lisa e brilhante, bordas bem definidas e coloração esbranquiçada, características do estágio inicial de multiplicação dessa espécie. Na imagem 12-B, com 24 horas de incubação, observa-se crescimento mais expressivo, com colônias maiores, de aspecto viscoso e início de formação de estruturas aéreas ao longo das estrias, comportamento típico de *B. velezensis*. Na imagem 12-C, após 48 horas em TSA, as colônias apresentam desenvolvimento acentuado, com margens irregulares, superfície rugosa e elevação central, adquirindo o aspecto característico de "vela derretida", frequentemente associado à produção de matriz extracelular e biofilme por essa espécie. A imagem 12-D mostra o crescimento após 48 horas em meio HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia), com colônias exibindo coloração azul-esverdeada, com áreas avermelhadas e zonas mais claras, resultado da interação com os cromógenos do meio. As colônias apresentam sulcamentos radiais e estruturas aéreas bem desenvolvidas, reforçando o padrão morfológico típico de *B. velezensis* em meio cromogênico.

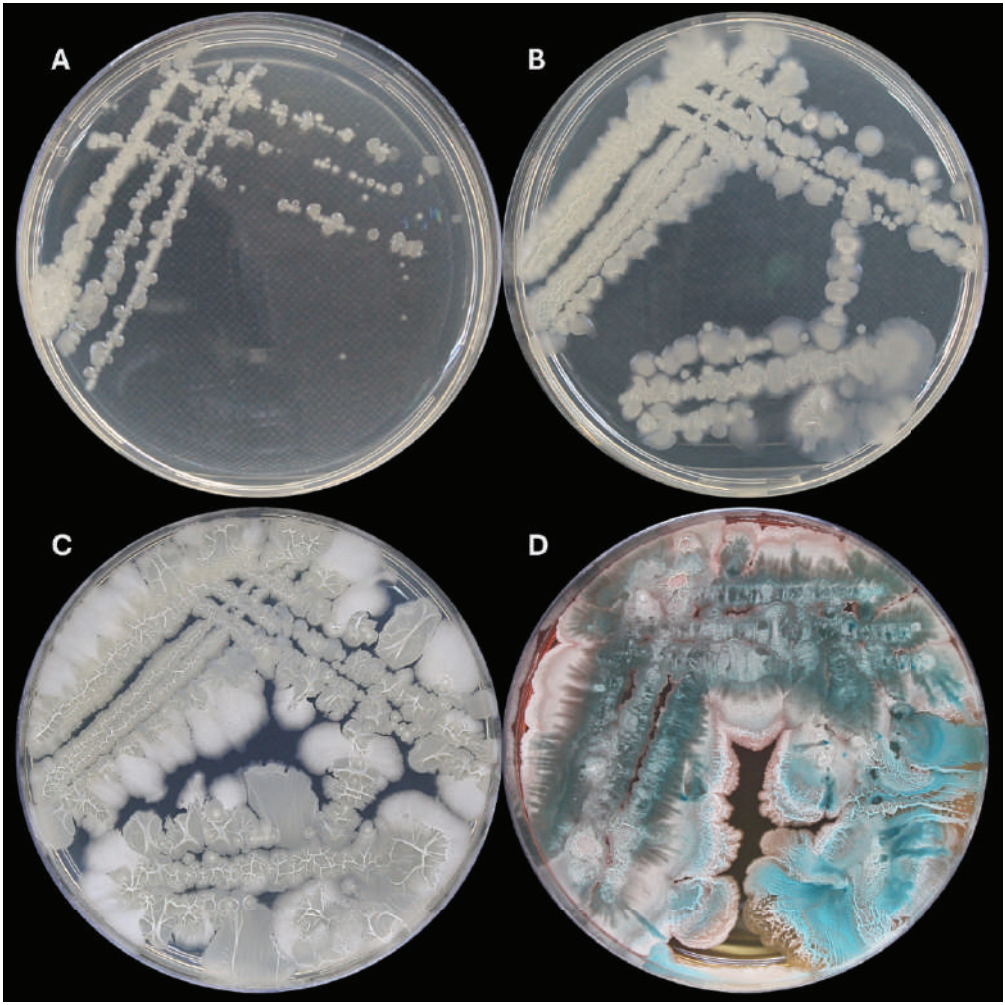



**Figura 12.** Aspecto das colônias de *Bacillus velezensis* (ASN09) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Bacillus subtilis*

É uma bactéria Gram-positiva, caracterizada pela sua forma de bastonete e pela capacidade de formar esporos. Em meio de cultura TSA, as colônias de *B. subtilis* são geralmente grandes, secas e apresentam coloração que varia de bege a marrom claro. As bordas das colônias são normalmente, irregulares e sua textura é rugosa. Quando cultivada em meio cromogênico, exibe uma coloração salmão, frequentemente com um centro azulado, embora a tonalidade possa variar dependendo da cepa específica. A figura 13 ilustra o aspecto das colônias de *Bacillus subtilis* (ASN44) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 13-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, esbranquiçadas, lisas e bem definidas, típicas do início do desenvolvimento. Na imagem 13-B, após 24 horas, observa-se crescimento mais expressivo, com colônias maiores, de bordas regulares e início de rugosidade superficial. Na imagem 13-C, com 48 horas em TSA, as colônias tornam-se maiores, com aspecto seco, rugoso e bordas irregulares, apresentando coloração esbranquiçada a creme. A imagem 13-D mostra o crescimento após 36 horas em meio cromogênico HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia), no qual as colônias assumem coloração azul-esverdeada com áreas esbranquiçadas, enquanto o meio de fundo adquire tonalidade amarelada, resultante da interação da cepa com os cromógenos.

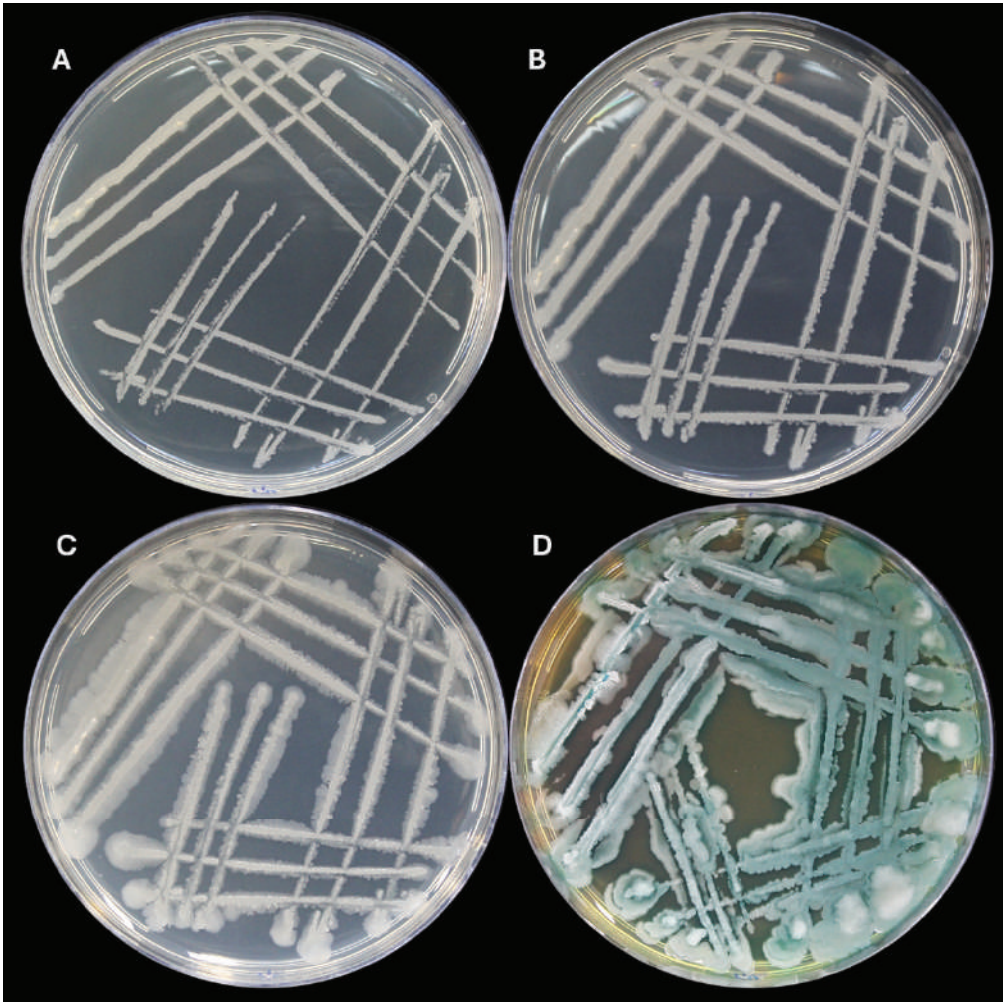



**Figura 13.** Aspecto das colônias de *Bacillus subtilis* (ASN44) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Bacillus licheniformis*

Na microscopia, apresenta bastonetes gram-positivos, com esporos ovais, semelhantes aos de *B. subtilis*. Apresenta geralmente, colônias rugosas e de cor branca ou bege, com bordas irregulares, lobuladas e com margens onduladas. Em meio cromogênico apresenta coloração amarela brilhante nas primeiras 20h de incubação, tornando-se verde após esse período. A figura 14 ilustra o aspecto das colônias de *Bacillus licheniformis* (ASN12) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 14-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, brilhantes, bem definidas e com contornos regulares, apresentando aspecto esbranquiçado e superfície lisa, típicos do crescimento inicial de *B. licheniformis*. Na imagem 14-B, após 24 horas, observa-se crescimento mais pronunciado, com colônias alongadas, aspecto viscoso e início da formação de estruturas aéreas ao longo das estrias, padrão esperado para esta espécie. Na imagem 14-C, com 48 horas em TSA, as colônias mostram maior espessamento, com superfície lisa a levemente irregular e bordas bem delimitadas, mantendo o aspecto mucoide e com acúmulo de biomassa característico de *B. licheniformis*. A imagem 14-D mostra o crescimento após 36 horas em meio HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia). Observa-se alteração expressiva na coloração do meio, com predominância de tons azul-claro concentrados na região central das colônias, formando estruturas ramificadas sobre um fundo que varia de amarelado a bege-claro. Nas áreas periféricas, predominam tonalidades mais próximas ao verde e esbranquiçado, acompanhadas por projeções aéreas delicadas e aspecto filamentoso. As colônias apresentam morfologia típica de *Bacillus licheniformis*, com formação de sulcamentos concêntricos, padrão radial e estruturas aéreas bem definidas, que conferem aspecto tridimensional ao crescimento.

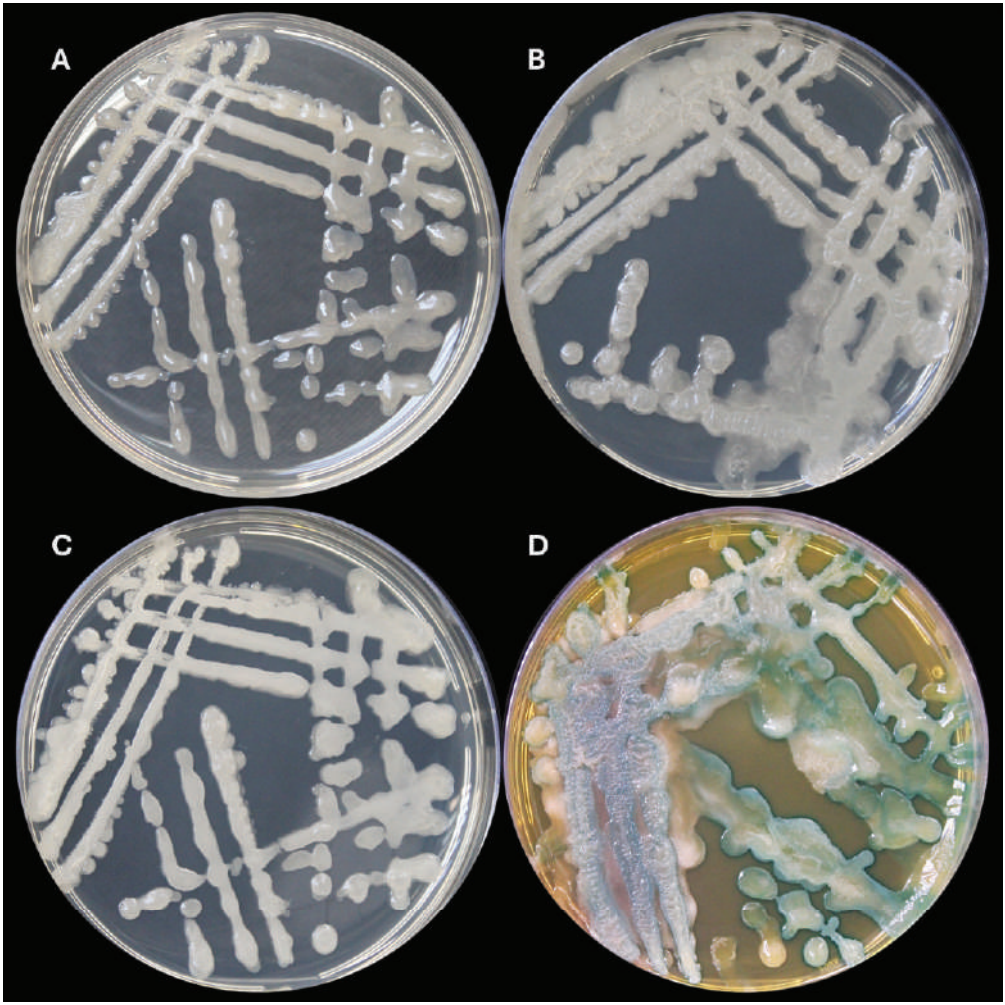



**Figura 14.** Aspecto das colônias de *Bacillus licheniformis* (ASN12) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Bacillus pumilus*

