

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
E DO AMBIENTE

**COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS  
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES**

RAQUEL GARIBALDI DAMASCENO  
Bióloga - UFRGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

**Porto Alegre, Março de 2011.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA  
E DO AMBIENTE

**COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS  
PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES**

**Raquel Garibaldi Damasceno**  
Bióloga - UFRGS

**Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá**  
Orientador

**Porto Alegre, Março de 2011.**

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

D155c Damasceno, Raquel Garibaldi

Comparação e desenvolvimento de metodologias para o controle de qualidade de inoculantes / Raquel Garibaldi Damasceno. – 2011.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2011.

Orientação: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

1. Inoculantes 2. Controle de qualidade 3. Fixação de nitrogênio 4. Leguminosas I. Sá, Enilson Luiz Saccol de, orient. II. Título.

CDU 579.64(043)

## AGRADECIMENTOS

A minha querida família, minha mãe Anita, mulher forte e carinhosa, sustentou com amor todas as adversidades que fazem parte na criação solitária de suas três filhas. Minhas lindas irmãs Mariana e Ana Lúcia, que apesar de distantes, fazem toda a diferença na minha vida, como uma extensão daquilo que eu sou. Meu padrinho José Arthur, meu pai de direito.

Ao meu pai emprestado, Paulo Galo, pelo seu papel essencial na família durante muitos anos, o qual deixou um respeito e carinho imensos no meu coração. Ao Ronaldo, amigo recente, porém mostra com muita dedicação e amor o valor do trabalho e quanto somos importantes.

Ao meu noivo Giovanni, sempre atento e amoroso, o homem com quem quero passar todos os dias da minha vida.

Minha melhor amiga Marcele, com quem eu sempre, sempre, posso contar. Eu a amo como minha irmã, como de fato é.

Meus maravilhosos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo, André, Daniele, Gleidson, Leandro, Manuela, Marcos, Neemias, Rafael Lima, Rafael Machado, Thaís, e ao técnico Márcio, os quais faziam os meus dias de trabalho muito mais divertidos e enriquecedores!

Ao meu orientador Prof. Enilson, que somou de maneira fundamental para meu crescimento profissional, pela paciência, amizade e a firmeza na medida certa.

Ao PPGMAA, seus professores e alunos, muitos deles grandes amigos que levarei para o resto da minha vida.

À Noriam e ao professor Renato Levien pela concessão das sementes.

À Eliane Bangel, funcionária da FEPAGRO, pelo auxílio no entendimento inicial sobre controle de qualidade de inoculantes.

Ao CNPq e ao MAPA pelo auxílio financeiro.

# COMPARAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE INOCULANTES<sup>1</sup>

Autora: Biól. Raquel Garibaldi Damasceno

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

Os inoculantes contendo microrganismos fixadores de nitrogênio promovem uma grande economia nos sistemas agrícolas em adubação nitrogenada. Para que os produtos inoculantes cheguem ao mercado apresentando os atributos mínimos exigidos pela legislação, faz-se necessário um eficiente controle de qualidade. Neste sentido, este trabalho objetivou comparar as metodologias de análise de inoculantes para leguminosas e desenvolver novas metodologias para serem usadas em controle de qualidade de produtos inoculantes para gramíneas. Para tanto, analisaram-se 12 amostras de inoculantes para leguminosas - sete líquidos e cinco turfosos - e uma amostra de inoculante para gramíneas. Foram comparadas com a legislação as metodologias de diluição seriada por meio de diferentes tipos de diluentes e formas de agitação dos tubos, e diferentes métodos de inoculação em placa. Também foi analisada a sobrevivência dos microrganismos inoculados em semente de soja e milho até 96h após a inoculação, e a utilização de esferas de vidro como alternativa às sementes de soja para ser utilizadas em testes de sobrevivência. O tempo de 10s em vórtex mostrou-se mais vantajoso para ser utilizado na metodologia de diluição seriada. Não houve variação significativa entre os diluentes utilizados, logo, a água destilada mostra-se como alternativa mais prática. A técnica de gota apresentou-se como mais eficiente, devido à ausência de diferença entre os métodos de inoculação. As esferas de vidro e as sementes de soja não representaram diferença real no número de células viáveis recuperadas. Observou-se uma queda no número de bactérias inoculadas em sementes de soja e milho após 6h de armazenamento. Desse modo, as metodologias de diluição seriada, inoculação em placa e análise de sementes inoculadas podem ser otimizadas para o controle de qualidade de inoculantes, tornando os procedimentos laboratoriais mais práticos para o operador.

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Faculdade de Agronomia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (65 p.) Março, 2011.

# COMPARISON AND DEVELOPMENT OF METHODOLOGIES FOR INOCULANTS QUALITY CONTROL<sup>1</sup>

Author: Biól. Raquel Garibaldi Damasceno

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

Inoculants containing N-fixer microorganisms generate huge economy for agricultural systems with nitrogen fertilization. In order to make inoculant products reach the market with the minimum attributes established in legislative determination, it is necessary to perform a good quality control. Therefore, this study aimed to compare methods of analysis of legume inoculants and to develop new methods that can be applied in the quality control of grasses inoculant products. Accordingly, 12 samples of legume inoculants were analyzed – seven liquid and five peaty – along with one sample of grass inoculant. The serial dilution methods were compared to those determined by the legislature, using different types of diluent, tube agitation, and plate inoculation methods. It was also evaluated the survival rate of microorganisms inoculated in soy and corn seeds up to 96h after inoculation, and the use of glass spheres as an alternative for soy seeds in survival tests. Using a vortex for 10s showed the most gainful results for use in serial dilution methods. There was no significant variation between the diluents used, so the distilled water was considered the most convenient alternative. The drop plate technique was the most efficient due to the lack of difference between inoculation methods. The glass spheres and soy seeds did not show actual difference in number of viable cells recovered. There was a reduction in number of bacteria inoculated in soy and corn seeds after 6h of storage. As a result, the methods for serial dilution, plate inoculation, and evaluation of inoculated seeds can be optimized for quality control of inoculants, allowing more convenient laboratory procedures for the operators.

---

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology - Faculdade de Agronomia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (65 p.) March, 2011.

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1 Fixação biológica de nitrogênio.....	03
2.2 Bactérias diazotróficas.....	05
2.3 Inoculantes comerciais.....	07
2.3.1 Histórico.....	10
2.3.2 Legislação.....	12
2.3.3 Métodos para o controle de qualidade de inoculantes.....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Coleta das amostras.....	22
3.2 Método de diluição seriada.....	23
3.3 Método de inoculação e contagem de colônias em placas.....	24
3.4 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para leguminosas.....	24
3.4.1 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em sementes de soja.....	26
3.4.2 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em esferas de vidro.....	29
3.5 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para gramíneas.....	31
3.5.1 Adaptação de métodos de diluição e inoculação.....	32
3.5.2 Avaliação do número de células viáveis de diazotróficos em sementes de milho.....	33
3.6. Análise estatística dos dados.....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
4.1 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para leguminosas.....	36
4.1.1 Comparação dos métodos de diluição e inoculação.....	36
4.1.2 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em sementes de soja.....	45
4.1.3 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em esferas de vidro.....	48
4.2 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para gramíneas.....	50
4.2.1 Adaptação de métodos de diluição e inoculação.....	50
4.2.2 Avaliação do número de células viáveis de diazotróficos em sementes de milho.....	53
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	54

