



Análise de inoculante comercial para soja

(Analysis of the commercial inoculant for soybean)

Karla Cristina Stropa Goulart¹; Eliane Villamil Bangel²; Eli Sidney Lopes³; Enilson Luiz Saccol de Sá⁴; Solon Cordeiro de Araújo⁵; Lúcia Maria Carareto Alves¹; Jackson Antônio Marcondes de Souza¹; Eliana Gertrudes de Macedo Lemos¹

¹Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP
 karla@posgrad.fcav.unesp.br; lmc Alves@fcav.unesp.br; jackson@fcav.unesp.br; egerle@fcav.unesp.br

²Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS
 eliane-bangel@fepagro.rs.gov.br

³Bio Soja Indústrias Químicas e Biológicas Ltda, São Joaquim da Barra, SP
 biosoja@biosoja.com.br

⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS
 enilson.sa@ufrgs.br

⁵Stoller do Brasil Ltda, Campinas, SP
 info@stoller.com.br;

Abstract. *Quality control of inoculant: analysis of the number of cells in inoculants by different laboratories. In order to expand the application of soybean crop inoculants the effective methods for quality control of commercial products must be improved. This study shows the results from five collective and independent analyses of liquid and peat inoculants. The results have shown variation in the number of cells analyzed by current methodology described in legislation. Although the current legislation regularizes the production chain for liquid and peat inoculants, the reproducibility of experiments for evaluating those products becomes mandatory for increased reliability of the data by the scientific community and consumers.*

Keywords: *colony forming units; soybean; bradyrhizobium.*

Resumo. *A expansão da utilização de inoculantes para a cultura da soja requer a*

aplicação de métodos eficazes para controle de qualidade dos produtos gerados e comercializados no Brasil. Este trabalho mostra os resultados da análise independente de cinco diferentes laboratórios, aplicada a inoculantes líquido e turfoso. Os resultados mostraram que existe variação no número de células quando os inoculantes foram analisados utilizando a metodologia descrita na lei. Embora a legislação vigente regularize a cadeia produtora de inoculantes líquidos e turfosos, a reprodutibilidade dos experimentos de avaliação destes produtos torna-se mandatório para a maior confiabilidade dos mesmos por parte da comunidade científica e consumidores.

Palavras-chave: unidades formadoras de colônia; soja; *bradyrhizobium*.

Introdução

O teor protéico da semente de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] pode chegar a 42%, o que demanda uma alta quantidade de nitrogênio, que é parte essencial de clorofila, aminoácidos, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, dentre outras moléculas (Crawford et al., 2000). A soja não é uma cultura nativa do Brasil, portanto, as bactérias fixadoras de nitrogênio que tem a função de fixar o nitrogênio atmosférico na planta, não são encontradas naturalmente nos solos brasileiros. Com isso é indispensável à inoculação da soja com essas bactérias para que se tenha uma maior produtividade. *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* são fixadoras de nitrogênio que estabelecem uma simbiose com a soja, por meio de infecção via pelo radicular, convertendo o nitrogênio atmosférico em amônia, que é o composto assimilável pela planta. A maximização desta simbiose em termos de produtividade é alcançada por meio da inoculação com estirpes de bradirrizóbios estabelecidas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) aplicando nas sementes os insumos biológicos para soja (Araújo, 2006).

A produção de inoculantes é regulamentada pelas instruções normativas nº5 (06/08/2004) e nº10 (21/03/2006) do MAPA, o qual recomenda $1,0 \times 10^9$ células viáveis de bradirrizóbios por grama ou mililitro do produto até a data de seu vencimento (seis meses a partir de sua fabricação). A quantificação de bradirrizóbios presentes nos inoculantes comerciais para soja é fundamental para que a fixação do nitrogênio na soja ocorra com maior eficiência.

A legislação brasileira não contempla nenhuma margem de tolerância no resultado da análise dos inoculantes comerciais para soja, o que pode gerar divergências e problemas para os fabricantes devido aos fatores associados ao processo de diluição seriada (MAPA, 2012). O objetivo deste trabalho consistiu em enumerar as células bacterianas presentes nos inoculantes comerciais para soja por diluição seriada em diferentes laboratórios a fim de comprovar a eficiência do método.

Material e Métodos

A estratégia de execução para este trabalho foi prosseguida conforme metodologia seguinte: (i) distribuição de amostra de um mesmo lote de produto para cinco laboratórios aos quais pertencem os autores; (ii) obtenção de resultado de análise pela metodologia descrita na Portaria nº 31, de 8 de junho de 1982 (MAPA); (iii) análise dos resultados.

Amostras Biológicas

As amostras dos inoculantes foram distribuídas para os cinco laboratórios, correspondendo a dois frascos com inoculante líquido com as cepas SEMIA (seção de microbiologia agrícola) 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*) (CPAC15) e 5080 (*B. japonicum*) (CPAC7) e dois saches com inoculante turfoso com a cepa SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*) (29W) (Jardim-freire et al., 2006).

Diluição seriada dos inoculantes

A metodologia para análise do inoculante líquido foi realizada com diluições seriadas em solução salina 0,85% em duplicata, trocando a ponteira a cada diluição e homogeneizando cinco vezes por pipetagem, seguindo as diluições até obtenção da 10^{-7} . O procedimento para análise do inoculante turfoso iniciou com 10 g do produto acrescido de 90 ml de água estéril obtendo a diluição 10^{-1} . As seguintes diluições foram conduzidas como no produto líquido até obtenção da solução diluída 10^{-7} . Posteriormente às diluições de ambos os produtos, 0,1 ml das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram inoculadas em placas de petri contendo meio de cultivo sólido YMA (“Yeast-Mannitol Ágar”) (Vicent, 1970) acrescido de vermelho congo para verificação das UFC (unidades formadoras de colônias). A inoculação dos produtos comerciais diluídos foi realizada em triplicata pelo método de espalhamento. As placas de meio de cultivo inoculadas permaneceram em estufa a 28°C por cinco dias.