Bactéria Gram-positiva em forma de bastonetes, que forma esporos ovais. Em meio TSA, forma geralmente, colônias lisas, de coloração esbranquiçada a amarelo-claro, com bordas onduladas. A textura pode variar de lisa a rugosa, dependendo do meio de crescimento. Em meio cromogênico, apresenta coloração verde-petróleo. A Figura 15 ilustra o aspecto das colônias de *Bacillus pumilus* (ASN13) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 15-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias muito pequenas, esparsas e translúcidas, compatíveis com o estágio inicial de crescimento da espécie. Na imagem 15-B, após 24 horas, observa-se aumento no número de colônias, pequenas, de bordas bem definidas e coloração esbranquiçada. Na imagem 15-C, com 48 horas em TSA, as colônias estão mais desenvolvidas, com crescimento linear ao longo das estrias, superfície lisa, bordas onduladas e aspecto seco, mantendo a coloração esbranquiçada. A imagem 15-D mostra o crescimento após 36 horas em meio HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia). Nessa condição, as colônias assumem coloração verde-petróleo intensa e brilhante, enquanto o meio ao seu redor sofre alteração para amarelo-pálido em decorrência da atividade metabólica da cepa. Essa coloração verde-petróleo é característica de *B. pumilus* nesse meio cromogênico e facilita sua diferenciação visual.

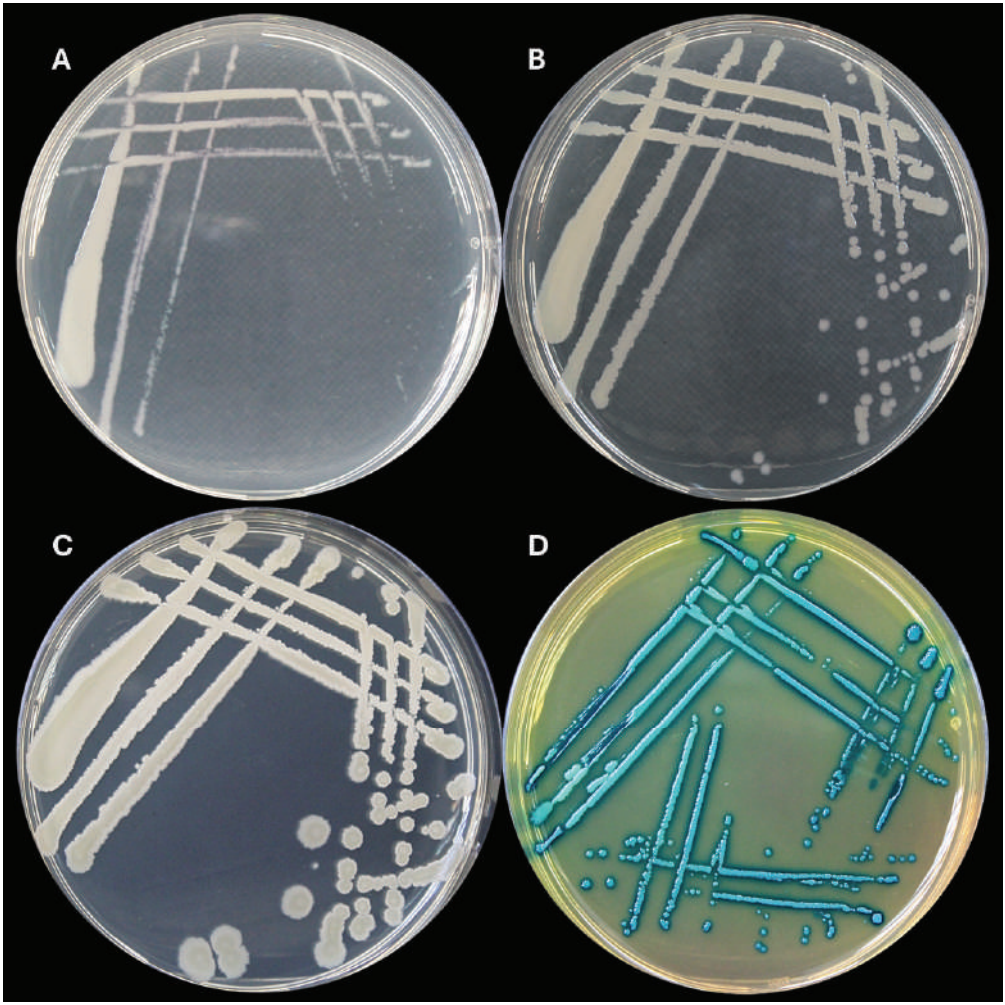



**Figura 15.** Aspecto das colônias de *Bacillus pumilus* (ASN13) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Bacillus thuringiensis*

Bactéria Gram-positiva em forma de bastonete, formadora de esporos ovais. Durante o processo de esporulação, produz cristais proteicos (Cry), que são altamente tóxicos para determinadas espécies de insetos. As colônias de *B. thuringiensis* geralmente, apresentam-se opacas, com textura rugosa e coloração esbranquiçada, com crescimento rápido. Em meios de cultura cromogênicos, as colônias podem exibir colorações distintas dependendo da subespécie. Por exemplo, *B. thuringiensis var. kurstaki* desenvolve colônias de cor azul-royal, enquanto *B. thuringiensis var. aizawai* apresenta colônias variando do verde-esmeralda ao verde-marinho. Essas características auxiliam na identificação e diferenciação das subespécies de *B. thuringiensis.* A Figura 16 ilustra o aspecto das colônias de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (ASN133) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 16-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, translúcidas e esbranquiçadas, indicativas do início da multiplicação bacteriana. Na imagem 16-B, com 24 horas, observa-se aumento no número de colônias, de superfície opaca, bordas regulares e coloração esbranquiçada, características típicas do desenvolvimento inicial da espécie. Na imagem 16-C, após 48 horas em TSA, as colônias estão bem desenvolvidas, com aspecto rugoso, bordas irregulares e maior acúmulo de biomassa, mantendo a coloração esbranquiçada. A imagem 16-D mostra o crescimento após 36 horas em meio HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia). As colônias desenvolvem coloração azul intensa, com tons que variam do azul celeste ao azul royal, enquanto o meio ao redor adquire tonalidade rosa a roxo claro, resultante da interação cromogênica. Essa coloração azul é típica de algumas subespécies de *B. thuringiensis*, como a subsp. kurstaki, e facilita a diferenciação em meio seletivo.

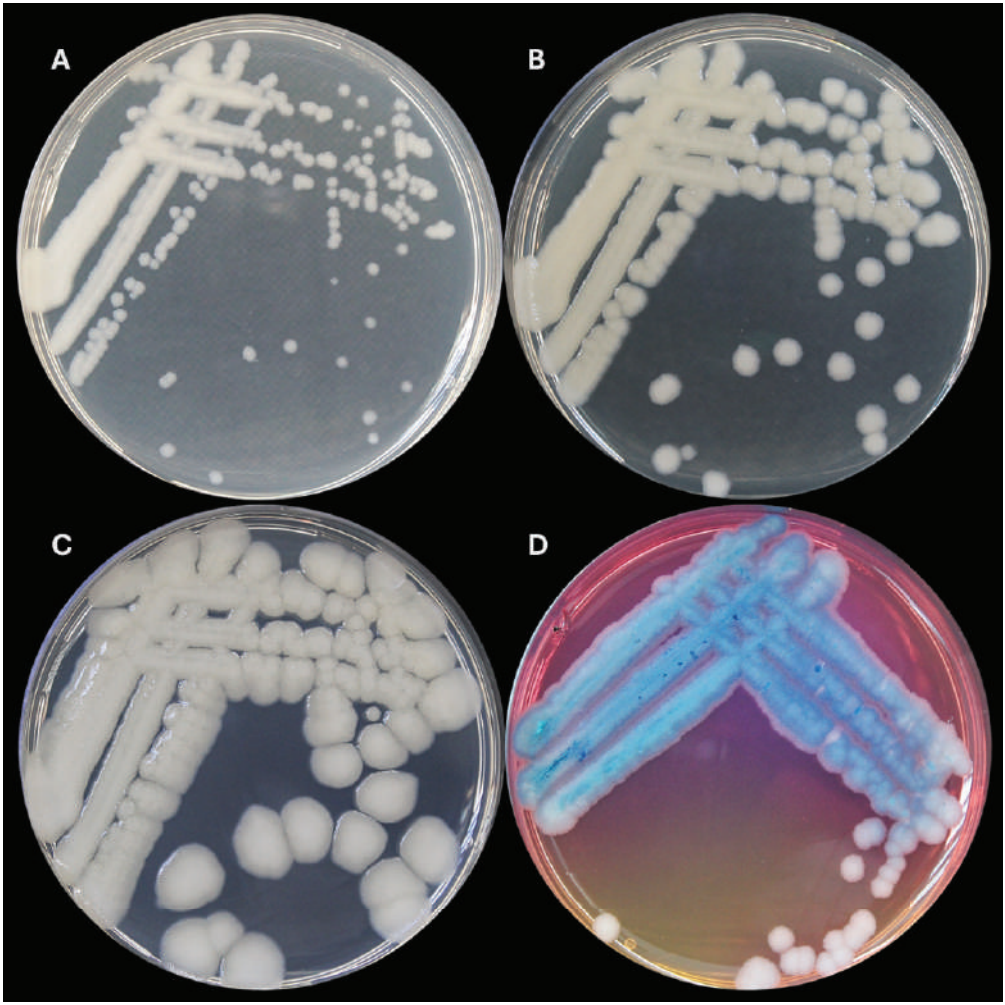



**Figura 16.** Aspecto das colônias de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki* (ASN133) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Priestia megaterium*

Bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, facilmente visualizada ao microscópio devido ao grande tamanho das células. Suas colônias apresentam geralmente, textura viscosa ou brilhante, formato circular, colônias grandes, opacas e de cor creme, com bordas onduladas. Em meio cromogênico, apresenta coloração amarela brilhante. A Figura 17 ilustra o aspecto das colônias de *Priestia megaterium* cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 17-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, lisas, translúcidas e de coloração creme clara. Na imagem 17-B, com 24 horas, observa-se aumento do número e tamanho das colônias, que passam a apresentar aspecto opaco e bordas suavemente onduladas. Na imagem 17-C, após 48 horas em TSA, as colônias tornam-se maiores, com textura viscosa a brilhante, formato circular e coloração creme, mantendo as bordas onduladas características. A imagem 17-D mostra o crescimento em meio cromogênico HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia), no qual as colônias adquirem coloração amarela brilhante, destacando-se sobre o meio, que permanece com fundo levemente amarelado.