<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>7. APÊNDICES</b> .....	63
7.1 Meio de cultura Levedura-Manitol (Adaptado de Vincent, 1970).....	63
7.2 Meio de cultura NFb (Döbereiner et al., 1995).....	64



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Pág.
<b>TABELA 1.</b> Amostras dos produtos inoculantes analisados, formulações, cultura alvo e identificação das estirpes bacterianas.....	22
<b>TABELA 2.</b> Comparação entre os números de células viáveis recuperadas (UFCs) por unidade de produto inoculante aplicado sobre sementes de soja e esferas de vidro.....	51

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Pág.
<b>FIGURA 1.</b> Exemplo de uma amostra de sementes de soja (esquerda) e esferas de vidro (direita) utilizada no experimento de aderência dos rizóbios utilizando material alternativo à semente de soja.....	30
<b>FIGURA 2.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/mL de uma amostra do inoculante líquido L1 e de unidades formadoras de colônia/g de uma amostra do inoculante turfoso T3 submetidos a diferentes formas de agitação.....	38
<b>FIGURA 3.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6 e LT1) submetidas a agitação manual e agitação em vórtex por 10s.....	40
<b>FIGURA 4.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos (T1, T2 e T3) submetidas a agitação manual e agitação em vórtex por 10s..	41
<b>FIGURA 5.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela média das contagens do número de unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos e de unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos utilizando diferentes diluentes no método de diluição seriada.....	42
<b>FIGURA 6.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6 e LT1) utilizando diferentes diluentes no método de diluição seriada.....	43
<b>FIGURA 7.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos (T1, T2 e T3) utilizando diferentes diluentes no método de diluição seriada.....	44
<b>FIGURA 8.</b> Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela média das contagens do número de unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos e das unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos utilizando diferentes técnicas de inoculação em placa.....	45

<b>FIGURA 9.</b>	Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6 e LT1) utilizando diferentes técnicas de inoculação em placa..	46
<b>FIGURA 10.</b>	Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos (T1, T2 e T3) utilizando diferentes técnicas de inoculação em placa.....	47
<b>FIGURA 11.</b>	Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/mL de uma amostra do inoculante líquido L1 em sementes de soja armazenadas por 96 horas.....	48
<b>FIGURA 12.</b>	Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/g de uma amostra do inoculante turfoso T3 em sementes de soja armazenadas por 96 horas.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – graus centígrados  
**ALIRU** - *Australian Legume Inoculants Research Unit*  
**ANPII** – Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes  
**ATP** – adenosina trifosfato  
**CFIC** - Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos  
**CMC** - carboximetilcelulose  
**FBN** – Fixação Biológica de Nitrogênio  
**FEPAGRO** – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária  
**g** – grama  
**h** – hora  
**ha** – hectare  
**IBPT** - Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná  
**IMYZA** – *Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola*  
**INTA** – *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*  
**IPAGRO** – Instituto de Pesquisa Agronômica  
**Kg** - quilograma  
**L** - litro  
**LM** – Levedura-Manitol  
**MAPA** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
**mg** – miligrama  
**MGAP** - *Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca*  
**min** - minuto  
**mL** – mililitro  
**mm** - milímetro  
**µL** – microlitro  
**µm** – micrômetro  
**nº** - número  
**NFb** – Novo Fábio Perosa  
**NMP** – Número mais Provável  
**pH** – potencial hidrogeniônico  
**PVP** – polivinilpirrolidona  
**RELARE** - Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola  
**rpm** – rotações por minuto  
**rRNA** – ácido ribonucleico ribossomal  
**s** - segundo  
**SEMIA** – Seção de Microbiologia Agrícola  
**SENASA** - *Servicio Nacional de Sanidad Agraria*  
**UFC** – Unidades Formadoras de Colônia  
**UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

b

## 1. INTRODUÇÃO

A técnica de inoculação de rizóbios em leguminosas levou o país a um grande avanço na produção de soja. Também têm contribuído com a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e com a diminuição de impactos ambientais importantes como a contaminação do lençol freático com substâncias nitrogenadas capazes de lixiviar e se deslocar no perfil do solo.

Novos inoculantes têm surgido recentemente no mercado internacional e muitas solicitações para registro de produtos têm sido feitas no Brasil. No entanto, a Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010 (MAPA, 2010), que regulamenta a análise destes produtos apresenta diversos problemas metodológicos, incluindo a ausência de métodos para avaliação de inoculantes contendo microrganismos promotores de crescimento de plantas, dificultando a inspeção deste tipo de insumo agrícola.

Da mesma forma, para muitos cultivos importantes no Brasil, faz-se necessária a produção de formulações eficientes de inoculantes, a otimização de tecnologias de inoculação e de metodologias para avaliação da qualidade destes inoculantes para que possam ser usadas pelos laboratórios credenciados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Desta maneira, os estudos sobre técnicas de inoculação e métodos para avaliação da qualidade e eficiência de inoculantes transformam-se em fatores críticos para o desenvolvimento de tecnologias que permitam a exploração sustentável de sistemas agrícolas.

Neste sentido, este projeto visa comparar as metodologias de análise da qualidade de inoculantes para leguminosas, exigido pela legislação brasileira. Também visa o desenvolvimento de novas metodologias para serem utilizadas em controle de qualidade de novos produtos inoculantes para gramíneas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O estudo sobre métodos de controle de qualidade de inoculantes é de suma importância para que se realize uma fiscalização mais rápida e eficiente desses produtos a fim de serem utilizados para comercialização. Necessita-se, desta forma, uma análise mais cuidadosa das metodologias que revelem o mais fielmente possível a concentração microbiana dos inoculantes.

### **2.1 Fixação biológica de nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada, juntamente com a fotossíntese, um dos principais processos responsáveis pela vida na Terra. A grande oferta de  $N_2$  atmosférico (79%), nos sistemas naturais, só se torna disponível aos seres vivos através de gasto energético (Cardoso et al., 1992).

A quebra da ligação tripla da molécula de nitrogênio e formação de amônia é realizada em uma reação química comandada pela enzima nitrogenase, utilizando energia obtida de carboidratos e armazenada sob a forma de ATP. Após a quebra desta ligação o nitrogênio pode ser incorporado pelos tecidos vivos. Apenas uma parcela relativamente pequena das espécies

de procariotos possui o complexo enzimático da nitrogenase; estes organismos são chamados de fixadores de nitrogênio ou diazotróficos (Cardoso et al., 1992; Moreira & Siqueira, 2006).

A FBN é extremamente importante em leguminosas, pois a ocorrência de uma estreita simbiose entre a planta e a bactéria proporciona uma elevada captação de nitrogênio, beneficiando ambos os organismos. Um dos estudos que verificou a eficiência da FBN foi realizado por Barcelos & Vilela (1994), no qual observou que a capacidade de fornecimento de nitrogênio promovido pelas leguminosas variou de 40 a 290 Kg/ha/ano, sendo que na sua grande maioria situou-se entre 70 a 140 Kg/ha/ano.

Além da fixação de nitrogênio, os rizóbios possuem outros mecanismos que, indiretamente, estimulam o crescimento da planta, incluindo a produção de hormônios, antibióticos, enzimas solubilizadoras de fosfato e sideróforos. Devido a presença desses atributos, estudos sobre fixação de nitrogênio têm se intensificado, pois o manejo agrícola demanda cada vez mais eficiência através do uso de bactérias mais competitivas e capazes de estender essa vantagem a diversos cultivos de leguminosas (Santillana et al., 2005).

