

Análise e controle da qualidade de inoculantes microbianos de interesse agrícola: bactérias fixadoras de nitrogênio

CARVALHO, G.A.B.¹; HUNGRIA, M.²; MIURA, L.M.²

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná, gesiele@cnpso.embrapa.br; ²Embrapa Soja

No Brasil, o histórico do uso de inoculantes microbianos, produto que contém micro-organismos com ação estimulante para o crescimento da planta coincide com a história da expansão da cultura da soja no país. Como a soja não é nativa do Brasil, os solos brasileiros não possuem, naturalmente, bactérias fixadoras de nitrogênio capazes de formar nódulos efetivos. Visto que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) representa a principal fonte de N para a cultura da soja, bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, quando em contato com as raízes da soja, infectam as mesmas, via pelos radiculares, formando os nódulos.

Nesse contexto, o aumento do uso de inoculantes microbianos vem crescendo e despertando a atenção dos agricultores. Além da evidente eficiência da FBN na cultura da soja, os inoculantes microbianos propiciam, para o agricultor, menor custo, diminuição nos problemas ambientais e manutenção da fertilidade do solo. Com isso, as expectativas para a comercialização de novos produtos inoculantes são cada vez mais elevadas, tornando imprescindível a análise e controle da qualidade e da eficiência dos novos inoculantes que chegam ao mercado.

O uso dos inoculantes microbianos está resultando em demandas crescentes de atualização na legislação, de treinamento de um corpo

de fiscalização ativo e atualizado e de laboratórios de referência para a análise de inoculantes. Essas medidas são de extrema importância para impedir que a má qualidade de inoculantes e sistemas inadequados de inoculação impliquem redução do número de células viáveis nas sementes, resultando na baixa eficiência da FBN. Por isso, a legislação brasileira exige uma concentração mínima de 1×10^9 células viáveis por grama ou mL do produto. A pesquisa recomenda que a dose de inoculante a ser aplicada deva fornecer, no mínimo, 1,2 milhões de células viáveis por semente.

Efetou-se a análise qualitativa de inoculantes microbianos comercializados no Brasil assegurando, assim, uma melhor produtividade da cultura por meio da garantia desses produtos.

Compararam-se três inoculantes comerciais ao inoculante-padrão turfoso, preparado pela FEPAGRO com estirpe 587, permitindo ao agricultor o uso de produtos com eficiência comprovada.

Com as amostras dos inoculantes divididas em duas subamostras "A" e "B", foram feitas as diluições seriadas do produto, possibilitando a contagem por meio da semeadura em placas de Petri. Para formar a diluição 10^{-1} , retiraram-se 10,0 mL do produto inoculante, que foram adicionados em um frasco Erlenmeyer com 90,0 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85 %), colocando para homogeneizar a solução em um agitador orbital a 110 rpm, por um período de 20 minutos.

Em uma câmara de fluxo laminar foi retirada uma alíquota de 1,0 mL dessa solução e acrescentada em um tubo de ensaio com 9,0 mL de solução fisiológica, procedendo-se à homogeneização dessa solução em um agitador de tubos tipo Vortex, por alguns segundos, formando assim, a diluição 10^{-2} . A seguir, retirou-se 1,0 mL desse tubo que foi transferido para outro tubo de ensaio com 9,0 mL de solução fisiológica, formando, na sequência a diluição 10^{-3} . E assim sucessivamente, usando sempre a última diluição, até formar as diluições desejadas (10^{-8}). O uso da solução fisiológica para a diluição decimal em série é importante para a estabilidade osmótica das células dos micro-organismos que serão testados.

Após as diluições verificou-se o número de células estabelecidas como garantia utilizando o meio semisseletivo (MS). Esse método permite o crescimento de *Bradyrhizobium spp.* e inibe o crescimento de contaminantes pela adição de antibióticos, e o meio extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) com vermelho Congo (corante e indicador de contaminantes), no volume de 15 mL a 20 mL de meio por placa de Petri.

As placas foram divididas em seis setores, utilizando-se dois setores da placa para a diluição 10^{-6} , dois setores para 10^{-7} e dois setores para 10^{-8} , sendo três repetições de cada placa para cada meio de cultura. Adicionaram-se três gotas de 30 microlitros para cada setor das placas, na superfície dos meios MS e YMA – vermelho Congo em placas de Petri. Após a semeadura e absorção do inóculo, as placas permaneceram invertidas em incubadora a 28 °C pelo período aproximado de 6 dias para YMA e 12 dias para MS, quando, então, foi efetuada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). As médias das amostras em meio YMA e MS foram transcritas para o programa Microsoft Office Excel e posteriormente analisadas.

Por exemplo, admitindo-se que uma média dos seis setores tenha sido 20 UFC/gota, na diluição 10^7 , tem-se:

Média = 20

Fator de correção = 33,33

Diluição da leitura = 10^{-7}

nº de bactérias viáveis = $20 \times 33,33 \times 10^{-7} = 6,66 \times 10^9$ UFC/g ou mL.

Os resultados da comparação entre os inoculantes comerciais e inoculante padrão, no período, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações de células viáveis (nº. células/ mL ou g de inoculante) dos inoculantes avaliados.

Meios de Cultura	Inoculante padrão ^a (FEPAGRO 587)	Comercial 1 ^b (LOTE 01-2008)	Comercial 2 ^b (LOTE 02-2008)	Comercial 3 ^c
YMA	2,47x10 ⁹	3,34x10 ⁹	2,69x10 ⁹	5,2x10 ¹⁰
MS	3,11x10 ⁹	2,59x10 ⁹	2,89x10 ⁹	4,29x10 ¹⁰

^a Formulação em turfa contendo a estirpe SEMIA 587 de *B. elkanii*.

^b Formulação líquida contendo as estirpes SEMIA 5079 e 5080 de *B. japonicum*.

^c Formulação líquida contendo as estirpes SEMIA 5079 e 5080 de *B. japonicum*.

Com base nos resultados da tabela 1 conclui-se que: a) os diferentes inoculantes comerciais analisados encontram-se dentro dos padrões exigidos para uma boa fixação biológica de nitrogênio, cuja concentração mínima exigida deve ser de 1x10⁹ células viáveis por mL ou grama do produto, e b) os inoculantes estudados têm o padrão esperado e podem ser utilizados na inoculação da soja com boa qualidade e com garantia de boa produtividade.

Referências

BANGEL, E.V. Metodologia do controle de qualidade dos produtos inoculantes no Brasil. In: TALLER IBEROAMERICANO SOBRE NORMATIVA Y CONTROL DE CALIDAD DE INOCULANTES PARA LA AGRICULTURA, 1., 2005, Salvador. **Programa y resúmenes**. Salvador: FIOCRUZ: CYTED: BIOGRAG, 2005. p. 23 Organizado por Juan Sanjuán, Mitermayer Galvão dos Reis, Fabiola Nascimento da Conceição.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação Biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

RELARE, Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionados ao processo de Fixação Biológica do Nitrogênio em leguminosas. 14 ed. Bonito: Embrapa Agropecuário Oeste, 2008.