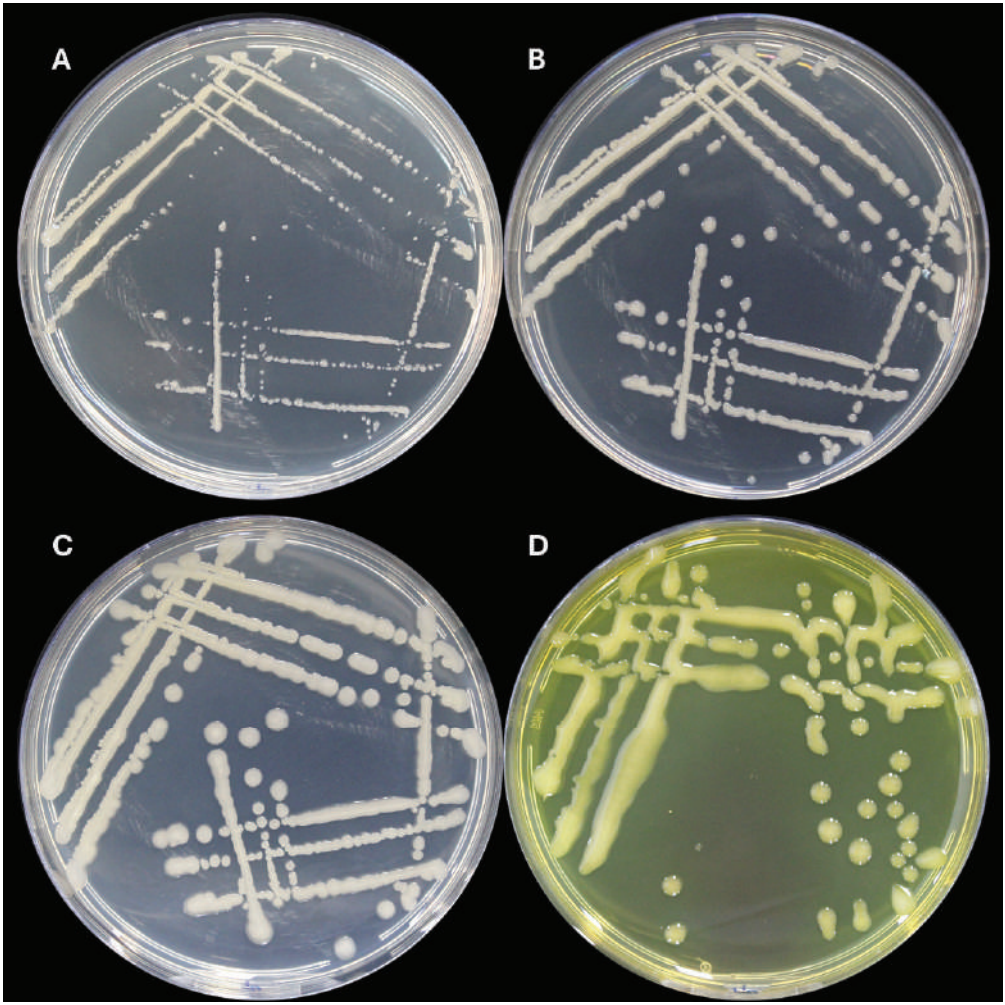



**Figura 17.** Aspecto das colônias de *Priestia megaterium* cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Priestia aryabhattai*

Bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete. Em meio de cultura sólido, geralmente apresentam colônias de cor creme a amarelo claro, com bordas regulares e definidas. Em meio cromogênico apresenta coloração amarela brilhante, semelhante à de *P. megaterium*. A Figura 18 ilustra o aspecto das colônias de *Priestia aryabhattai* (ASN10) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 18-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, de coloração creme, bordas bem definidas e superfície lisa, características do crescimento inicial da espécie. Na imagem 18-B, após 24 horas, observa-se crescimento mais expressivo, com colônias maiores, de coloração creme a amarelo-claro, bordas regulares e aspecto opaco. Na imagem 18-C, com 48 horas em TSA, as colônias apresentam crescimento acentuado, com maior acúmulo de biomassa, mantendo coloração clara e contornos bem delimitados. A imagem 18-D mostra o crescimento após 36 horas em meio HiCrome™ Bacillus Agar (Himedia), no qual as colônias desenvolvem coloração amarelo-brilhante, enquanto o meio ao redor adquire tonalidade amarelo-claro. Essa alteração cromática é característica da espécie e semelhante ao padrão observado para *P. megaterium* nesse tipo de meio.

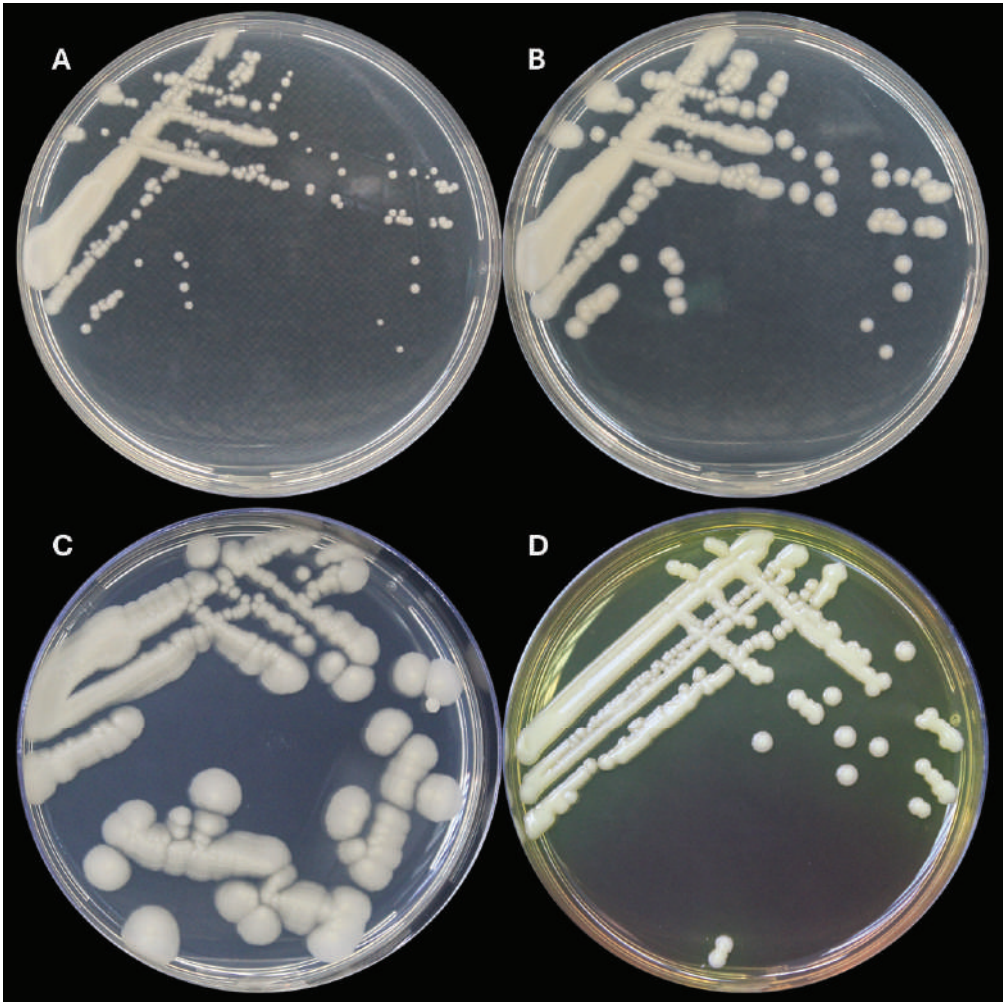



**Figura 18.** Aspecto das colônias de *Priestia aryabhattai* (ASN10) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Pseudomonas fluorescens*

Bactéria Gram-negativa, não formadora de esporos. Apresenta colônias lisas, brilhantes, de coloração esbranquiçada a ligeiramente verde. Quando exposta à luz UV, pode apresentar fluorescência devido à produção de pigmentos. A Figura 19 ilustra o aspecto das colônias de *Pseudomonas fluorescens* (ASN15) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 19-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, lisas, esbranquiçadas e translúcidas, típicas do estágio inicial da espécie. Na imagem 19-B, com 24 horas, observa-se crescimento mais expressivo, com colônias maiores, lisas, brilhantes e com coloração esbranquiçada. Na imagem 19-C, após 48 horas em TSA, as colônias mantêm aparência lisa, bordas bem definidas e coloração esbranquiçada a levemente esverdeada, sem formação de estruturas aéreas. A imagem 19-D mostra o crescimento após 48 horas em meio King B, visualizado sob luz UV, evidenciando a fluorescência verde característica da produção de pioverdina por *P. fluorescens*. O meio, que sob luz ambiente possui aspecto semelhante ao TSA, adquire esse brilho verde intenso sob luz UV devido à difusão do pigmento fluorescente no meio de cultura

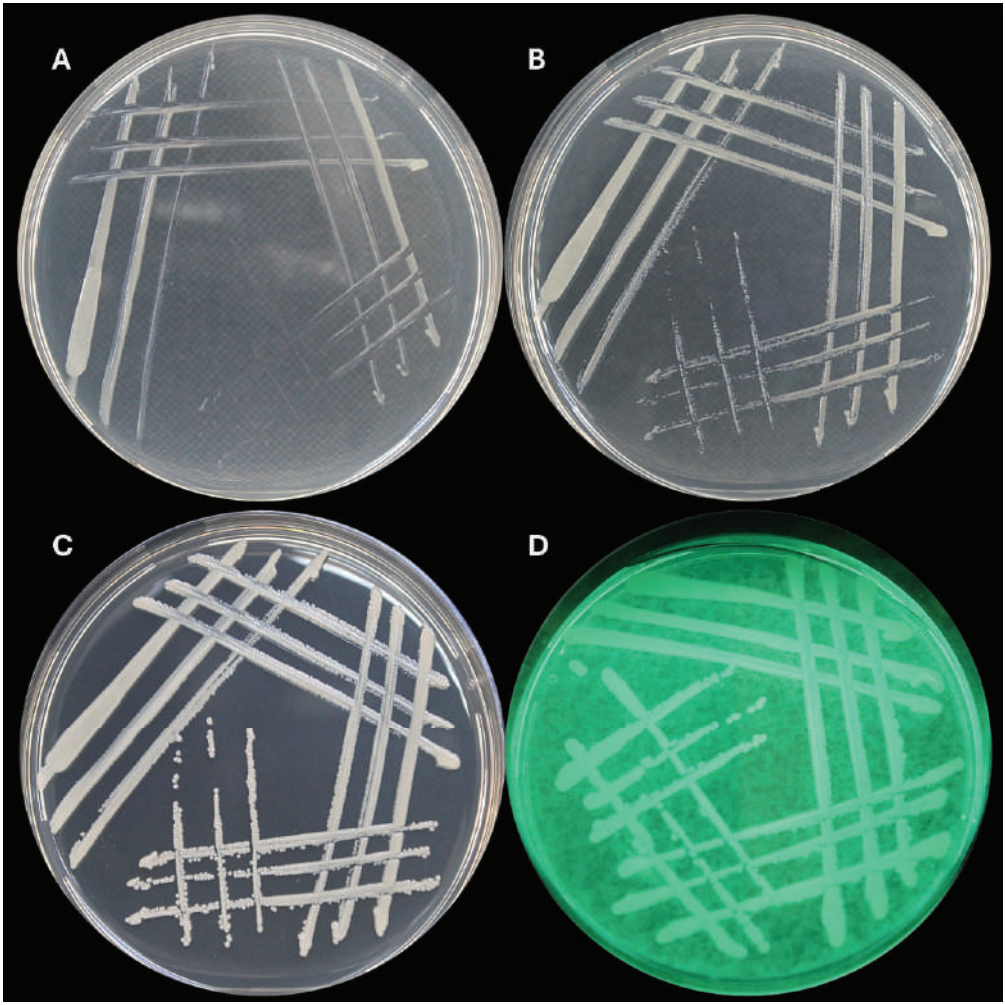



**Figura 19.** Aspecto das colônias de *Pseudomonas fluorescens* (ASN15) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Pseudomonas palleroniana*

Bactéria Gram-negativa, dotada de motilidade por flagelos polares. *Pseudomonas palleroniana* apresenta células menores e mais finas do que outras espécies de *Pseudomonas*. As colônias possuem aspecto liso, coloração esbranquiçada a creme e bordas regulares. Sua pigmentação é ligeiramente verde. A Figura 20 ilustra o aspecto das colônias de *Pseudomonas palleroniana* (ASN02) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 20-A mostra o crescimento após 16 horas em meio TSA, com colônias pequenas, translúcidas e discretas, refletindo o crescimento inicial. Na imagem 20-B, com 24 horas, observa-se maior número de colônias, pequenas, lisas, de coloração esbranquiçada a creme e bordas regulares. Na imagem 20-C, após 48 horas em TSA, as colônias tornam-se mais desenvolvidas, com crescimento linear ao longo das estrias, mantendo a coloração clara, aspecto liso e bordas bem definidas. A imagem 20-D mostra o crescimento após 48 horas em meio King B, visualizado sob luz UV, evidenciando fluorescência verde ao longo das estrias de crescimento. As colônias apresentam brilho contínuo e bem delimitado, com coloração verde característica da produção de pigmentos fluorescentes pela espécie. O meio de cultura, que em luz ambiente possui coloração semelhante ao TSA, adquire esse aspecto sob UV devido à interação dos pigmentos com a radiação ultravioleta.