## **2.2 Bactérias diazotróficas**

A identificação e a caracterização taxonômica dos rizóbios baseavam-se tradicionalmente nos resultados de especificidade por hospedeiros, análise da morfologia de colônias em meios de cultura, resistência intrínseca a antibióticos, características bioquímicas, suscetibilidade a bacteriófagos, reações sorológicas, particularmente com antígenos



termoestáveis, entre outros. (Vincent, 1970; Hungria & Araujo, 1994; Somasegaran & Hoben, 1994).

Caracterizações utilizando-se técnicas de biologia molecular, principalmente análises da região *16S rRNA* têm sido mais utilizadas nos últimos anos. E fazendo-se uso desta tecnologia, a divisão taxonômica anterior dos rizóbios dispostos unicamente na família Rhizobiaceae foi modificada, sendo reclassificada em quatro famílias, dentre elas, Rhizobiaceae (gêneros *Rhizobium* e *Ensifer*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*) e Hyphomicrobiaceae (*Azorhizobium*) (Garrity & Holt, 2001). Foram descritas 70 espécies até o momento, das quais 26 são representantes do gênero *Rhizobium*, 15 do gênero *Ensifer* (formalmente denominada *Sinorhizobium*), 19 do gênero *Mesorhizobium*, oito do gênero *Bradyrhizobium* e duas do gênero *Azorhizobium*. Além das bactérias tradicionalmente conhecidas como rizóbios, nos últimos anos foram identificados novos gêneros como simbioses de leguminosas, tanto nas  $\alpha$ -proteobactérias, incluindo *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum* e *Phyllobacterium*, como nas  $\beta$ -proteobactérias, incluindo *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum* e *Shinella* (Weir, 2010).

O gênero *Bradyrhizobium* apresenta células em forma de bastonetes Gram negativos, com tamanho variável de 0,5-0,9 $\mu$ m de diâmetro e 1,2-3,0 $\mu$ m de comprimento, ausência de esporos, com um flagelo polar ou subpolar. O grupo apresenta fisiologia aeróbia, predominantemente quimiorganotrófico, de crescimento lento, com tempo de geração entre 7-13 horas. Promove a alcalinização do meio de cultura Levedura-Manitol, modificando a coloração

quando na presença do indicador de pH azul de bromotimol e sua temperatura ótima de crescimento varia de 25-30°C. Apresenta colônias brancas, circulares, convexas e opacas, com tendência à textura granular, não excedendo a 1,0mm de diâmetro para um período de incubação entre cinco e sete dias (Vincent, 1970; Somasegaran & Hoben, 1994; Moreira & Siqueira, 2006).

Além dos rizóbios, outros grupos de bactérias realizam a fixação biológica de nitrogênio, porém de forma associativa. Um desses grupos está contido na família *Rhodospirillaceae*, que apresenta 26 gêneros de  $\alpha$ -proteobactérias, onde, dentre eles, inclui-se o gênero *Azospirillum*. Estas bactérias caracterizam-se por apresentar comportamento endofítico em gramíneas como milho, trigo, cevada, aveia, arroz e centeio (Döbereiner & De-Polli, 1980).

Bactérias do gênero *Azospirillum* possuem morfologia celular composta de bastonetes Gram negativos, com dimensões de 0,8-1,0 $\mu$ m de diâmetro e 2,0-4,0 $\mu$ m de comprimento, sem esporos, flagelados (com padrão misto, onde em meio líquido apenas um flagelo polar é sintetizado, e em meio sólido desenvolvem-se vários flagelos). Apresentam temperatura ótima de crescimento de 36°C e fisiologia microaerofílica, pois sua enzima nitrogenase possui menor tolerância ao oxigênio atmosférico; mesmo assim, pode crescer de forma limitada tanto em aerobiose quanto em anaerobiose. *In vitro*, forma uma película delgada em forma de véu abaixo da superfície do meio de cultura, onde há menor concentração de oxigênio (Döbereiner et al., 1995).

A espécie *A. brasilense* é isolada a partir do meio NFb semi-sólido, por meio de incubação por 48 horas à 35°C. O desenvolvimento das bactérias

alcaliniza o meio, modificando a coloração quando utilizado o indicador de pH azul de bromotimol.

Os metabolismos de carbono e nitrogênio de *Azospirillum* spp. usa como fontes principais ácidos orgânicos como malato, piruvato e succinato, com preferência de frutose sobre a glicose. Além do nitrogênio atmosférico, amônia, nitrato, nitrito e aminoácidos também podem servir como fontes de nitrogênio (Magalhães et al., 1983; Döbereiner, 1992).

### **2.3 Inoculantes comerciais**

No Brasil foram comercializadas cerca de 19 milhões de doses de inoculantes em 2009, dos quais 99% para a cultura da soja, classificando o país como o maior produtor mundial de inoculantes para leguminosas (ANPII, 2010). A inoculação das sementes de soja com microrganismos fixadores de nitrogênio substitui a adubação nitrogenada, trazendo uma economia em torno de um bilhão de dólares. Outro benefício importante refere-se ao aproveitamento do nitrogênio fixado, não existindo perdas como as que podem ocorrer quando se utilizam fertilizantes (Lombardi, 1999; Chueire, 2000).

Leguminosas, como o feijão, amendoim, ervilha, lentilha, forrageiras e arbóreas, e gramíneas, como milho, trigo e sorgo também podem receber inoculantes, mas não existem estudos de ordem econômica semelhantes às realizadas para a soja.

O inoculante consiste de uma cultura de rizóbio previamente selecionada, misturada a um veículo, normalmente turfa. A oferta de

inoculantes no mercado é bem variada, por meio da utilização de suportes líquido, turfoso, gel ou liofilizado.

O suporte turfoso é obtido a partir da turfa, que é um tipo material orgânico ácido, após passar por um processo de moagem, peneiração e correção de pH. Para que seja utilizado como veículo para inoculantes, a turfa deve possuir acima de 80% de matéria orgânica, baixo teor de cloretos e ausência de areia, para não causar danos às máquinas semeadeiras (Câmara, 1998). Estudos realizados por Keyser (1992) demonstraram que outros fatores que caracterizam um suporte adequado referem-se à facilidade de obtenção e esterilização (por autoclave ou radiação), manutenção da infectividade e efetividade das estirpes inoculadas durante o período de estocagem e ausência de toxicidade aos seres humanos, animais e plantas.

A legislação brasileira que regula o comércio de importação e exportação de inoculantes exige a obrigatoriedade de esterilização da turfa, de modo a eliminar contaminantes até o valor de  $1,0 \times 10^5$  microrganismos por grama de produto (MAPA, 2004). Essa necessidade surgiu porque, na indústria, o rizóbio é multiplicado em grandes fermentadores e uma alíquota de inóculo é injetada na embalagem juntamente com a turfa. Em turfa não esterilizada, o rizóbio compete com outros microrganismos, como fungos, actinomicetos e outras bactérias, prejudicando seu crescimento e conseqüentemente, dificultando a obtenção do número adequado de células. Quando a turfa é esterilizada, a competição não ocorre, contribuindo tanto para o crescimento do rizóbio quanto para o aumento no tempo de sobrevivência do microrganismo (Hungria et al., 2001).

