



XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas  
XIII Reunião Brasileira sobre Micorrizas  
XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo  
VIII Reunião Brasileira de Biologia do Solo  
Guarapari – ES, Brasil, 13 a 17 de setembro de 2010.  
Centro de Convenções do SESC

## ANÁLISE QUANTITATIVA DAS BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO PRESENTES EM INOCULANTES COMERCIAIS PARA SOJA

**Gesiele Almeida Barros de Carvalho<sup>(1)</sup>; Mariangela Hungria<sup>(2)</sup>**

(1) Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia - Bolsista CAPES - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, CEP: 86055-900, gesiele@cnpso.embrapa.br; (2) Pesquisadora Embrapa Soja, Rod. Carlos João Strass, Distrito de Warta, Londrina, PR, CEP: 86001-970, hungria@cnpso.embrapa.br.

**RESUMO** – A Fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo de grande importância para a cultura da soja, uma vez que a simbiose com bactérias específicas consegue suprir o nitrogênio necessário para um bom desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, para um aumento na produtividade e na produção. O Brasil investe na FBN que, atualmente, é um processo amplamente adotado por agricultores, sendo os inoculantes um dos responsáveis pelo Brasil ocupar o segundo lugar na produção mundial de soja. Assim, a legislação brasileira precisa manter rigoroso controle da qualidade desses insumos. Portanto, visto a importância dos inoculantes para a soja, o presente trabalho analisou a concentração de células viáveis/g ou mL de alguns desses produtos vendidos comercialmente, a fim de verificar qual a situação atual dos produtos que chegam aos agricultores. Os inoculantes foram analisados pelo método de espalhamento e contagem em placas de Petri. Doze produtos foram testados e apresentaram uma concentração acima da exigida por lei, que é  $1 \times 10^9$  células viáveis/g ou mL, bem como ausência de contaminantes na diluição  $10^5$ . Existe a percepção, portanto, de que os fabricantes estão atentos em manter a qualidade dos produtos, levando segurança para agricultor.

**Palavras-chave:** Fixação biológica de nitrogênio, inoculantes microbianos, controle de qualidade.

**INTRODUÇÃO** - A FBN é realizada por micro-organismos capazes de capturar e transformar o  $N_2$  presente na atmosfera em uma forma assimilável pelas plantas.

Dentre as diversas plantas que assimilam o  $N_2$  através da FBN, o destaque neste trabalho é para a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), com a qual o histórico do uso de inoculantes microbianos no Brasil coincide com a expansão dessa cultura no País. No caso dessa leguminosa houve um aumento visível na produtividade, pois o nitrogênio necessário para suprir as necessidades nutricionais da planta é obtido através das bactérias diazotróficas, como os rizóbios, presentes nos inoculantes comerciais (HUNGRIA et al., 2001).

Além do nítido benefício na FBN, os inoculantes representam ainda um baixo custo para o agricultor, comparado com os fertilizantes químicos nitrogenados. Proporcionam uma diminuição nos graves problemas ambientais provocados pelo efeito potencialmente poluidor do nitrato lixiviado ao lençol freático, resultante do uso indiscriminado desses fertilizantes nitrogenados (MERCANTE, 2006). E, finalmente, os inoculantes ajudam na manutenção da fertilidade do solo, devido aos micro-organismos presentes no mesmo (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Com a eficiência comprovada desses inoculantes houve um grande aumento na produção e no consumo desses produtos, assim, tornou-se imprescindível o controle da qualidade desses inoculantes microbianos, a fim de manter a eficiência e o aumento da produção, pois se o agricultor investir em produtos sem garantia de qualidade poderá haver grandes prejuízos devido, principalmente, a uma grande queda na produtividade.

Dessa forma, apresentou-se a necessidade de uma legislação rigorosa para controlar a expansão dos mesmos, onde atualmente exige-se que o inoculante

deve possuir uma concentração mínima de  $1 \times 10^9$  de células viáveis por grama ou mL do produto e estar ausente de contaminantes na diluição  $10^5$ . A pesquisa recomenda que a dose de inoculante a ser aplicada deva fornecer, no mínimo, 1,2 milhões de células viáveis por semente (QUEIROZ, 2005). A fim de verificar se os produtos encontram-se dentro dos padrões exigidos, antes de serem lançados no mercado, devem passar por uma análise rigorosa, conforme normas oficiais da RELARE (2007).