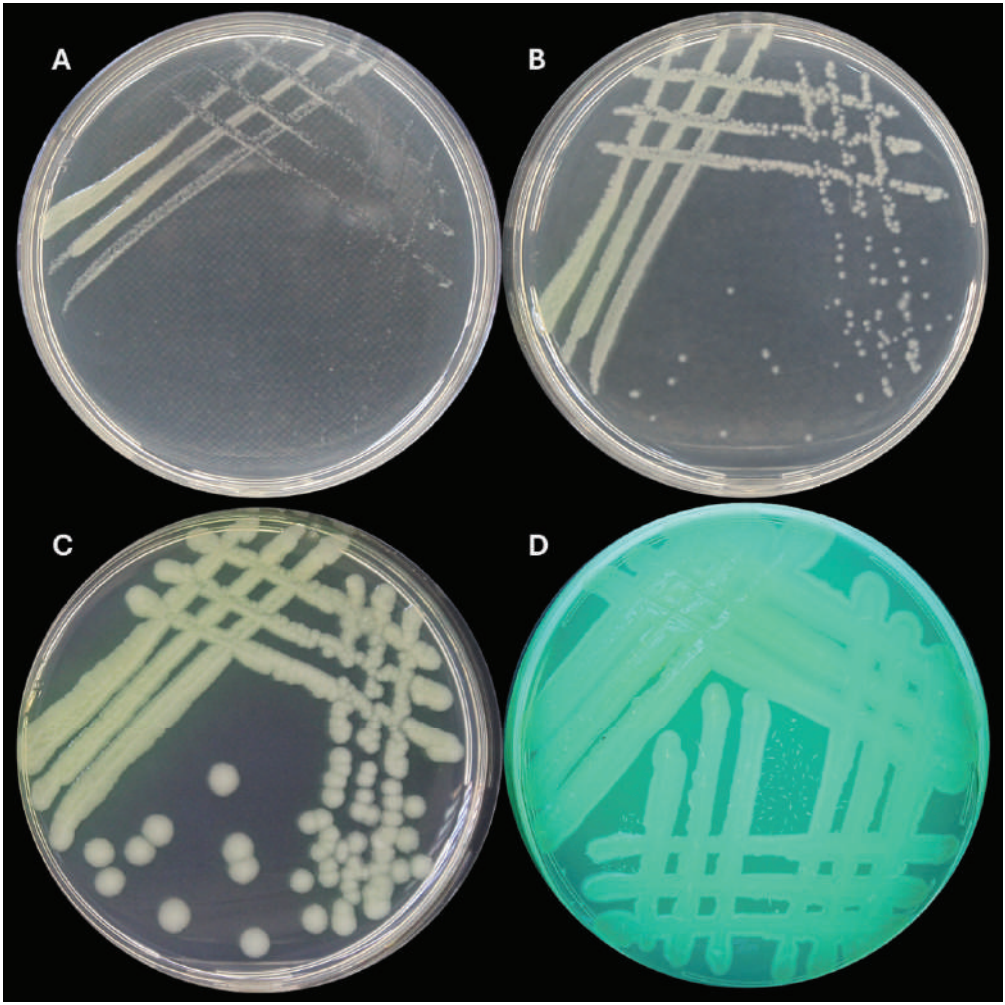



**Figura 20.** Aspecto das colônias de *Pseudomonas palleroniana* (ASN02) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Azospirillum brasilense*

Bactéria Gram-negativa com morfologia bacilar ligeiramente curva. Apresenta variações do aspecto da colônia, dependendo do meio de cultura. Em meio TSA, apresenta colônias arredondadas, lisas, translúcidas e de coloração rósea. A coloração das colônias pode exibir cor e morfologia distintas, de acordo com a cepa. Em meio vermelho congo (rojo congo – RC) adquire coloração vermelho marfim, o que facilita a identificação da colônia. Em geral, apresenta crescimento lento. A figura 21 ilustra o aspecto das colônias de *Azospirillum brasilense* (ASN11) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação. A imagem 21-A mostra o crescimento após 5 dias em meio TSA, com colônias redondas, lisas, translúcidas e de coloração esbranquiçada a rósea clara, com crescimento característico ao longo das estrias. Na imagem 21-B, com 12 dias de incubação, observa-se a intensificação da coloração rósea, mantendo o aspecto liso e bordas regulares. A imagem 21-C mostra o crescimento após 5 dias em meio vermelho congo (RC), no qual as colônias adquirem coloração vermelho-marfim, contrastando com o fundo avermelhado do meio, o que facilita a visualização e identificação da espécie.

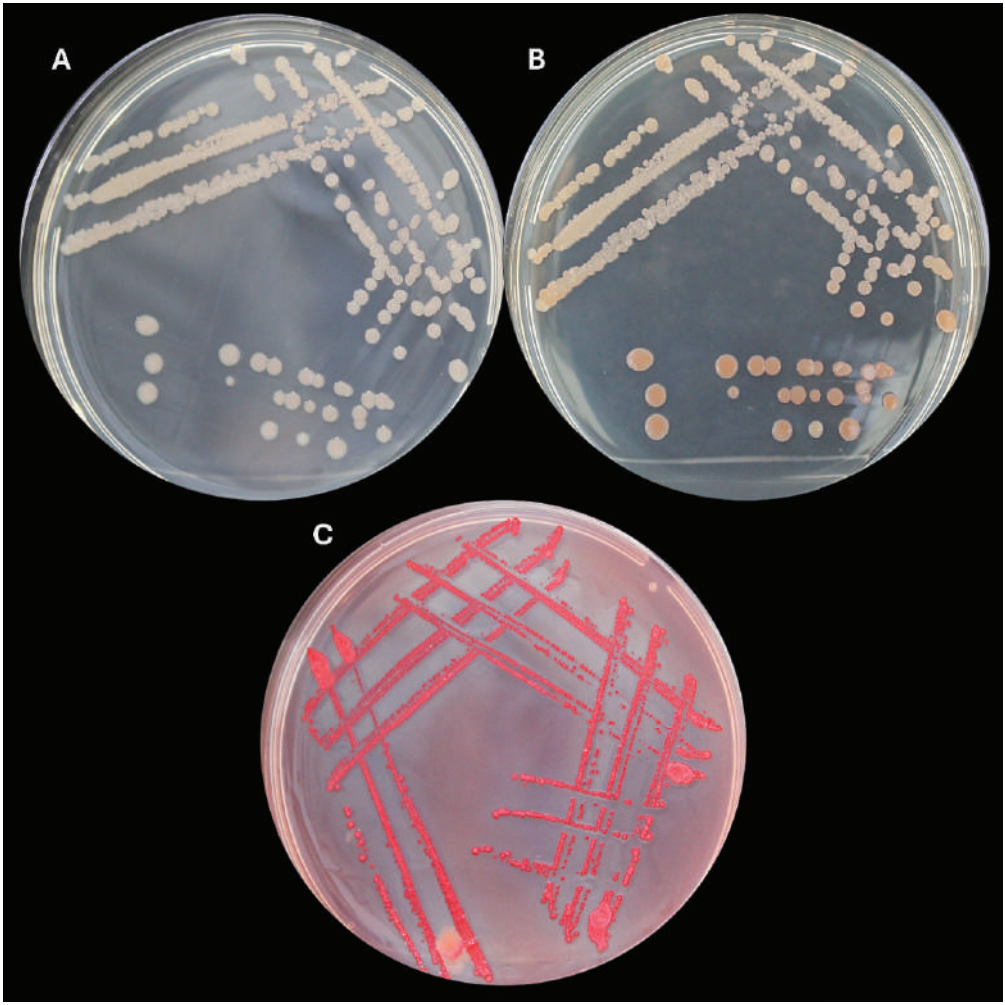



**Figura 21.** Aspecto das colônias de *Azospirillum brasilense* (ASN11) cultivadas em diferentes meios e tempos de incubação.

### *Bradyrhizobium japonicum*

Bactéria Gram-negativa em forma de bastonetes. As características das colônias variam de acordo com a estirpe. Em geral, o aspecto da colônia é leitoso, com colônias pequenas, translúcidas, e de coloração esbranquiçada. Apresenta crescimento lento em comparação com outras bactérias. A Figura 22 ilustra o aspecto das colônias de *Bradyrhizobium japonicum* (ASN21) cultivadas em meio YMA em diferentes tempos de incubação. A imagem 22-A mostra o crescimento após 5 dias, com colônias pequenas, translúcidas, de aspecto liso, leitoso e coloração esbranquiçada a creme, com crescimento concentrado nas estrias iniciais de inoculação. A imagem 22-B, após 12 dias de incubação, evidencia aumento discreto no número e no tamanho das colônias, mantendo bordas regulares e coloração que varia do creme ao bege-claro. O crescimento lento e o aspecto leitoso das colônias são características típicas da espécie.

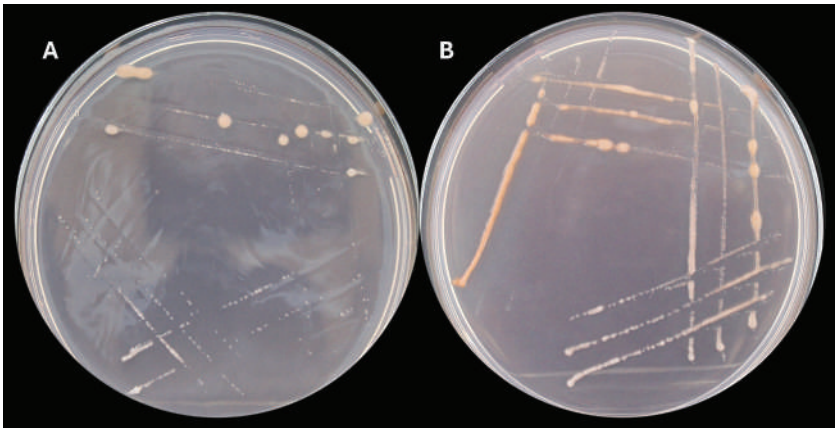



**Figura 22.** Aspecto das colônias de *Bradyrhizobium japonicum* (ASN21) cultivadas em meio YMA em diferentes tempos de incubação.

### *Chromobacterium subtsugae*

Bactéria Gram-negativa em forma de bastonetes, dotada de motilidade. Apresenta colônias pequenas, com texturas geralmente lisas, com bordas regulares e um brilho suave. A coloração roxa a violeta das colônias se deve à produção de violaceínas, cuja intensidade pode variar de acordo com as condições de cultivo, como a composição do meio de cultura e a disponibilidade de nutrientes. É de fácil identificação visual, se comparado as demais bactérias, devido à sua coloração única das colônias. A figura 23 ilustra o aspecto das colônias de *Chromobacterium subtsugae* (ASN04) cultivadas em diferentes tempos de incubação em meio TSA. A imagem 23-A mostra o crescimento após 16 horas, com colônias pequenas, lisas e translúcidas, sendo possível observar tanto colônias ainda esbranquiçadas quanto outras já iniciando a produção de pigmento, adquirindo tonalidade arroxeada. Na imagem 23-B, após 24 horas, observa-se crescimento mais expressivo, com aumento no número e no tamanho das colônias, e intensificação da coloração violeta ao longo das estrias. Na imagem 23-C, com 48 horas, as colônias apresentam coloração violeta escura bem definida, com aspecto brilhante e superfície lisa, característica da produção de violaceína. A imagem 23-D mostra um isolado não pigmentado, com colônias pequenas, opacas e de coloração branca a transparente, evidenciando a variação fenotípica na produção de pigmento dentro da espécie.

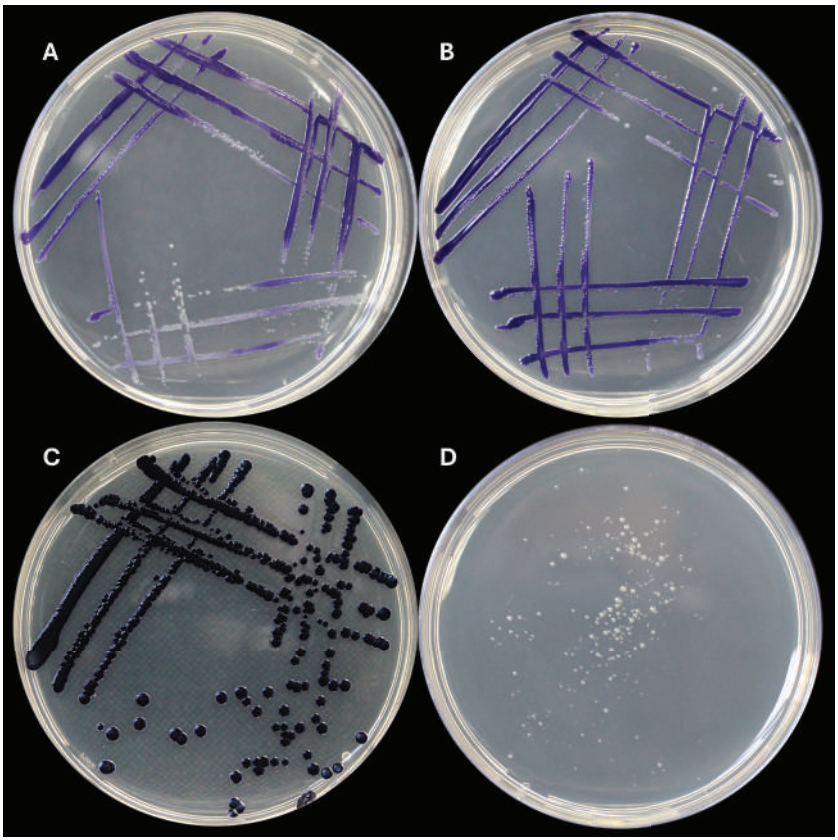



**Figura 23.** Aspecto das colônias de *Chromobacterium subtsugae* (ASN04) cultivadas em diferentes tempos de incubação em meio TSA.

### *Considerações finais*

As características culturais mencionadas anteriormente podem sofrer variações em função do isolado (isolados diferentes de uma mesma espécie de *Bacillus* podem apresentar características de colônia distintas), do meio de cultura, das condições de incubação, e do tempo de avaliação. Aqui foram ilustradas cepas pertencentes à Coleção de Culturas da Agrobiológica (ASN). Portanto, recomenda-se numa análise de multiplicados OnFarm a comparação do microrganismo multiplicado com a cepa utilizada como inóculo.

## Diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas por coloração de gram

A coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial amplamente utilizada na microbiologia para classificar as bactérias em dois grandes grupos: **Gram-positivas** e **Gram--negativas**. A distinção baseia-se nas diferenças estruturais da parede celular bacteriana. No procedimento, as bactérias são coradas inicialmente com cristal violeta e fixadas com iodo (lugol); em seguida, são submetidas a uma etapa de descoloração com álcool ou acetona. As bactérias Gram-positivas, que possuem parede celular espessa e rica em peptidoglicano, retêm o cristal violeta e aparecem roxas ao microscópio. Já as Gram-negativas, com parede mais fina e rica em lipopolissacarídeos, perdem o corante na descoloração e são coradas posteriormente com safranina, adquirindo coloração rosa ou avermelhada. Essa técnica é fundamental para a identificação preliminar de microrganismos e para orientar a escolha de meios de cultura e testes complementares.

***Procedimento***

- **Etapa 1:** Fixação da amostra em lâmina de microscopia. Esta é uma etapa fundamental para a realização da coloração de Gram, pois assegura a aderência das bactérias à superfície da lâmina e preserva suas estruturas durante as etapas de coloração e lavagem. Quando a amostra for obtida a partir de colônias cultivadas em placa de Petri, recomenda-se retirar uma pequena porção da colônia com uma **alça de inoculação estéril** e transferi-la para um tubo contendo **9 mL de solução salina a 0,85% estéril**. A suspensão deve ser **homogeneizada utilizando um vórtex**, garantindo a distribuição uniforme dos microrganismos. Em seguida, aplica-se **uma gota da suspensão sobre uma**

**lâmina limpa**, espalhando cuidadosamente para formar uma película fina, que deve ser deixada secar ao ar. A fixação é então realizada por meio de **calor indireto** com a face da amostra voltada para cima, passando rapidamente a lâmina sobre a chama de uma lamparina ou bico de Bunsen por algumas vezes até a secagem completa e evitando o superaquecimento (Figura 24). Esse processo evita a perda da amostra durante a coloração e contribui para a obtenção de resultados nítidos e confiáveis na observação microscópica.

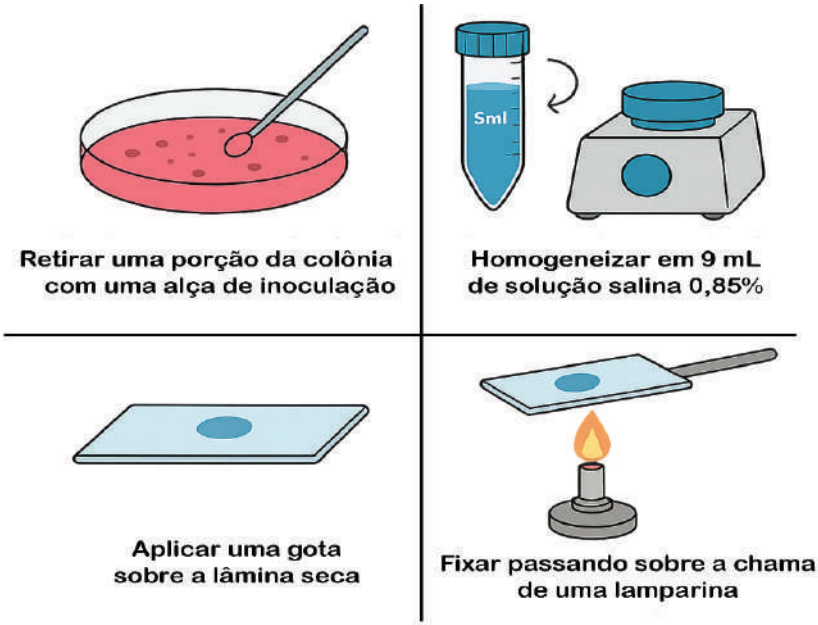



**Figura 24.** Etapas para preparação de esfregaço bacteriano a partir de colônias cultivadas em placa de Petri, incluindo homogeneização em solução salina, aplicação em lâmina e fixação térmica para posterior coloração de Gram.

- **Etapa 2:** Depositar uma alíquota de **Cristal violeta (violeta genciana a 1%)** sobre a lâmina, cobrindo o esfregaço por 1 minuto. Lavar a lâmina com auxílio de uma pisseta contendo água destilada.
- **Etapa 3:** Depositar uma alíquota de solução **Lugol (solução de iodo a 1% com iodeto de potássio a 2%)** sobre a lâmina e aguardar por 1 minuto. Lavar a lâmina com auxílio de uma pisseta contendo água destilada.
- **Etapa 4:** Adicionar uma alíquota de **Álcool etílico (etanol 95%)** sobre a lâmina e aguardar por 30 segundos para realizar a etapa de descoloração. Lavar a lâmina com auxílio de uma pisseta contendo água destilada.
- **Etapa 5:** Depositar uma alíquota de solução **Safranina** ou **Fucsina (0,5%)** para cobrir o esfregaço por 1 minuto, em seguida, lavar a lâmina com auxílio de uma pisseta contendo água destilada (Figura 25).

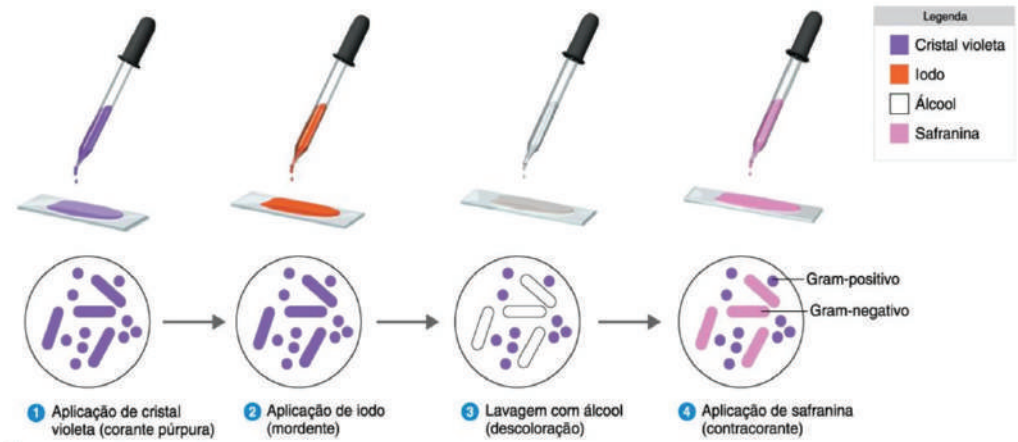



**Figura 25.** Esquema Coloração de Gram. Fonte: USP, 2023.

Ao final do processo, deve-se levar a lâmina para análise em microscópio óptico. Se necessário, utilizar óleo de imersão. As células Gram-positivas apresentam coloração violeta e as Gram-negativas apresentam coloração rosa avermelhada.

## Identificação molecular de fungos e bactérias

A identificação molecular de fungos e bactérias tem se consolidado como uma ferramenta essencial para a caracterização precisa de microrganismos em contextos ambientais, clínicos, industriais e agrícolas. Para bioinsumos microbiológicos, especialmente os produzidos OnFarm, esse tipo de análise permite confirmar a identidade do microrganismo de interesse e detectar possíveis contaminantes não perceptíveis por métodos morfológicos ou bioquímicos.

A base da identificação molecular está na análise de sequências específicas do DNA microbiano, que funcionam como "impressões digitais genéticas". Os genes ou regiões-alvo mais utilizados são altamente conservados dentro de um grupo, mas com variações suficientes para permitir discriminação entre gêneros e espécies.

Regiões genéticas comumente utilizadas:

- **Bactérias**: A região mais amplamente utilizada é o gene 16S rRNA, que codifica o RNA ribossomal 16S. Ele possui regiões conservadas (para ancoragem de primers) e regiões hipervariaveis (úteis para diferenciação entre espécies). Em alguns casos, genes adicionais como gyrB, rpoB, atpD e gyrA são empregados para análises filogenéticas mais refinadas ou identificação intraespecífica.

- **Fungos filamentosos e leveduras:** A identificação fúngica com base em DNA geralmente utiliza a região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), que compreende os espaçadores ITS1 e ITS2 flanqueando o gene 5.8S do RNA ribossomal. Esta região é o marcador fúngico padrão aceito por consórcios internacionais (ex.: UNITE). Para identificação mais precisa, especialmente em gêneros como *Trichoderma*, genes adicionais como TEF1-α (elongation factor 1-alpha), β-tubulina e RPB2 são frequentemente analisados.

Uma abordagem moderna e sensível é o uso da PCR em tempo real (qPCR), que permite não apenas detectar, mas também quantificar microrganismos com base em DNA, por meio de primers e sondas específicas. Essa técnica é especialmente útil para monitorar a presença de cepas específicas em misturas microbianas ou verificar a identidade de culturas em tempo reduzido, com alta especificidade. Além disso, o uso de primers específicos permite distinguir entre espécies muito próximas ou identificar apenas o microrganismo-alvo, sem amplificar contaminantes.

**Observação:**

A adoção de métodos de identificação molecular de fungos e bactérias diretamente na fazenda, pelo próprio agricultor, ainda é limitada por uma série de fatores técnicos, econômicos e operacionais. Um dos principais obstáculos está na necessidade de infraestrutura laboratorial especializada. Além disso, esses métodos exigem o uso de reagentes sensíveis e de alto custo, como enzimas, primers específicos e kits de extração de DNA, muitos dos quais requerem condições rigorosas de armazenamento e têm vida útil limitada. Outro desafio importante é o conhecimento técnico necessário para realizar e interpretar análises moleculares com precisão.

Além disso, o custo por amostra tende a ser elevado em sistemas de pequena escala, tornando essas análises economicamente inviáveis para uso rotineiro na fazenda. Por essas razões, a identificação molecular de microrganismos em bioinsumos OnFarm ainda depende, na maioria dos casos, de parcerias com laboratórios especializados ou de instituições de pesquisa.

Como alternativa viável, muitos produtores têm investido em laboratórios básicos para análises morfológicas e culturais, utilizando testes rápidos para triagem inicial e enviando amostras específicas para análise molecular apenas quando necessário, de forma mais estratégica e acessível.

# Referências

BALDANI, V. L. D.; ANDRADE, V. D. O.; NEVES, M.; BARBOSA, A.; PEIXOTO, R.; OLIVEIRA, E. C. R. de. Manual de soluções e reagentes da Embrapa Agrobiologia. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 1998.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrucao Normativa SDA n. 14, de 13 de abril de 2018. Altera os arts. 4o, 21, 35 e o Anexo da Instrucao Normativa SDA n. 30, de 12 de novembro de 2010. Diario Oficial da Uniao, Brasilia, DF, 16 abr. 2018. Secao 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Manual de metodologias de bioinsumos. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: https://wikisda. agricultura.gov.br/pt-br/Laborat%C3%B3rios/Metodologia/Bioinsumos/ Bioinsumos_Manual. Acesso em: 22 abr. 2026.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrucao Normativa SDA n. 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os metodos oficiais para analise de inoculantes, sua contagem, identificacao e analise de pureza. Diario Oficial da Uniao, Brasilia, DF, 17 nov. 2010. Secao 1.

CROUS, P. W.; HAWKSWORTH, D. L.; WINGFIELD, M. J. Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. Annual Review of Phytopathology, v. 53, n. 1, p. 247–267, 2015.

DAS, S.; DASH, H. R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S. Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. Journal of Microbiological Methods, v. 103, p. 80–100, 2014.

DA SILVA ROMEIRO, R. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, MG: UFV, 2001.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes. Brasília, DF: Embrapa, 2024.

INDEX FUNGORUM. Disponível em: https://www.indexfungorum.org/. Acesso em: 6 nov. 2024.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; SILVA, E. Y. Y. da; GARCIA, A. R.; GOMES, A. C. M. M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2020.

ROESCH, L. F. W. Ocorrência e distribuição de bactérias diazotróficas associadas a cultivares de milho. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, 2003.

SCHOCH, C. L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford), 2020, baaa062. Disponível em: https:// pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761142/. Acesso em: 6 nov. 2024.

TSUI, C. K. et al. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. IMA Fungus, v. 2, n. 2, p. 177–189, 2011.

# 4
CAPÍTULO

# Quantificação de microrganismos

A quantificação de microrganismos é uma etapa fundamental em microbiologia, pois permite a determinação do número de células presentes em uma amostra. Essa quantificação pode ser realizada por diferentes métodos, cada um com suas especificidades e aplicações. Dentre os principais estão: cultivo em meio de cultura seguido de contagem de UFC e contagem em Câmara de Neubauer.

## 4.1. Unidade formadora de colônias (ufc)

Unidade formadora de colônia (UFC) é uma unidade de medida usada para estimar o número de bactérias ou fungos viáveis, isto é, capazes de se multiplicar. Ao diluir uma amostra de microrganismos e espalhá-la por uma placa de Petri

com um meio rico em nutrientes, após um certo período de incubação, realiza-se a contagem de colônias presentes na placa. Considera-se que cada colônia tenha crescido a partir de uma célula microbiana, ou seja, de uma unidade formadora de colônia (UFC) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2016.).

## Etapa 1: *Diluição seriada*

A diluição seriada é uma técnica em que se realizam diluições sucessivas de uma solução concentrada para obter soluções com concentrações progressivamente menores. O processo envolve a transferência de uma alíquota da solução diluída de uma etapa para a próxima, utilizando-a como fonte de diluição para o passo seguinte.