O inoculante líquido é composto por um substrato estéril que simplifica o processo de produção, uma vez que pode ser produzido e esterilizado na própria indústria, e, por sua natureza fluida, a adesão dos microrganismos e a aplicação em sementes ou no campo torna-se facilitada. No entanto, a sobrevivência de bactérias nesse tipo de inoculante e nas sementes inoculadas é dificultada porque as bactérias não estão tão protegidas do estresse ambiental quanto os microrganismos presentes em um inoculante contendo turfa (Singleton et al., 2002; Tittabutr et al., 2007).

Outros substratos e aditivos vêm sendo testados, como argila, carvão, fosfato de rocha, alginato, CMC (carboximetilcelulose), goma xantana, goma arábica, glicerol e PVP (polivinilpirrolidona), e alguns já se mostraram promissores na sobrevivência dos rizóbios (Stephens & Rask, 2000).

Apesar dos esforços na manutenção da sobrevivência dos rizóbios no inoculante, quando as bactérias contidas no produto são postas em contato com as sementes, há uma redução na viabilidade desses microrganismos. Isso ocorre porque neste momento começam a atuar fatores relacionados à dessecação do suporte, à possível natureza tóxica dos exsudatos presentes no tegumento da semente e às elevadas temperaturas ambientais durante a inoculação e plantio. Desse modo, a sobrevivência dos rizóbios nas sementes pode afetar diretamente na nodulação das leguminosas e subsequentemente no rendimento das culturas (Brockwell & Bottomley, 1995; Deaker et al., 2004).

### **2.3.1 Histórico**

As primeiras pesquisas com rizóbios no Brasil foram realizadas no Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo. Nesta instituição, desde 1930 já se realizavam estudos em microbiologia agrícola com bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas. A partir destes trabalhos, obtiveram-se culturas puras que começaram a ser distribuídas aos produtores para inoculação em sementes (Franco, 2009).

Apesar do pioneirismo do Instituto Agronômico de Campinas, a produção comercial de inoculantes no Brasil obteve maior crescimento no estado do Rio Grande do Sul, sob a liderança do Dr. João Ruy Jardim Freire no IPAGRO/UFRGS com a introdução de estirpes de rizóbio. A partir de 1950 a Seção de Microbiologia Agrícola da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul iniciou a produção de inoculantes e então, agrônomos de empresas de extração de óleo de soja buscavam os inoculantes por meio de culturas em frascos para distribuição aos agricultores. Em 1956, as estirpes recomendadas passaram a ser fornecidas pela FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) para a primeira empresa privada, o Laboratório Leivas Leite, localizado em Pelotas. Esse foi o início da criação de um setor industrial na produção de inoculantes comerciais composto por empresas nacionais e multinacionais que hoje formam a Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) (Franco, 2009).

Em 1992 foi reconhecida pelo MAPA a RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), um grupo formado por

representantes de instituições de pesquisa e empresas produtoras de inoculantes que tem por finalidade analisar os resultados das pesquisas em seleção, recomendação de estirpes, controle de qualidade e outros temas de interesse da rizobiologia. Desde então, a FEPAGRO é a instituição responsável pela manutenção e distribuição das estirpes recomendadas, enquanto o MAPA legaliza e rege a legislação para a produção de inoculantes comerciais, em âmbito federal. Desde 1979, as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 e 587, e depois de 1992, as SEMIA 5079 e 5080 foram incluídas na recomendação oficial de inoculantes comerciais para a cultura da soja (Jardim-Freire & Verneti, 1999; Jardim-Freire et al., 2006).

A produção de inoculantes no Brasil também sofreu alterações ao longo dos anos. Sua tecnologia teve origem na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul, baseando-se em pequenos biorreatores, com capacidade para 20L. No final da década de 60 e início de 70, o Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná (IBPT) desenvolveu um biorreator de maior escala, para 250 e 400L, que perdurou durante anos nas empresas brasileiras. Entretanto, as próprias empresas desenvolveram tecnologia própria. Em 1984, foram implantados os biorreatores de maior porte, para 1.500L, acoplados a biorreatores menores para realização de inoculações sucessivas. Esta técnica é usada por quase todas as empresas brasileiras (Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 1997).

### **2.3.2 Legislação**

A inspeção e fiscalização da produção, importação, exportação e comércio de inoculantes é atribuição do MAPA. O objetivo geral da fiscalização é assegurar a produção e a produtividade agropecuária brasileira por meio da garantia de qualidade dos insumos básicos disponibilizados aos produtores rurais. A Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos (CFIC) é o órgão do MAPA responsável pela organização da fiscalização em âmbito nacional, orientando a ação fiscal nos estados onde se concentram a produção e o consumo de inoculantes (Queiroz, 2005).

Em 1974, o governo brasileiro instituiu normas à produção e comercialização de inoculantes, cujo conteúdo deveria ser composto apenas por estirpes recomendadas por instituições públicas de pesquisa. Posteriormente, a Portaria nº 31, de 08 de junho de 1982, Capítulo IV, da legislação do MAPA, estabeleceu os métodos padrões oficiais para análise de inoculantes (MAPA, 1982).

Algumas adaptações dos métodos de controle de qualidade foram instituídas na Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010 (MAPA, 2010) sem, entretanto, atualizar-se às tecnologias e conhecimentos atuais das instituições de pesquisa e dos laboratórios que produzem os inoculantes comercialmente.

Em virtude da fiscalização do MAPA, com base na Instrução Normativa nº 5, de 10 de agosto de 2004, Anexo I, que define as normas sobre as especificações e garantias mínimas para o produto (MAPA, 2004), a indústria de inoculantes tem feito um grande esforço a fim de melhorar a



qualidade dos produtos comercializados. As normas incluem a presença de uma concentração mínima de  $1,0 \times 10^9$  células viáveis por grama ou mililitro de produto, até a data de seu vencimento; no caso da soja, para a concentração mínima, o inoculante deve ser misturado a 50 Kg de sementes para proporcionar, no mínimo, 600.000 células bacterianas por semente; devem ser elaborados com suporte estéril e estarem livres de microrganismos não especificados até o fator de diluição  $1 \times 10^{-5}$ , podendo este suporte ser sólido ou fluido e ter um prazo de validade mínimo de 6 meses a contar da data de fabricação; e devem conter pelo menos duas estirpes, podendo estar em diferentes combinações.

No Brasil, a legislação atual não contempla as normas para a regulamentação de inoculantes para culturas específicas de gramíneas. Desta forma, os valores de referência para riqueza dos inoculantes para gramíneas usados pela indústria baseiam-se na proposta feita pela RELARE de  $1,0 \times 10^8$  células por mililitro ou grama de produto (Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola, 2010).

É importante observar que o inoculante necessita apresentar uma alta concentração de células viáveis para que ocorra uma boa colonização da raiz. Para isso, são imprescindíveis uma estirpe eficiente e um ótimo veículo de inoculação. O número de bactérias deve ser o maior possível no momento da colonização, e para que isso ocorra, é necessário que o inoculante forneça um alto número de rizóbios viáveis ou utilize-se uma maior dosagem para

compensar as perdas entre a inoculação da semente e a nodulação efetiva (Brockwell, 1995; Schuh, 2005).

Em outros países, como na Austrália, embora não exista uma legislação específica que abranja normas de produção de inoculantes, praticamente todos sofrem controle de qualidade através do *Australian Legume Inoculants Research Unit* (ALIRU). Para satisfazer a aprovação da ALIRU, os inoculantes devem atender aos requisitos mínimos para os níveis de contaminação, utilizando sorologia e análise de DNA, número de unidades formadoras de colônia, e o mais importante, a capacidade de nodular leguminosas de forma eficaz. Além do controle de qualidade, o ALIRU mantém uma coleção de cerca de 1.700 estirpes de rizóbios e fornece culturas de estirpes recomendadas para fabricantes de inoculantes (Wakelin & Ryder, 2004).