Portanto, esse trabalho objetiva avaliar se a concentração de células de rizóbios em alguns inoculantes, líquidos e turfosos, comercializados no Brasil para a cultura da soja encontram-se de acordo com as exigências da legislação brasileira.

**MATERIAL E MÉTODOS** – Foram analisados doze inoculantes, quatro apresentavam-se em suporte turfoso e oito, em suporte líquido, com variação na presença das estirpes recomendadas (Tabela 1). Esses inoculantes foram comparados ao inoculante padrão turfoso, preparado pela FEPAGRO contendo a estirpe SEMIA 587 (*Bradyrhizobium elkanii*), com concentração conhecida.

**Tabela 1.** Identificação do suporte das amostras dos inoculantes com a identificação das estirpes.

Inoculantes	Suporte	Estirpes
A	TURFA	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>
B	TURFA	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>
C	TURFA	SEMIA 587 <sup>a</sup> + SEMIA 5079 <sup>b</sup>
D	TURFA	SEMIA 587 <sup>a</sup> + SEMIA 5019 <sup>a</sup>
E	LÍQUIDO	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>
F	LIQUIDO	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>
G	LIQUIDO	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>
H	LIQUIDO	SEMIA 587 <sup>a</sup>
I	LIQUIDO	SEMIA 587 <sup>a</sup> + SEMIA 5019 <sup>a</sup>
J	LIQUIDO	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>
K	LIQUIDO	SEIMA 587 <sup>a</sup>
L	LIQUIDO	SEMIA 5079 <sup>b</sup> + SEMIA 5080 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Bradyrhizobium elkanii*

<sup>b</sup> *Bradyrhizobium japonicum*

A amostra de cada produto testado foi composta por duas subamostras, “A e B”, que foram devidamente identificadas e homogeneizadas. O ensaio iniciou-se com a diluição seriada das subamostras em solução salina esterilizada (0,85% de NaCl). As diluições selecionadas,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , foram semeadas por espalhamento nas placas de Petri contendo o meio de cultura YMA – yeast extract, manitol, ágar - (VINCENT, 1970) com vermelho Congo (corante e indicador de contaminantes). Em seguida, as placas foram

incubadas, em posição invertida, na estufa de crescimento a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pelo período de cinco a oito dias (bactérias de crescimento lento, como *Bradyrhizobium*). Depois desse período, foi efetuada a contagem do número de colônias (UFC) das diluições, fazendo, em seguida, uma média de cada diluição. Na próxima etapa, multiplicou-se a média do número de UFC pela diluição contada e pelo fator de correção 10 (correção da alíquota de 100  $\mu\text{L}$  para 1 mL), determinando o número de UFC por grama ou mL do produto testado. Levando em consideração que a concentração mínima exigida pela legislação brasileira é de  $1 \times 10^9$  células viáveis por g ou mL e que os inoculantes devem estar livres de contaminantes na diluição  $10^5$ , os produtos que estiverem dentro dessa concentração poderão ser comercializados.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – Depois de efetuadas as contagens, pode-se observar (Tabela 2) que todos os inoculantes testados encontravam-se dentro das normas exigidas, levando em consideração que a concentração mínima exigida pela legislação brasileira é de  $1 \times 10^9$  células viáveis g ou mL e não foram encontrados contaminantes.

**Tabela 2.** Resultado da concentração de células dos inoculantes microbianos comerciais e do inoculante padrão produzido pela FEPAGRO.

Inoculantes	Suporte	Garantia <sup>1</sup>	Inoc. Padrão <sup>2</sup>	Resultado <sup>2</sup>
A		$2,62 \times 10^9$		$3,34 \times 10^9$
B	Turfa	$2,62 \times 10^9$		$2,69 \times 10^9$
C		$5 \times 10^9$		$8,6 \times 10^9$
D		$4 \times 10^9$		$8,3 \times 10^9$
E		$3 \times 10^9$		$3,44 \times 10^9$
F		$3 \times 10^9$	$2,47 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$
G		$5 \times 10^9$		$4,5 \times 10^9$
H	Líquido	N/C		$5,2 \times 10^9$
I		$1,4 \times 10^9$		$8,4 \times 10^9$
J		$1,5 \times 10^9$		$4,97 \times 10^9$
K		N/C		$6,9 \times 10^9$
L		$5 \times 10^9$		$6,1 \times 10^9$

<sup>1</sup> Garantia constando no rótulo do produto.