Para realizar o procedimento, adiciona-se 1 mL da suspensão concentrada (amostra do multiplicado OnFarm) a um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina 0,85% mais Tween 80 0,1% estéril, nomeando-o como tubo (-1). Após a agitação para homogeneizar o conteúdo, 1 mL dessa mistura é transferido para o tubo seguinte, contendo 9 mL de solução salina mais Tween 80 estéril, repetindo-se o processo até atingir a diluição desejada.

Cada etapa requer homogeneização em vortex por, no mínimo, 20 segundos antes da transferência, assegurando uma suspensão uniforme e representativa. As ponteiras devem ser substituídas a cada tubo, evitando contaminações cruzadas entre as diluições (Figura 26).

Todo o processo de diluição seriada e plaqueamento deve ser conduzido em câmara de fluxo laminar devidamente higienizada, a qual deve ter passado por procedimento de desinfecção com álcool etílico 70% (v/v) em todas as superfícies internas, seguido de exposição à radiação ultravioleta (UV) por, no mínimo, 15 minutos. Essas etapas são essenciais para assegurar condições assépticas e minimizar o risco de contaminações durante a manipulação das amostras microbiológicas.

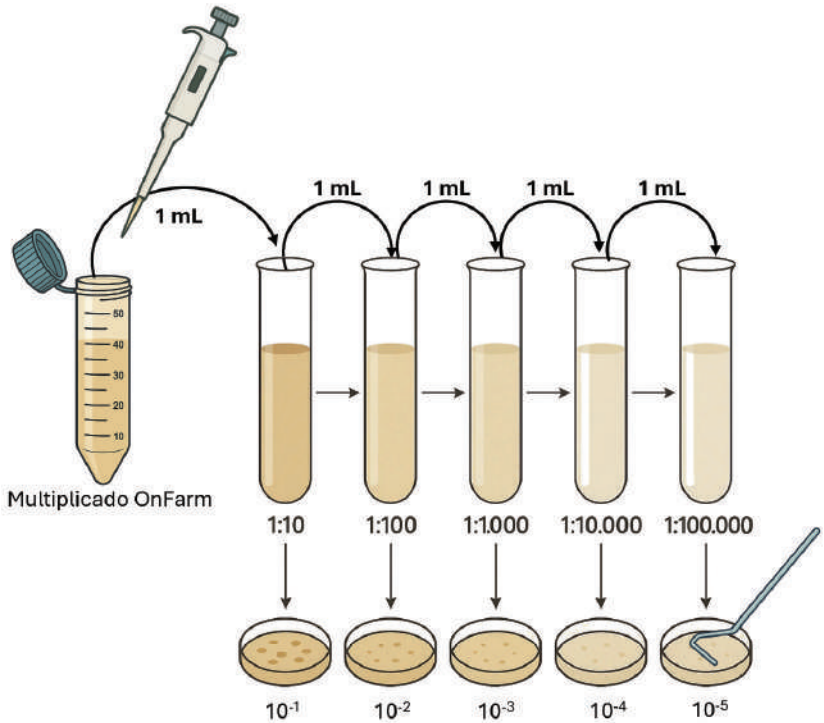



**Figura 26.** Esquema do processo de diluição seriada e plaqueamento.

## Etapa 2: *Plaqueamento via Método de espalhamento*

- ***Aplicação da Suspensão:*** Para iniciar o processo de plaqueamento, será transferido 100 µL da suspensão proveniente de cada tubo de ensaio para placas de Petri previamente vertidas com o meio de cultura adequado. Esse volume deverá ser distribuído cuidadosamente sobre a superfície do meio (Figura 26).
- ***Espalhamento da Amostra:*** A dispersão da suspensão na superfície da placa será realizada com uma alça de Drigalski descartável ou de vidro. A alça de vidro deve ser previamente mergulhada em álcool 70% e esterilizada por

flambagem na chama do bico de Bunsen. Após a flambagem, deve-se aguardar alguns segundos para que a alça esfrie, evitando a inativação dos microrganismos durante o espalhamento. A alça deve ser utilizada com movimentos suaves e uniformes, realizando aproximadamente 5 passagens sobre a superfície da placa para garantir uma distribuição homogênea da amostra, evitando excesso de pressão que possa danificar o meio de cultura.

- ***Secagem e Incubação:*** Após o espalhamento da amostra, as placas devem permanecer em repouso por aproximadamente 10 minutos, em condições assépticas, dentro da câmara de fluxo laminar, para permitir a completa absorção e secagem do inóculo sobre o meio de cultura. Assim que secas, elas serão transferidas para a incubadora, onde permanecerão em condições controladas de temperatura e tempo, específicos para o tipo de microrganismo a ser analisado. O tempo e a temperatura de incubação variam de acordo com a natureza dos microrganismos, visando garantir um crescimento adequado e a formação de colônias.

***Observação 1:***

É altamente recomendado que o plaqueamento de cada diluição seja realizado em três placas de Petri, de forma independente, para garantir reprodutibilidade e precisão na contagem das colônias formadas. Quando o objetivo for comparação estatística ou avaliação de repetibilidade, recomenda-se a execução em duplicata, ou seja, repetir o conjunto de diluições e plaqueamentos completos uma segunda vez. Essa prática aumenta a confiabilidade dos resultados e permite detectar eventuais variações técnicas no processo.

***Observação 2:***

É altamente recomendado incluir controles negativos e positivos incubados sob as mesmas condições experimentais:

- **Controle negativo:** duas placas contendo apenas o meio de cultura, uma placa exposta ao ar no fluxo laminar e três placas contendo apenas a solução salina estéril espalhada.
- **Controle positivo:** placas inoculadas com o microrganismo-alvo de referência.

Esses controles permitem verificar a esterilidade do processo e a validade do crescimento microbiano nas amostras testadas.

## Etapa 3: *Tempo de incubação*

O tempo de incubação de cada microrganismo pode variar dependendo das condições específicas de cultivo, como a composição do meio, temperatura e umidade (Tabelas 11 e 12).

**Tabela 11.** Microrganismos, meios de cultivo, tempo de incubação e temperatura.

| ***Microrganismo*** | **Meio de cultura** | **Tempo de incubação** | **Temperatura** |
|---|---|---|---|
| *B. bassiana* | Ágar Batata Dextrose (BDA) | 4 - 7 dias | 24ºC – 26ºC |
| *M. anisopliae* | Ágar Batata Dextrose (BDA) | 4 - 7 dias | 24ºC – 26ºC |
| *C. fumosorosea* | Ágar Batata Dextrose (BDA) | 5-12 dias | 24ºC – 26ºC |
| *P. lilacinus* | Ágar Batata Dextrose (BDA) | 3-14 dias | 24ºC – 26ºC |
| *T. asperellum* | Ágar Batata Dextrose (BDA) | 3 - 5 dias | 24ºC – 26ºC |

**Tabela 12.** Microrganismos, meios de cultivo, tempo de incubação e temperatura.

| ***Microrganismo*** | **Meio de cultura** | **Tempo de incubação** | **Temperatura** |
|---|---|---|---|
| *B. amyloliquefaciens* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *B. velezensis* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *B. licheniformis* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *B. pumilus* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *B. thuringiensis* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *P. megaterium* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *P. aryabhattai* | Ágar Triptona de Soja – TSA HiCrome Bacillus Agar | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |
| *P. fluorescens* | Ágar Triptona de Soja – TSA Ágar King B | 2 a 4 dias | 28ºC – 30ºC |
| *P. palleroniana* | Ágar Triptona de Soja – TSA Ágar King B | 2 a 4 dias | 28ºC – 30ºC |
| *A. brasilense* | Ágar Triptona de Soja – TSA Vermelho Congo (RC) | 4 - 7 dias | 28ºC – 30ºC |
| *B. japonicum* | Yeast Mannitol Ágar - YMA | 5 - 10 dias | 28ºC – 30ºC |
| *C. subtsugae* | Ágar Triptona de Soja – TSA | 24h-48h | 28ºC – 30ºC |

**Fonte:** EMBRAPA, 2024.

## Etapa 4: *Contagem das Colônias*

Após a incubação das placas de Petri, é possível observar o surgimento de colônias. Cada colônia se origina de uma única célula bacteriana ou fúngica que se multiplicou no meio de cultura, formando uma Unidade Formadora de Colônia (UFC).

A contagem é realizada visualmente, utilizando uma lupa ou contador de colônias. Para garantir uma contagem precisa, recomenda-se contar placas que apresentem entre **30 e 300 colônias**. Placas com menos de 30 colônias são consideradas estatisticamente imprecisas, enquanto aquelas com mais de 300 podem apresentar contagem excessiva, dificultando a precisão.

Além disso, é fundamental observar a proporcionalidade entre as placas das diferentes diluições. Espera-se uma redução progressiva e coerente no número de colônias conforme a diluição aumenta. Desvios dessa proporcionalidade podem indicar falhas na técnica de diluição, contaminação cruzada ou imprecisão na homogeneização, comprometendo a confiabilidade do resultado final.

**Cálculo da Concentração em UFC/mL*:***

Para calcular a concentração de UFC por mL da amostra original, aplica-se a fórmula:

**UFC/mL = número médio de colônias na placa × fator de diluição × 10***

O fator de diluição depende do grau de diluição da amostra. *A multiplicação por 10 ocorre porque foram plaqueados apenas 100 µL da amostra (0,1 mL), e o ajuste converte o valor para mL.

- **Exemplo 1**: Se foram contadas 50 colônias na placa referente à diluição $10^{-7}$, o cálculo seria:

$$50 \times 10^{7} \times 10 = 5{,}0 \times 10^{9}\ \text{UFC/mL}$$

Esse resultado indica que há 5,0 bilhões de UFCs por mL na amostra original.

- **Exemplo 2:** Em uma análise, a contagem média de três placas foi 35 UFC/placa, na diluição $10^6$, então:

**Média = 35**
**Fator de correção = 10**
**Diluição da leitura = $10^6$**
**nº de bactérias viáveis = $35 \times 10 \times 10^6 = 3{,}5 \times 10^8$ UFC/g ou mL**

Este método é essencial em microbiologia para determinar a carga microbiana em amostras e é amplamente utilizado em estudos de qualidade microbiológica.

## 4.1.1. Quantificação de esporos bacterianos

A quantificação de esporos bacterianos pode ser realizada por meio da aplicação de um tratamento térmico controlado, que visa eliminar células vegetativas termossensíveis, preservando apenas estruturas esporuladas viáveis. Este procedimento permite estimar com maior precisão a população de esporos presentes na amostra, sendo particularmente útil em formulações à base de *Bacillus* spp. ou em produtos armazenados por longos períodos.

### Etapa 1: *Aquecimento da amostra*

Retirar uma alíquota de 1 mL da amostra (ou da primeira diluição decimal), acondicionar em microtubo tipo Eppendorf e submeter a 80 °C por 12 minutos em placa aquecedora ou banho-maria.

### Etapa 2: *Resfriamento rápido*

Após o aquecimento, transferir imediatamente o tubo para um banho de gelo e manter por 5 minutos, com o objetivo de interromper o tratamento térmico e preservar a viabilidade dos esporos.

### Etapa 3: *Diluição seriada e plaqueamento*

Proceder com as diluições seriadas da amostra tratada conforme descrito anteriormente. Utilizar meio de cultura apropriado para o microrganismo de interesse, como TSA ou HiCrome *Bacillus* Agar.

### Etapa 4: *Incubação e contagem*

Incubar as placas a 30 °C por 24 a 48 horas. As colônias obtidas após o choque térmico correspondem exclusivamente a esporos viáveis, já que as células vegetativas não resistem ao tratamento térmico.

## 4.2. Câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer, ou hemocitômetro, é um dispositivo microscópico utilizado para a contagem precisa de células, como células bacterianas e esporos de fungos. Com dois campos de contagem, cada um subdividido em quadrantes, permite a quantificação de diferentes tipos celulares, facilitando a análise em laboratórios de microbiologia. Este método é essencial para determinar a concentração de microrganismos em amostras, sendo uma técnica padrão em microbiologia.

Antes de iniciar o processo de diluição seriada, verificar se as amostras estão em temperatura ambiente. Caso não estejam, deixá-las por no mínimo 40 minutos em temperatura ambiente antes do início da análise.

## Etapa 1: *Diluição seriada*

Para esta etapa, seguir as orientações descritas no item 4.1 (***Etapa 1: Diluição seriada)*** e ilustrada na Figura 26).

## Câmara de Neubauer

## Etapa 2: *Preparação da Câmara de Neubauer*

Colocar a câmara de Neubauer sobre uma superfície plana e, em seguida, deposite uma lamínula na área designada. Utilizar lamínulas especiais que garantam a profundidade correta da câmara.

## Etapa 3: *Adição da amostra na Câmara de Neubauer*

Coletar a amostra previamente diluída e pipetar 10 μL da suspensão na câmara de Neubauer, evitando o transbordamento. Aguardar 5 minutos para permitir que as células se sedimentem antes da contagem.

## Etapa 4: *Microscópio*

Iniciar a observação com a objetiva de menor aumento (4x) e aumentar conforme necessário até a objetiva de 40x para contagem das células. Para reduzir erros de contagem, utilizar um padrão de contagem em zigue-zague, contabilizando as células que estão sobre as linhas escolhidas.