No Canadá, os produtos inoculantes são classificados como suplemento sob a *Fertilizers Act* e estão sujeitos a registro e regulamentação. As informações necessárias para o registro incluem uma lista de materiais constitutivos, a garantia do número mínimo de rizóbios viáveis e a eficácia dos dados. A regulamentação é realizada através do *Canadian Legume Inoculant and Pre-Inoculated Seed Testing Program*. A implementação do programa em 1975 resultou em um aumento inicial rápido e significativo da qualidade dos produtos oferecidos aos agricultores canadenses. Este elevado nível de qualidade dos inoculantes tem-se mantido desde então (Rice & Clayton, 2005).

Diferentemente do Canadá, os Estados Unidos não têm uma abordagem nacional unificada para o registro de inoculantes. Este processo é

executado em cada Estado, separadamente. Cada Estado está liberado para a submissão de regulamentações próprias. Isso pode incluir parâmetros, tais como eficácia de ensaios, marcação ou licenciamento. Entretanto, ensaios a campo são regulamentados a nível nacional, mas apenas se o organismo de interesse for geneticamente modificado. Na maioria dos casos, inoculantes tradicionais não se enquadram nesta categoria. Em geral, os testes e a comercialização de um inoculante nos Estados Unidos são muito menos regulados que no Canadá e no Brasil. O importante, neste caso, é a familiarização das normas e regulamentos aplicáveis no Estado onde o inoculante será vendido (Thome, 2005).

Juntamente com o Brasil, a Argentina é um dos maiores produtores de inoculantes no mundo. Conta com uma legislação específica para o controle de qualidade, estipulada pelo SENASA (*Servicio Nacional de Sanidad Agraria*). Pesquisas sobre tecnologia de produção de novos inoculantes vêm sendo desenvolvidas, como por exemplo, o uso de *Azospirillum brasilense*, na maior instituição de pesquisa no ramo, o *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria* (INTA). Conjuntamente, novos critérios de controle de qualidade indicados pelo *Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola* (IMYZA) do INTA foram propostos, como a alteração do critério de nodulação das plantas (excluindo as raízes secundárias), e a inclusão da avaliação da cobertura das sementes pelo inoculante, como procedimento-controle (Racca & Ruiz, 2005).

Embora haja registro e controle oficial na Argentina, a qualidade dos inoculantes de soja vendido aos agricultores permanece questionável, pois não há controle sobre a estirpe utilizada. Além disso, constatou-se a presença

de altos níveis de contaminantes e a diminuição da concentração de células de *Bradyrhizobium japonicum* durante o armazenamento e distribuição (Benintende, 2010).

No Uruguai, a regulamentação e fiscalização são realizadas pelo *Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca* (MGAP), e apresenta legislação específica que contempla todo o processo produtivo, desde a escolha da estirpe até a distribuição do produto. O desenvolvimento de tecnologias de produção e controle é feito no *Laboratorio de Microbiología de Suelos y Control de Inoculantes*, pertencente ao próprio MGAP (Labandera & Mayans, 2005).

### **2.3.3 Métodos para o controle de qualidade de inoculantes**

A qualidade do inoculante é dependente do cuidado com o qual é fabricado, estocado e distribuído. Essa qualidade refletirá no número de células viáveis que permanecerão na semente, e conseqüentemente no sucesso da nodulação. Por isso, a chave para a produção de um inoculante de qualidade é a presença de um efetivo sistema de controle de qualidade.

A análise de inoculantes envolve a determinação do número de rizóbios viáveis para uma espécie apropriada por unidade de peso do veículo. Análises tradicionais são realizadas usando-se o Método do Número Mais Provável (NMP) em planta, na qual o inoculante diluído é aplicado na planta oriunda de semente tratada assepticamente, e o cálculo do número de rizóbios é feito cerca de três semanas após a inoculação. Um dos grandes problemas da técnica é o tempo despendido para o desenvolvimento do nódulo, gerando demora na obtenção dos resultados de contagem. Além disso, o procedimento

é incapaz de distinguir entre estirpes dentro de espécies de rizóbio (Olsen & Rice, 1989).

A avaliação da qualidade do inoculante usando-se a contagem de rizóbios viáveis é um índice preciso de uma inoculação potencial. Considerações numéricas são de tal importância para determinar a eficácia do inoculante que o controle de qualidade através da contagem de células é amplamente reconhecido (Hitbold, 1980; FAO, 1991; Brockwell & Bottomley, 1995).

Métodos de contagem em placas envolvem a colocação de uma amostra contendo células viáveis na superfície de um meio de cultura e a contagem das colônias resultantes, após um período de incubação. Caso o inóculo apresente um número muito grande de células viáveis, é necessário diluir a amostra antes da inoculação, para que o número de colônias apresente-se em uma faixa contável, situada entre 30 e 300 unidades formadoras de colônia (UFC) (Olsen et al., 1996).

O meio mais utilizado para a contagem de rizóbios é o Levedura-Manitol (LM), muitas vezes contendo vermelho congo para auxiliar na diferenciação de contaminantes de rizóbios. A quantidade de nutrientes pode variar e mesmo assim permitir o crescimento dos microrganismos (Burton, 1967; Vicent, 1970; Thompson, 1984). Estudos de Date (1972) e Skinner et al. (1977), por exemplo, demonstraram que níveis superiores a 3,5g/L de extrato de levedura mostraram efeitos deletérios sobre a cultura de rizóbio. De acordo com Keyser (1987), níveis de manitol abaixo de 1g/L são muitas vezes suficientes para suportar o crescimento dos microrganismos.

O primeiro passo para a contagem de células viáveis em qualquer inóculo de rizóbio ou inoculante é preparar uma série de diluições que contenha o intervalo que se espera de células viáveis. A mais comumente usada é a razão de diluição de 1:10, por etapa de diluição, cuja metodologia denomina-se Método de Diluição Seriada Decimal. A maioria dos trabalhos com rizóbios adota a proporção de 10g (de peso úmido) de inoculante turfoso para 90mL de diluente, gerando uma diluição de dez vezes. Para inoculante líquido, a proporção é de 1mL de inoculante para 9mL de diluente, gerando o mesmo fator de diluição (Olsen et al., 1996).

Um dos métodos para inoculação dos microrganismos em placa é denominado Método de Espalhamento em Superfície (*Spread Plate*). É o método mais confiável e geralmente usado de contagem em placas para enumeração de rizóbios. O método baseia-se na inoculação de um volume conhecido (geralmente 100 $\mu$ L) de uma diluição conhecida da amostra sobre a superfície do meio nutriente solidificado. Após incubação para crescimento, as colônias resultantes são contadas na diluição que apresente entre 30 e 300 colônias por placa. Relacionando-se o número de colônias, a diluição da amostra, e o volume inoculado, um número mínimo de células viáveis na amostra original pode ser calculado. Como são realizadas inoculações em placa entre três a cinco repetições, a quantidade de material e tempo investidos para inoculação e contagem tornam-se consideráveis, e o procedimento torna-se laborioso. No entanto, apresenta a vantagem de dar maior visibilidade aos contaminantes, facilitando sua contagem.