<sup>2</sup> Quantidade de células/ g ou mL

Tendo em vista a eficiência do inoculante padrão turfoso ( $2,47 \times 10^9$ ), apenas o inoculante B apresentou um valor de concentração próximo ao do inoculante comparado, mostrando que também é eficiente. Os demais insumos estiveram acima da concentração

esperada, com uma concentração considerada excelente.

Os resultados mostram também que tanto os inoculantes com suporte líquido, quanto os de suporte turfoso são capazes de manter a concentração de células mínimas exigidas, onde a média da concentração de células dos inoculantes turfosos foi de  $5,73 \times 10^9$  células  $g^{-1}$  de inoculante, e a dos líquidos foi de  $5,63 \times 10^9$  células  $mL^{-1}$  de inoculante, uma diferença muito pequena, considerada não significativa, como confirmado pelo resultado do teste *t* ( $P=0,94$ ); portanto, em geral, os dois tipos de suporte apresentados são considerados bons veículos para os rizóbios.

Quanto à concentração de células garantidas pelo fabricante, apenas o inoculante G apresentou uma concentração inferior, mesmo assim, encontrando-se dentro das exigências mínimas da legislação. Esse resultado pode levantar à suspeita de que a formulação química desse produto não está conseguindo manter a concentração de células viáveis em relação à época de produção, e que, caso fique muito tempo estocado, pode resultar em diminuição na viabilidade das células, porém, para afirmar isso com certeza outros testes devem ser efetuados.

Nos inoculantes H e K não havia o valor de sua concentração de células garantidas, no entanto, os testes mostraram que se encontram acima da concentração mínima exigida e com concentrações superiores à do inoculante turfoso padrão; contudo, para ter registro os produtos têm que apresentar a garantia mínima de células. Merecem destaque no presente trabalho os inoculantes C, D, e I, que apresentaram uma concentração de células acima da garantia esperada e bastante superior à do inoculante padrão.

Os resultados desse trabalho são muito promissores para o Brasil, pois mostram que as indústrias produtoras de inoculantes microbianos comerciais estão se atentando em manter a qualidade de seus produtos e cumprindo as normas propostas. Com isso, existe uma maior segurança ao agricultor, que estará de fato investindo e adquirindo produtos com a qualidade garantida, tendo assim, juntamente com as condições ambientais favoráveis e com as tecnologias adequadas de inoculação, o incremento necessário para a fixação de nitrogênio, resultando em incrementos na produtividade da cultura da soja.

**CONCLUSÕES** - Esse trabalho mostrou que, em geral, os inoculantes microbianos comerciais, no Brasil, encontram-se dentro dos padrões exigidos pela norma brasileira ( $1 \times 10^9$  células  $g/mL$  do inoculante e isentos de contaminante na concentração de  $10^5$ ), para promover uma boa fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja. Conseqüentemente, esses inoculantes podem ser

comercializados, proporcionando ao agricultor uma maior segurança em relação à qualidade dos produtos e uma garantia de boa produtividade, com baixos custos, mantendo uma boa qualidade do solo e, ainda, preservando o meio ambiente. Sobretudo, os inoculantes representam uma excelente opção para se obter o nitrogênio necessário para o desenvolvimento da soja, mas essas análises devem ser continuamente efetuadas, a fim de garantir a qualidade dos produtos.

## REFERÊNCIAS:

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. (Embrapa Soja. Circular Técnica 35/ Embrapa Cerrados. Circular Técnica 13). 48p.

MERCANTE, F. M. Uso de inoculante garante economia de US\$ 3 bilhões. **Informativo Grupo Bio Soja**. p. 6, Ano II, n.04. São Joaquim da Barra: Bio Soja Fertilizantes Ltda, 2006.

QUEIROZ, M.A. Fiscalização e registro de inoculantes para a agricultura 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. 16

RELARE – **Anais da XIII Reunião de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola**. Documentos 290. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 212 p.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.

VINCENT, J.M. 1970. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Blackwell Science Publishers, Oxford, UK.