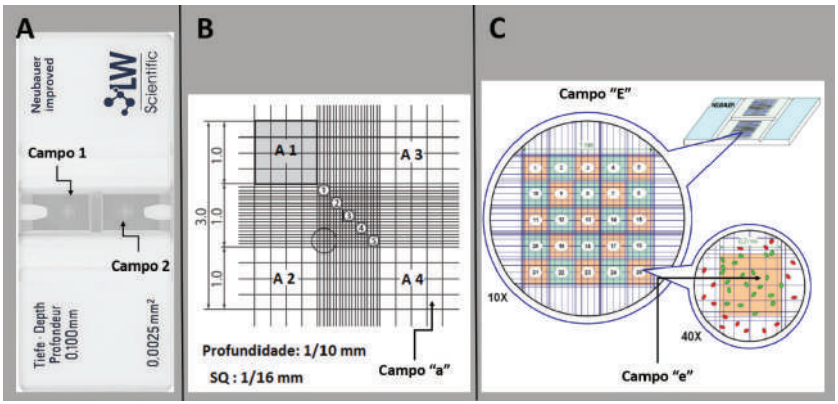



**Figura 27.** Divisão da câmara de Neubauer. **A-** Os dois campos utilizados para a contagem de células, **B-** O campo "A" possui 0.1 $mm^3$, sendo dividido em 16 quadrantes "a", o campo "a" possui um volume de $6.25 \times 10^{-3}$ $mm^3$ e **C-** Campo "E" que fica na parte central dos campos 1 e 2. O campo 'E" é dividido em 25 campos e cada um destes campos por sua vez são divididos em 16 quadrantes, cada um destes quadrantes "e" possui um volume de $2.5 \times 10^{-4}$ $mm^3$.

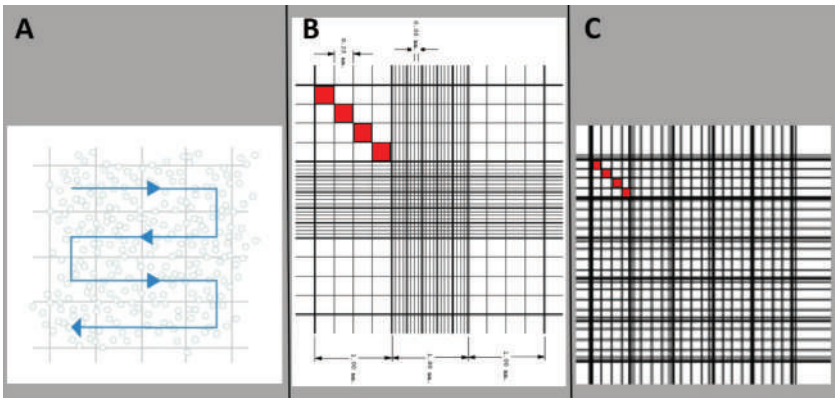



**Figura 28.** Contagem de células em câmara de Neubauer. **A-** O processo de contagem deve ser em zigue-zague. Quando as células estiverem sobre as linhas que dividem os quadrantes, contar as células sobre a linha acima e a direita, descartando as que estiverem sobre a linha de baixo e a esquerda; **B-** Para as células grandes, contar os quatro campos "a" e fazer a média das quatro contagens e **C-** Para as células pequenas contar os quatro campos "e" e fazer a média das quatro contagens.

## Etapa 5: *Cálculo dos Resultados*

Para esporos/conídios de fungos, conte em quatro campos "A" e utilize a fórmula:

**Células $mL^{-1}$ = média dos 4 campos "A" × 1,0 × $10^4$ × fator de diluição**

Para *Bacillus* e actinobactérias, conte em quatro campos "a":

**Células $mL^{-1}$ = média dos 4 campos "a" × 1,6 × $10^5$ × fator de diluição.**

Para demais bactérias, conte em quatro campos "e":

**Células $mL^{-1}$ = média dos 4 campos "e" × 4,0 × $10^6$ × fator de diluição**

**Exemplo*:***

- Contagem nos quatro campos "A" para esporos/conídios utilizando a diluição $10^{-2}$:

Campo A1: 15
Campo A2: 20
Campo A3: 18
Campo A4: 17

- Calcular a média dos quatro campos:

*Média "A"* = (15 + 20 + 18 + 17) / 4
*Média "A"* = 17,5

- Aplicar a fórmula:

Células $mL^{-1}$ = *média "A"* × 1,0 × $10^4$ × *fator de diluição*

Neste caso, se a diluição é $10^{-2}$, então o fator de diluição será o inverso, ou seja, $10^2$ (ou 100).

*Células* $mL^{-1}$ = 17,5 × 1,0 × $10^4$ × $10^2$

*Células* $mL^{-1}$ = 1,75 × $10^7$

# Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Manual de metodologias de bioinsumos. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Laborat%C3%B3rios/Metodologia/Bioinsumos/Bioinsumos_Manual. Acesso em: 22 abr. 2026.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrucao Normativa SDA n. 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelece os metodos oficiais para analise de inoculantes, sua contagem, identificacao e analise de pureza. Diario Oficial da Uniao, Brasilia, DF, 17 nov. 2010. Secao 1.

DA SILVA ROMEIRO, R. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa, MG: UFV, 2001.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes. Brasília, DF: Embrapa, 2024.

MADIGAN, M. T.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; SATTLEY, W. M.; STAHL, D. A. Brock biology of microorganisms. 16th ed. New York: Pearson, 2020.

MONNERAT, R.; MONTALVÃO, S. C.; MARTINS, E. S.; QUEIROZ, P. R.; SILVA, E. Y. Y. da; GARCIA, A. R.; GOMES, A. C. M. M. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus para uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020. (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 369).

PINTO, Z. V.; LUCON, C. M. M.; BETTIOL, W. Controle de qualidade de produtos biológicos à base de Trichoderma. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. da (ed.). Trichoderma: uso na agricultura. Brasília, DF: Embrapa, 2019. p. 275–295. ISBN 978-85-7035-943-8.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 6. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2021.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; BAIR III, W. B.; WEBER, D.; FUNKE, B. R. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2024.

# Considerações Finais

As análises microbiológicas aplicadas à produção On-Farm devem evoluir continuamente em consonância com os avanços técnicos e regulatórios. Nesse contexto, destaca-se que o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) lançou, em 2025, o Manual de Metodologias de Bioinsumos, com o objetivo de estabelecer diretrizes padronizadas para metodologias de análise na área de microbiologia agrícola, voltadas especialmente aos bioinsumos e destinadas aos laboratórios oficiais e credenciados da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. Trata-se de um documento de referência essencial para a garantia da qualidade, confiabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos. Dessa forma, todas as metodologias empregadas — inclusive as apresentadas neste manual — devem estar em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo MAPA, sendo indispensável a consulta contínua ao documento oficial, disponível em: https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Laborat%C3%B3rios/Metodologia/Bioinsumos/Bioinsumos_Manual

# Glossário

***Termos técnicos de microbiologia aplicados à produção OnFarm***

Este glossário reúne os principais termos técnicos utilizados ao longo do manual, organizados em ordem alfabética. Para facilitar o entendimento dos conceitos morfológicos mais visuais, o glossário inclui cinco ilustrações que acompanham os termos relacionados a estruturas de fungos, formatos de esporos e conídios, tipos de hifa e padrões de ramificação dos conidióforos.

## A

**Agente biológico**. Organismo vivo (fungo, bactéria, vírus) utilizado para controlar pragas, doenças ou promover crescimento vegetal.

**Ágar**. Substância gelatinosa obtida de algas marinhas, utilizada para solidificar meios de cultura em microbiologia.

**Alíquota**. Pequena porção retirada de uma amostra maior para análise ou procedimento laboratorial.

**Asséptico**. Livre de microrganismos. Um ambiente ou procedimento asséptico é aquele conduzido de forma a evitar contaminação.

**Asseptado**. Que não possui septos, ou seja, sem divisões internas. Ver ilustração em "Septada vs asseptada".

**Autoclavagem**. Processo de esterilização por calor úmido sob pressão, geralmente realizado a 120–121 °C, utilizado para eliminar microrganismos de meios de cultura, vidrarias e outros materiais.

**Aveludada**. Textura de colônia com aspecto compacto e macio, como um veludo, típica de fungos com micélio curto e denso (por exemplo, *Metarhizium*).

# B

**Bactérias Gram-negativas**. Bactérias cuja parede celular possui uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos. Na coloração de Gram, adquirem cor rosa ou avermelhada. Ver Figura 25, no Capítulo 3.

**Bactérias Gram-positivas**. Bactérias com parede celular espessa, rica em peptidoglicano. Na coloração de Gram, retêm o corante cristal violeta e aparecem roxas ao microscópio. Ver Figura 25, no Capítulo 3.

**Bastonete**. Formato alongado e cilíndrico de células bacterianas, típico de gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Priestia*. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

**Bioinsumo**. Produto de origem biológica (microrganismos, extratos ou substâncias derivadas) utilizado na agricultura para manejo de pragas, doenças, nutrição vegetal ou estímulo ao crescimento.

**Biofilme**. Comunidade de microrganismos aderidos a uma superfície, envolvidos por uma matriz extracelular que os protege e ajuda na sobrevivência.

***Ilustração 1 — Formatos de esporos e células***




**Ilustração 1.** Principais formatos de esporos, conídios e células microbianas citados no manual.

## C

**Cadeia (conídios em)**. Arranjo em que os conídios são produzidos em sequência linear, um após o outro, como acontece em *Metarhizium anisopliae*. Ver ilustração em "Cadeia vs massa".

**Célula conidiogênica**. Célula especializada dos fungos responsável pela formação dos conídios (esporos assexuais). A fiálide é um tipo de célula conidiogênica.

**Célula vegetativa**. Forma ativa e em crescimento de uma bactéria ou fungo, em contraste com a forma de esporo (dormente).

**Cenocítica.** Hifa asseptada, sem divisões internas, com vários núcleos em um mesmo compartimento. Ver ilustração em "Septada vs asseptada".

**Cepa**. Linhagem específica de um microrganismo, geralmente isolada de um ambiente particular e mantida em coleção. Duas cepas da mesma espécie podem ter características distintas.

**Cilíndrico**. Formato alongado com laterais paralelas, como um pequeno cilindro. Comum em conídios de *Metarhizium*. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

**Clamidósporo**. Esporo de resistência produzido por alguns fungos, com parede espessa, que permite sobrevivência em condições ambientais adversas. Típico de *Trichoderma*. Ver ilustração em "Estruturas fúngicas".

**Colônia**. Aglomerado visível de microrganismos formado a partir da multiplicação de uma única célula em meio de cultura sólido.

**Coloração de Gram**. Técnica de coloração diferencial que permite classificar bactérias em Gram-positivas e Gram-negativas com base na estrutura da parede celular. Ver Figura 25, no Capítulo 3.

**Conídio**. Esporo assexual produzido por fungos, responsável pela reprodução e dispersão. Ver ilustração em "Estruturas fúngicas".

**Conidióforo**. Estrutura do fungo que sustenta e produz os conídios. Funciona como a "haste" que carrega as células conidiogênicas. Ver ilustração em "Estruturas fúngicas".

**Contaminante**. Microrganismo indesejado presente em uma cultura ou bioinsumo, que não é o microrganismo-alvo e pode comprometer a qualidade do produto.

**Controle biológico**. Uso de organismos vivos (microrganismos, insetos etc.) para reduzir populações de pragas ou patógenos agrícolas.

**Controle negativo**. Amostra ou placa utilizada para verificar se houve contaminação durante o procedimento. Não deve apresentar crescimento microbiano.

**Controle positivo**. Amostra com microrganismo conhecido, usada para confirmar que o procedimento e os meios de cultura estão funcionando corretamente.

**Cromogênico**. Meio de cultura que contém substâncias reagindo com o metabolismo do microrganismo, produzindo colônias coloridas específicas que ajudam na identificação.

### *Ilustração 2 — Estruturas fúngicas*

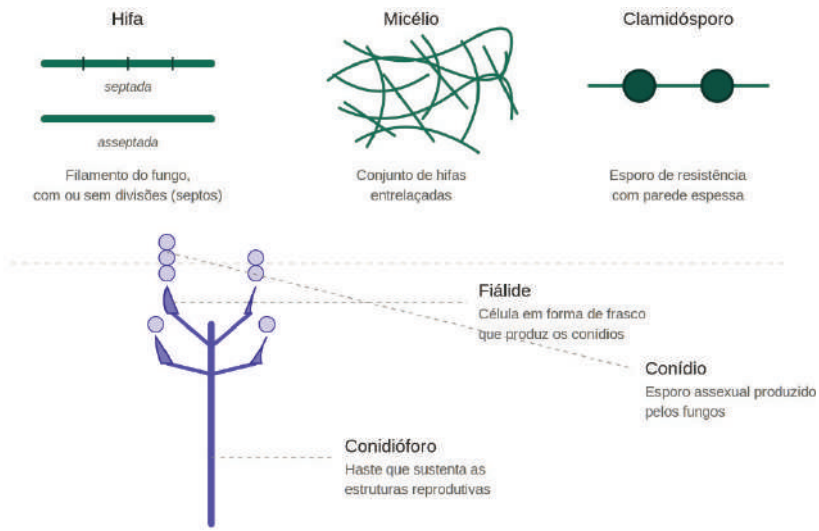



**Ilustração 2.** Principais estruturas de fungos filamentosos: hifa, micélio, clamidósporo, conidióforo, fiálide e conídio.