Outro método de inoculação existente, porém menos utilizado, denomina-se Método de Gota (*Drop Plate*). A técnica envolve o gotejamento de um volume conhecido (geralmente entre 20 e 30 $\mu$ L) da amostra diluída em meio nutriente. A gota não espalha-se e é absorvida pela superfície do meio. As colônias resultantes são contadas a partir da diluição que produzir o maior número de colônias não coalescentes, geralmente cerca de 20. A placa é geralmente marcada em oito seções para receber oito gotas. Quatro repetições de duas diferentes diluições de dez vezes pode ser acomodadas em uma única placa.

Uma limitação é sinalizada em estudos de Olsen et al. (1996), onde afirmam que é necessária mais prática para obter resultados consistentes com a técnica da gota do que com o método de espalhamento em superfície. Embora, se uma micropipeta é utilizada (fazendo-se uso de ponteiros descartáveis e medindo com precisão na faixa entre 20 e 30 $\mu$ L), as vantagens em economia de tempo e material são significativas.

No que se refere ao controle de qualidade das sementes inoculadas com o produto inoculante, a legislação não contempla a análise da sobrevivência dos rizóbios na semente em um período posterior ao momento da inoculação. Os testes existentes apenas analisam a concentração de células logo após a inoculação, o que não se reflete fielmente no campo no momento da semeadura, pois o agricultor geralmente a realiza em algumas horas ou até dias após adicionar o inoculante (Deaker et al., 2004).

Em relação ao controle de qualidade de inoculantes para gramíneas, não há uma legislação específica no Brasil que regulamente as metodologias

para esses produtos. Portanto, ainda que produzido comercialmente, as análises com fins de fiscalização baseiam-se em normas aplicáveis para inoculantes de leguminosas, geralmente soja.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras de inoculantes para leguminosas avaliadas foram fornecidas pelas empresas produtoras e armazenadas em geladeira à 4°C. Foram analisadas amostras de 12 produtos inoculantes para leguminosas, sendo cinco com formulação à base de turfa, seis líquida e uma líquida-turfosa, além de um inoculante para gramíneas, com formulação líquida. A relação dos produtos inoculantes analisados é apresentada na Tabela 1. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A metodologia baseou-se na Portaria nº 31, de 08 de junho de 1982, Capítulo IV, da legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para todas as análises, utilizaram-se os métodos de diluição seriada e contagem em placa para enumeração dos microrganismos.

Todas as operações foram realizadas em câmara de fluxo laminar, com utilização de materiais previamente esterilizados em autoclave por 30min, a 121°C e meio de cultura e soluções esterilizados por 15min. a 121°C. Ao longo de todo o processo de coleta das amostras, realização da diluição

seriada e inoculação, utilizaram-se equipamentos de proteção individual, como luvas cirúrgicas e máscara.

Tabela 1. Amostras dos produtos inoculantes analisados, formulações, cultura alvo e identificação das estirpes bacterianas.

Inoculantes	Cultura alvo	Microrganismos presentes	SEMIA
L1	soja	<i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i>	587 e 5079
L2	soja	<i>B. japonicum</i>	5079 e 5080
L3	soja	<i>B. japonicum</i>	5079 e 5080
L4	soja	<i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i>	587 e 5079
L5	soja	<i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i>	587 e 5079
L6	soja	<i>B. japonicum</i>	5079 e 5080
LA	milho e trigo	<i>Azospirillum brasilense</i>	AbV5 e AbV6
LT1	soja	<i>B. japonicum</i>	5079 e 5080
T1	soja	<i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i>	587 e 5079
T2	feijão	<i>Rhizobium tropici</i>	4088
T3	soja	<i>B. japonicum</i>	5079 e 5080
T4	cornichão	não informado	não informado
T5	soja	<i>B. japonicum</i>	5079 e 5080

Obs.: L: inoculante líquido; LA: inoculante líquido para gramíneas; LT: inoculante líquido-turfoso; T: inoculante turfoso

### 3.1 Coleta das amostras

Para se evitar contaminações durante o processo de retirada das amostras dos inoculantes, realizou-se a desinfestação da embalagem do produto inoculante com algodão embebido em álcool 70%, com atenção para o local de abertura.

Antes da coleta procedeu-se a agitação vigorosa da embalagem para homogeneizar o produto. Para os inoculantes líquidos e líquido-turfoso, retirou-se uma alíquota de 1mL do produto com o auxílio de uma micropipeta com ponteira de 1mL e transferiu-se para um tubo de ensaio com capacidade de 15mL contendo 9mL de solução estéril de NaCl (0,85%). Para os inoculantes turfosos, uma amostra de 10g do produto foi pesada e colocada em um frasco

graduado tipo Schott com capacidade para 200mL contendo 90mL de solução estéril de NaCl (0,85%).

### **3.2 Método de diluição seriada**

Foram retiradas alíquotas dos inoculantes líquidos e líquido-turfoso e colocada em tubo de ensaio com 9mL de solução estéril de NaCl (0,85%) estéril, produzindo a diluição  $10^{-1}$ . Para os inoculantes turfosos, retirou-se uma alíquota de 10g e colocou-se em frasco graduado tipo Schott contendo 90mL de NaCl (0,85%) estéril. Realizaram-se diluições decimais sucessivas até a diluição  $10^{-7}$ , com transferências sucessivas de alíquotas de 1mL entre tubos de ensaio contendo o mesmo diluente; para tanto, fez-se uso de mais seis tubos. Para cada transferência, uma nova ponteira foi utilizada para se evitar contaminações. Cada série de diluição seriada foi realizada em duplicata, onde uma série foi denominada subamostra A e a outra subamostra B.

Entre cada transferência das alíquotas, procedeu-se à agitação manual do tubo de ensaio (por meio de movimentos de vaivém utilizando-se as duas mãos, de modo vigoroso, por 50 vezes) a fim de proporcionar uma homogeneização mais eficiente entre a alíquota e o diluente. Para a homogeneização da diluição  $10^{-1}$  da amostra de inoculante turfoso, fez-se uso de um agitador orbital durante 20min. à 100rpm. E para a retirada de 1mL da diluição  $10^{-1}$  e transferência para o primeiro tubo para formar a diluição  $10^{-2}$ , fez-se uso de uma ponteira cortada na ponta para que o suporte do inoculante em suspensão não obstruísse a entrada do líquido na ponteira.

### 3.3 Método de inoculação e contagem de colônias em placas

Alíquotas de 0,1mL foram inoculadas em placas de Petri contendo Meio Levedura-Manitol (Adaptado de Vincent, 1970, Apêndice 1) usando-se o Método de Espalhamento em Superfície com alça de Drigalski. Foram realizadas triplicatas de cada uma das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ .

Inocularam-se alíquotas de 0,1mL das diluições seriadas das subamostras A e B, compondo um total de 18 placas por amostra. As placas foram incubadas à 28°C durante sete dias em estufa.

A contagem das unidades formadoras de colônia formadas na placas foi realizada utilizando contador de colônias. As placas que apresentavam entre 30 e 300 UFC foram avaliadas e os valores registrados. O número de UFC por mililitro ou grama de inoculante foi calculado a partir da média dos valores obtidos, através da seguinte fórmula:

$$N = \text{UFC} \times \text{FD} \times 10$$

Onde:

N = número de UFC por mililitro ou grama de inoculante;

UFC = número de UFC;

FD = fator de diluição.