Contagem do número de células

A observação do número de UFCs por espalhamento foi avaliada nas diluições que apresentaram entre 30 e 300 colônias. As diluições que apresentaram número de colônias dentro dos requisitos descritos foram utilizadas para o cálculo do número de bactérias/ml ou grama de inoculante (Olsen et al., 1996). O número de colônias observadas nas placas em ambos os inoculantes diluídos em água ou solução salina foi bastante variável nos diferentes laboratórios. A variação do número de células de bradirrizóbios dos inoculantes líquido e turfoso estão ilustrados na figura 01. O número de células presentes nos inoculantes líquidos variou de 1,40 à 5,24 nos diferentes laboratórios e para o inoculante turfoso a variação foi de 2,36 à 10,30. Não houve diferença significativa nos resultados quanto à utilização de água ou solução salina (0,85%) utilizados na diluição seriada de ambos os tipos de inoculantes para soja.

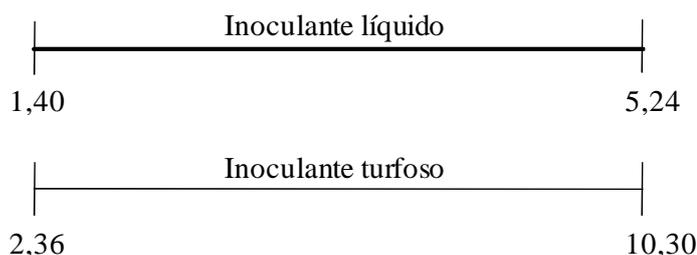
Resultados e discussão

Análise quantitativa de *Bradyrhizobium* viáveis nos inoculantes comerciais para soja

Os resultados mostraram diferenças nas médias do número de células entre os inoculantes, líquido e turfoso, embora não tenha sido encontrada diferença entre os tratamentos dos diluentes, água ou salina. Diferenças significativas foram encontradas na análise comparativa entre os laboratórios, para os ensaios com os inoculantes aplicando-se a técnica de espalhamento. As diferenças são significativas e importantes quando se considera que a técnica deve ser padronizada. Porém, além de não ter sido observada diferença entre as médias para os diferentes diluentes, pode-se concluir que para o inoculante turfoso os resultados foram os mesmos quando diluído em água ou salina.

A variação e a abrangência dos dados para os laboratórios representados, para ambos os tipos de inoculantes, está ilustrada na figura 1. As análises foram empregadas conforme legislação vigente determinada pelo MAPA. Métodos de análise de inoculantes vêm sendo um fator de discussão, devido à sensibilidade da técnica utilizada atualmente. Segundo Damasceno (2011), verificou-se uma diferença de células viáveis por mililitro ou grama de inoculante dependendo da maneira como os tubos contendo as células diluídas eram agitados. Não houve diferença em número de células viáveis nos inoculantes quanto ao diluente testado (água e solução salina 0,85%), dados que corroboram com nosso trabalho.

Figura 1: Variação das médias do número de bradimirzóbios $\times 10^9$ /ml ou g, observadas pela metodologia descrita na portaria 31 do MAPA realizada nos cinco laboratórios diferentes.



Considerações Finais

Os dados obtidos neste trabalho nos permitiram concluir que: (i) existe uma variação no número de células quando os inoculantes foram analisados por diferentes laboratórios utilizando a metodologia descrita na lei. (ii) A diluição em água ou na solução salina não apresentou alteração nos resultados. (iii) Análises de inoculantes devem ser realizadas por um número maior de laboratórios com maior número de amostras de inoculantes líquidos e turfosos nas metodologias propostas.

Referências

- ARAÚJO, E.S., JANTÁLIA, C.P., BODDEY, R.M., URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R. 2006. Importância do N₂ das raízes de soja para a produtividade da cultura sucessora e para o balanço do N₂ do sistema. Circular Técnica, 14.
- CRAWFORD, N.M., KAHN, M.L., LEUSTEK, T., LONG, S.R. Nitrogen and Sulfur. In: CRAWFORD, N.M., KAHN, M.L., LEUSTEK, T., LONG, S.R. Nitrogen and Sulfur. In:

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W., JONES, R.L. (Eds). 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants - *American Society of Plant Physiologists*, 786.

DAMASCENO, R.G. Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes. 2011. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 37 f.

JARDIM-FREIRE, J.R., COSTA, J.A., STAMMEL, J.G. 2006. Principais fatores que propiciaram a expansão da soja no Brasil. *Revista Plantio Direto*, 92:39-47.

MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 05 out 2012.

OLSEN, P.E., SANDE, E.S., KEYSER, H.H. 1996. The enumeration and identification of rhizobial bacteria in legume inoculants quality control procedures. *Paia: NifTAL Center*, 105.

SOUZA, R.A., HUNGRIA, M., FRANCHINI, J.C., CHUEIRE, L.M.O., BARCELLOS, F.G., CAMPO, R.J. 2008. Avaliação qualitativa e quantitativa da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:71-82.

VINCENT, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: ICB HandBook, Blackwell Scientific Publications, 200p.