# D

**Diazotrófico**. Microrganismo capaz de fixar nitrogênio atmosférico, convertendo-o em formas assimiláveis pelas plantas.

**Diluição seriada**. Técnica em que se fazem diluições sucessivas de uma amostra concentrada, obtendo-se concentrações cada vez menores. Utilizada para quantificar microrganismos.

**DNA**. Ácido desoxirribonucleico. Molécula que carrega a informação genética dos organismos e é usada em identificação molecular de microrganismos.

# E

**Elipsoidal**. Formato oval, mais comprido que largo. Típico de alguns conídios fúngicos. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

**Entomopatogênico**. Microrganismo que causa doença em insetos, usado no controle biológico de pragas agrícolas. Exemplos: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*.

**Esfregaço**. Fina camada de amostra biológica espalhada sobre uma lâmina de vidro para análise microscópica.

**Esporo**. Estrutura de resistência e reprodução produzida por fungos e algumas bactérias, capaz de sobreviver em condições adversas e germinar quando o ambiente for favorável.

**Esporulação**. Processo pelo qual microrganismos formam esporos.

**Esterilização**. Eliminação de todas as formas de vida microbiana de um material ou ambiente, incluindo esporos.

# F

**Fiálide**. Célula conidiogênica em forma de frasco, característica de alguns fungos, que produz conídios em sua extremidade. Ver ilustração em "Estruturas fúngicas".

**Fitopatógeno**. Microrganismo causador de doenças em plantas.

**Fixação de nitrogênio**. Processo biológico em que certas bactérias convertem o nitrogênio atmosférico ($N_2$) em formas assimiláveis pelas plantas, como amônia.

**Flambagem**. Passagem rápida de um instrumento metálico pela chama do bico de Bunsen ou lamparina para esterilização.

**Fluxo laminar**. Câmara equipada com sistema de filtragem de ar que garante um ambiente estéril para manipulação de microrganismos.

**Fungo filamentoso**. Fungo que cresce formando filamentos (hifas), em contraste com as leveduras, que são unicelulares.

**Fusiforme**. Formato em que as pontas são mais afiladas que o centro, lembrando um limão ou um fuso. Típico de alguns conídios. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

# G

**Globoso**. Formato de esfera perfeita, arredondado em todas as direções. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

# H

**Hialino**. Transparente, sem cor. Termo comum para descrever estruturas fúngicas como conídios ou hifas.

**Hifa**. Filamento que compõe o corpo vegetativo de um fungo. O conjunto de hifas forma o micélio. Ver ilustração em "Estruturas fúngicas".

**Hilo**. Pequena marca ou cicatriz na base de um conídio, no ponto em que ele estava aderido à célula conidiogênica.

**Homogeneização**. Processo de misturar uma amostra para que ela fique uniforme, com o conteúdo distribuído igualmente.

# I

**Incubação**. Manutenção de uma cultura microbiana em condições controladas de temperatura, umidade e tempo, para permitir o crescimento dos microrganismos.

**Inoculante**. Produto contendo microrganismos vivos aplicado em sementes, solo ou plantas para promover benefícios como fixação de nitrogênio ou controle biológico.

**Inóculo**. Pequena quantidade de microrganismo utilizada para iniciar uma cultura em meio nutritivo.

**Isolado**. Cultura microbiana obtida a partir de uma única colônia, contendo (idealmente) apenas um tipo de microrganismo.

*Ilustração 3 — Hifa septada vs asseptada*

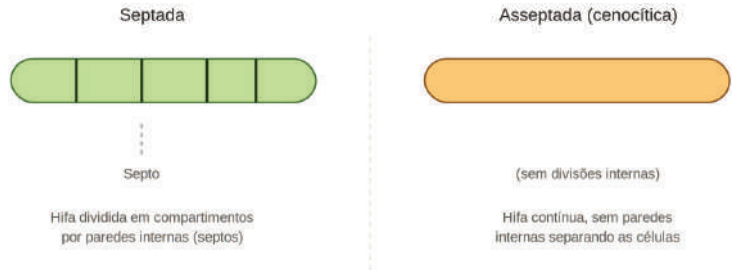



**Ilustração 3.** Diferença entre hifa septada (com divisões internas) e hifa asseptada ou cenocítica (contínua).

# L

**Leitosa**. Textura de colônia com aspecto úmido, brilhante e cremoso, típica de bactérias e leveduras. Também chamada de mucoide.

**Levedura**. Fungo unicelular, que se reproduz geralmente por brotamento.

# M

**Massa (conídios em)**. Arranjo em que os conídios formam um aglomerado ou cacho, sem ordem linear, como em *Beauveria bassiana*. Ver ilustração em "Cadeia vs massa".

**Meio de cultura**. Substrato nutritivo, líquido ou sólido, utilizado para o crescimento e multiplicação de microrganismos em laboratório.

**Meio seletivo**. Meio de cultura formulado para favorecer o crescimento de determinados grupos de microrganismos e inibir outros.

**Meio semisseletivo**. Meio que favorece o crescimento de um grupo específico, mas permite o desenvolvimento parcial de outros microrganismos.

**Metabólito**. Substância produzida pelo metabolismo de um microrganismo. Alguns metabólitos têm ação antimicrobiana, inseticida ou estimulante do crescimento vegetal.

**Micélio**. Conjunto de hifas que forma o corpo vegetativo de um fungo. Ver ilustração em "Estruturas fúngicas".

**Microrganismo-alvo**. Microrganismo que se deseja cultivar, identificar ou quantificar em uma análise.

**Morfológico**. Relativo à forma e estrutura de um organismo ou de suas colônias.

**Motilidade**. Capacidade de movimento próprio de um microrganismo, geralmente realizada por flagelos.

**Mucoide**. Ver "Leitosa".

**Multiplicação OnFarm**. Processo de produção de microrganismos diretamente na propriedade rural, em fermentadores ou equipamentos adaptados, como alternativa aos produtos industrializados.

***Ilustração 4 — Ramificação simples vs verticilada***

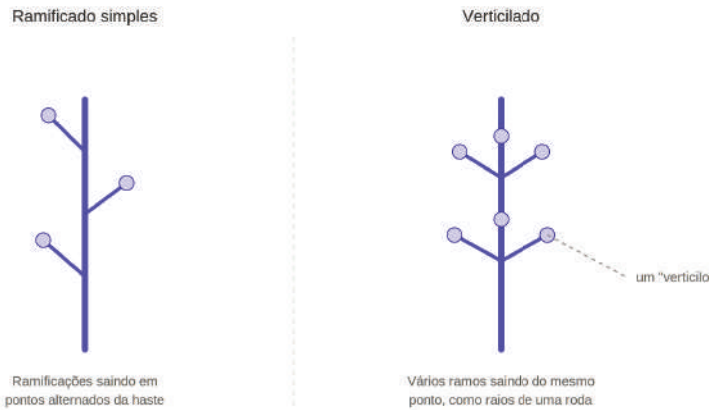



**Ilustração 4.** Conidióforo com ramificação simples (alternada) vs conidióforo verticilado (ramos saindo do mesmo ponto).

# N

**NMP (Número Mais Provável)**. Método estatístico de estimativa do número de microrganismos em uma amostra, baseado em diluições seriadas e presença/ausência de crescimento.

# O

**Opaco**. Que não deixa passar a luz; em microbiologia, refere-se a colônias que não são transparentes.

**Ovóide**. Formato de ovo, com uma ponta mais fina que a outra. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

# P

**PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**. Técnica molecular usada para amplificar pequenas quantidades de DNA, permitindo identificar microrganismos com alta precisão.

**qPCR (PCR em tempo real)**. Variante da PCR que permite não apenas detectar, mas também quantificar DNA de microrganismos durante a reação.

**Peptidoglicano**. Componente da parede celular bacteriana. Presente em camada espessa nas bactérias Gram-positivas e fina nas Gram-negativas.

**pH**. Medida do grau de acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução, em escala de 0 a 14.

**Pigmento fluorescente**. Substância produzida por certos microrganismos (como algumas *Pseudomonas*) que emite luz visível quando exposta à luz ultravioleta.

**Plaqueamento**. Técnica de distribuir uma amostra em placas de Petri contendo meio de cultura, para permitir o crescimento e contagem de colônias.

**Primer**. Pequena sequência de DNA usada em técnicas moleculares (como PCR) para iniciar a amplificação de uma região específica do material genético.

**Pulverulenta**. Textura de colônia com aspecto de pó, em que os conídios se soltam facilmente ao toque. Típica de *Beauveria bassiana*.

### *Ilustração 5 — Conídios em cadeia vs em massa*

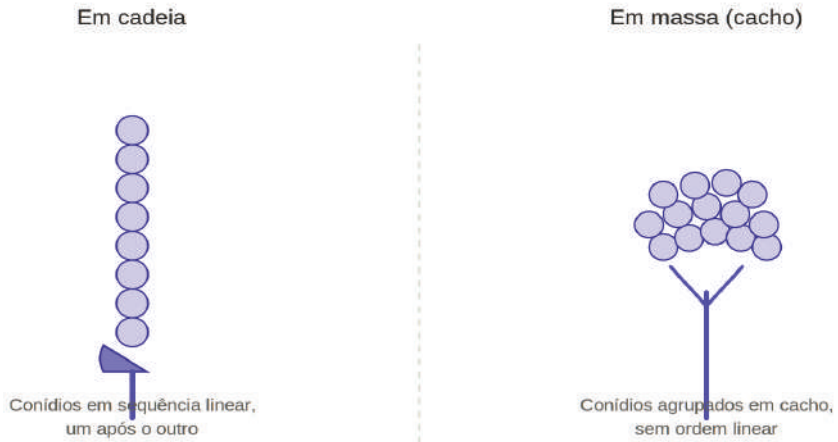



**Ilustração 5.** Duas formas comuns de arranjo dos conídios: em sequência linear (cadeia) ou agrupados em cacho (massa).

## R

**Ramificado**. Conidióforo com ramificações laterais saindo em pontos alternados da haste principal. Ver ilustração em "Ramificação simples vs verticilada".

**Replicata**. Repetição independente de um procedimento experimental, usada para aumentar a confiabilidade dos resultados.

**RNA ribossomal (rRNA)**. Tipo de RNA presente nos ribossomos das células. O gene que codifica o rRNA 16S é amplamente usado para identificação de bactérias.

**Região ITS (Internal Transcribed Spacer)**. Região do DNA ribossomal utilizada como marcador molecular padrão para identificação de fungos.

## S

**Safranina**. Corante usado na etapa final da coloração de Gram, responsável por colorir as bactérias Gram-negativas de rosa ou vermelho.

**Septada**. Hifa dividida em compartimentos por paredes internas (septos). Ver ilustração em "Hifa septada vs asseptada".

**Septo**. Parede interna que divide a hifa em compartimentos. Ver ilustração em "Hifa septada vs asseptada".

**Solução salina**. Solução aquosa de cloreto de sódio (geralmente a 0,85%), usada como meio de suspensão e diluição em microbiologia, por ter osmolaridade semelhante à das células.

**Subgloboso**. Formato quase esférico, mas com leve achatamento. Ver ilustração em "Formatos de esporos e células".

**Suspensão**. Mistura líquida contendo microrganismos distribuídos em um meio, como água destilada ou solução salina.

# T

**Tween 80**. Detergente não iônico usado em soluções de diluição para facilitar a dispersão de esporos fúngicos e células bacterianas.

# U

**Unidade Formadora de Colônia (UFC)**. Medida que estima o número de microrganismos viáveis em uma amostra, considerando que cada colônia em placa se originou de uma única célula.

# V

**Verticilado**. Conidióforo em que vários ramos saem do mesmo ponto, como raios de uma roda. Comum em *Metarhizium*, *Cordyceps* e *Paecilomyces*. Ver ilustração em "Ramificação simples vs verticilada".

**Violaceína**. Pigmento violeta produzido por bactérias do gênero *Chromobacterium*, responsável pela coloração roxa característica das colônias.

**Viável**. Capaz de se multiplicar. Uma célula ou esporo viável é aquele que ainda consegue formar colônia em condições adequadas.

**Vórtex (agitador)**. Equipamento que promove agitação vigorosa de tubos de ensaio e microtubos, formando um redemoinho no líquido para homogeneizar amostras.

Produzir bioinsumos OnFarm transcende a multiplicação de microrganismos. Significa assegurar que cada aplicação entregue ao campo o potencial máximo em controle e produtividade. Nesta obra, são apresentados os fundamentos e as metodologias exatas para a implantação de um laboratório microbiológico de alta performance, capacitando o leitor a dominar a identificação, a quantificação e as análises essenciais que blindam a qualidade dos biológicos direto na propriedade. Mais do que um manual técnico, este livro consolida-se como um guia prático e estratégico para converter o controle de qualidade em segurança, confiança e desempenho — mitigando riscos e consolidando o verdadeiro pioneirismo que transforma a gestão biológica em um novo patamar de produtividade e rentabilidade a cada safra.

ISBN 978-65-977141-0-0