O valor de multiplicação por 10 refere-se à unidade a ser multiplicada para extrapolação do número de células viáveis por mililitro.

### **3.4 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para leguminosas**

Fazendo uso das metodologias padrão descritas nos itens 3.1, 3.2 e 3.3 para contagem de microrganismos, procedeu-se à análise de alguns pontos da metodologia, dentre eles: efeito da forma de agitação do tubo de ensaio para realização do método de diluição seriada e efeitos do diluente utilizado nos tubos de ensaio e do método de inoculação em placa de Petri sobre o número de UFC contados nas placas.

Para a análise do efeito de diferentes formas de agitação dos tubos, avaliou-se a agitação em agitador tipo vórtex à 2000rpm por 10, 30, 40, 60 e 120 segundos, além da agitação manual conforme metodologia aplicada pela legislação vigente. Durante as agitações em vórtex teve-se o cuidado de gerar um turbilhão no interior do tubo para propiciar uma homogeneização mais efetiva, entretanto sem alcançar a tampa para evitar uma ocasional contaminação.

Dentre os tipos de diluentes, três foram testados: água destilada, solução de tween 80 (0,01%) e o diluente padrão indicado pela legislação, solução de NaCl (0,85%).

E como alternativa para a utilização do Método de Espalhamento em Superfície para inoculação dos microrganismos em placa, avaliou-se o Método da Gota (Miles & Misra, 1983). Neste método, uma placa foi dividida em seis setores, e em cada setor inoculou-se uma alíquota de 20µL de cada diluição das amostras. Cada subamostra (A e B) foi inoculada em triplicata perfazendo seis gotas, e, portanto, uma placa inteira para cada diluição. Como as diluições

$10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  foram inoculadas, para cada inoculante fez-se uso de três placas. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante sete dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando contador de colônias.

Utilizou-se a técnica de espalhamento como comparação por ser a metodologia recomendada pela legislação vigente. Alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  foram inoculadas em placas de Petri contendo meio LM e espalhadas na superfície do meio usando-se uma alça de Drigalski. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante sete dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando contador de colônias.

Para o Método de Espalhamento em Superfície, o número de UFC por mililitro ou grama de inoculante foi obtido nas amostras inoculadas a partir da diluição  $10^{-7}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \text{UFC} \times \text{FD} \times 10$$

E para o Método de Gota, o número de UFC por mililitro ou grama de inoculante foi obtido nas amostras inoculadas a partir da diluição  $10^{-7}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \text{UFC} \times \text{FD} \times 50$$

Onde:

N = número de UFC por mililitro ou grama de inoculante;

UFC = número de UFC;

FD = fator de diluição.

O valor de multiplicação por 50 refere-se ao número que deve ser multiplicado por 20 microlitros (volume pipetado em placa) para extrapolação do número de células viáveis por mililitro.

#### **3.4.1 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em sementes de soja**

A normativa do MAPA exige uma concentração mínima de 600.000 células de rizóbio por semente de soja. Neste sentido, foi realizada a análise de sobrevivência desses microrganismos ao longo do tempo em sementes inoculadas. Como até a data de realização do experimento não havia protocolo descrito na legislação para testes em sementes, utilizou-se a metodologia baseada no Anteprojeto de Instrução Normativa submetido à consulta pública através da Portaria nº340, de 28 de setembro de 2009 (MAPA, 2009). Foram realizados dois experimentos, um com uma amostra de inoculante líquido e outro com uma de inoculante turfoso.

Inicialmente procedeu-se a desinfestação de 100g de sementes através da imersão em álcool (70%) por 1min., imersão em hipoclorito de sódio (2,5%) por 1min. e sete lavagens sucessivas com água destilada estéril para eliminação de resíduos dos reagentes anteriores. Em seguida, as sementes foram depositadas em uma bandeja de polipropileno por 30min. para secagem do tegumento.

No experimento com o uso de inoculante líquido, 100g de sementes desinfestadas foram colocadas em um saco de polipropileno com capacidade para 1L. Adicionou-se uma alíquota de 0,5mL de inoculante e de forma

vigorosa realizou-se uma agitação manual para homogeneização e aderência do inoculante à semente. Em seguida, as sementes inoculadas foram depositadas em outra bandeja de polipropileno, para secagem durante 2h.

No experimento com inoculante turfoso, antes da inoculação as sementes desinfestadas foram recobertas com 0,6mL de solução açucarada (10%) para auxiliar na adesão da turfa. Imediatamente após, foram recobertas com 0,5g de inoculante turfoso, procedendo da mesma forma que o inoculante líquido até o final do experimento.

Após inoculação as sementes foram armazenadas em nove sacos de polipropileno, cada um contendo 100 sementes, por 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas, à temperatura ambiente. E para que se tivesse conhecimento da quantidade inicial de rizóbios/semente, realizou-se a recuperação dos rizóbios logo após a inoculação (denominado tempo 0h).

Para a recuperação dos rizóbios das sementes inoculadas, as 100 sementes contidas no saco de polipropileno foram colocadas em um frasco graduado tipo Schott com capacidade para 200mL contendo 100mL de solução estéril de tween 80 (0,01%) e colocadas sob agitação em agitador orbital por 15min. à 100rpm para homogeneização. Em seguida, a solução foi transferida para outro frasco de Durham estéril, e no frasco com as sementes remanescentes, foi adicionado mais 100mL de solução estéril de tween 80 (0,01%), submetendo-se a agitação por mais 15min. Após este período, a solução foi adicionada ao segundo frasco, perfazendo um volume de 200mL.

Esta solução representou a amostra bruta, a partir da qual retirou-se uma alíquota de 1mL e realizou-se diluição decimal seriada até a diluição  $10^{-4}$ .



A série de diluições foi repetida em duplicata, de forma a compor as subamostras A e B. Seis gotas de 20µL das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram inoculadas usando-se o Método de Gota em placas de Petri contendo meio LM. Cada diluição foi inoculada em triplicata para cada uma das subamostras A e B, totalizando 18 placas por inoculante por período de armazenamento avaliado. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante sete dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando o contador de colônias.

O número de rizóbios por semente foi calculado utilizando os valores de contagem de UFC obtidos nas amostras inoculadas a partir da diluição  $10^{-3}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \frac{\text{UFC} \times \text{FD} \times 200 \times 50}{100}$$

Onde:

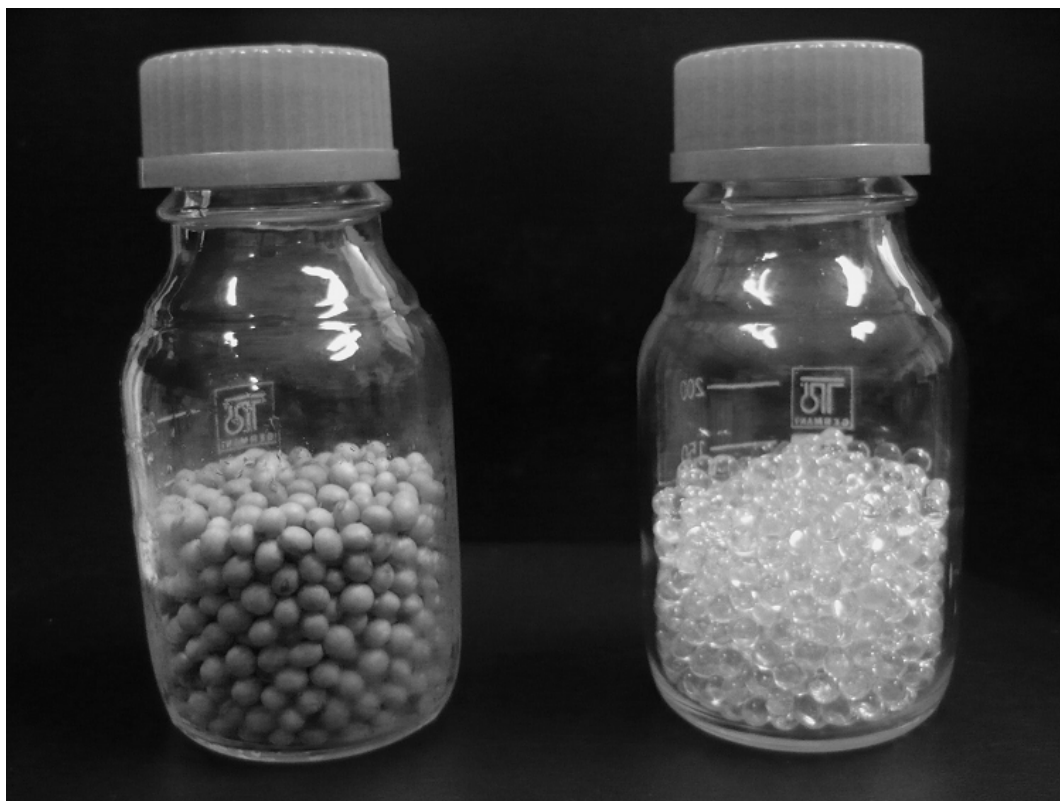
N = número de UFC por mililitro ou grama de inoculante;

UFC = número de UFC;

FD = fator de diluição.

### **3.4.2 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em esferas de vidro**

Neste experimento avaliou-se a recuperação de células viáveis de rizóbios de esferas de vidro inoculadas com amostras dos inoculantes estudados. Foram utilizadas esferas de vidro com 50mm de diâmetro que foram usadas em substituição às sementes de soja (Figura 1).



Fonte: A autora (2010).

Figura 1. Exemplo de uma amostra de sementes de soja (esquerda) e esferas de vidro (direita) utilizada no experimento de aderência dos rizóbios.

Neste experimento foram comparados quatro tratamentos, sendo eles: sementes recobertas com inoculante líquido, sementes recobertas com inoculante turfoso, esferas de vidro recobertas com inoculante líquido e esferas de vidro recobertas com inoculante turfoso.

As esferas de vidro foram previamente esterilizadas em autoclave por 30 min. à 121°C e as sementes de soja foram desinfestadas conforme metodologia descrita no item 3.4.1.

Como o volume de inoculante a ser adicionado depende da massa das sementes, realizou-se um cálculo para verificar o volume de inoculante que deveria inoculado em 100g de sementes de soja e 100g de esferas de vidro. O

cálculo foi baseado na indicação dos rótulos dos produtos de 250mL de inoculante líquido ou 250g de inoculante turfoso para 50Kg de sementes. Calculou-se que 100g de sementes de soja devem ser inoculadas com 0,5mL de inoculante líquido ou 0,5g de inoculante turfoso. Como uma esfera de vidro possui o dobro da massa de uma semente de soja, 100g de esferas continham a metade do número de sementes, e, portanto, foram inoculadas com a metade do volume de inoculante (0,25mL para inoculante líquido e 0,25g para inoculante turfoso). Para o inoculante turfoso, utilizou-se 0,3mL de solução açucarada.

Para cada um dos quatro tratamentos foram realizadas dez séries de diluições decimais até a diluição  $10^{-4}$ , compondo as subamostras A, B, C, D, E, F, G, H, I e J. Seis gotas de 20 $\mu$ L das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram inoculadas utilizando-se o Método de Gota em cada placa de Petri contendo meio LM para cada uma das dez subamostras, totalizando 30 placas por tratamento. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante sete dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando o contador de colônias.

O número de rizóbios por semente de soja e por esfera de vidro foi calculado utilizando-se os valores de contagem de UFC obtidos nas amostras inoculadas a partir da diluição  $10^{-3}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \frac{\text{UFC} \times \text{FD} \times 200 \times 50}{100}$$

Onde:

N = número de UFC por mililitro ou grama de inoculante;

UFC = número de UFC;

FD = fator de diluição.

### **3.5 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para gramíneas**

As metodologias aplicadas nos experimentos para controle de qualidade de inoculantes para gramíneas basearam-se na Instrução Normativa nº30, de 12 de novembro de 2010 (MAPA, 2010). Para todas as análises foram utilizadas amostras do inoculante para gramíneas (LA).

O meio NFb (Döbereiner et al., 1995, Apêndice 2) foi o meio de cultura utilizado pois o produto inoculante continha a bactéria *Azospirillum brasilense*.

#### **3.5.1 Adaptação de métodos de diluição e inoculação**

Fazendo-se uso das metodologias padrão descritas nos itens 3.1, 3.2 e 3.3 para contagem de microrganismos, procedeu-se a análise do efeito da forma de agitação do tubo de ensaio para realização do método de diluição seriada, dos efeitos do diluente utilizado nos tubos de ensaio e do método de inoculação em placa de Petri sobre o número de UFC contados nas placas.

Para a análise das formas de agitação dos tubos, testaram-se diferentes tempos de agitação (10, 30, 40, 60 e 120 segundos) em agitador tipo vórtex à 2000rpm, além da agitação manual aplicada de acordo com a

legislação. Dentre os tipos de diluentes, três foram testados: água destilada, solução de tween 80 (0,01%) e o diluente padrão indicado pela legislação, solução de NaCl (0,85%). E como alternativa para a utilização do Método de Espalhamento em Superfície para inoculação dos microrganismos em placa, foi proposto o Método de Gota.

Em cada um dos três experimentos a série de diluições foi repetida em duplicata, compondo as subamostras A e B. Seis gotas de 20 $\mu$ L das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram inoculadas usando-se o Método de Gota em placas de Petri contendo meio NFb. Cada diluição foi inoculada em triplicata para cada uma das subamostras A e B, totalizando 18 placas. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante três dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando contador de colônias.

No experimento do efeito do método de inoculação sobre o número de UFC em placa, utilizou-se a técnica de espalhamento como metodologia padrão. Alíquotas de 0,1mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  foram inoculadas em placas de Petri contendo meio NFb e espalhadas na superfície do meio usando-se uma alça de Drigalsky. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante três dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando contador de colônias.

Para o Método de Espalhamento em Superfície, o número de UFC por mililitro de inoculante foi obtido nas amostras inoculadas a partir da diluição  $10^{-6}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \text{UFC} \times \text{FD} \times 10$$

E para o Método de Gota, o número de UFC por mililitro de inoculante foi obtido nas amostras inoculadas a partir da diluição  $10^{-6}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \text{UFC} \times \text{FD} \times 50$$

Onde:

N = número de UFC por mililitro de inoculante;

UFC = número de UFC;

FD = fator de diluição.

### **3.5.2 Avaliação do número de células viáveis de diazotróficos em sementes de milho**

Para avaliação do número de células viáveis de bactérias diazotróficas recuperadas de sementes de milho inoculadas com o produto inoculante para gramíneas, foram utilizadas 200g de sementes de milho híbrido Bt 30F80 - Pioneer® (tratadas industrialmente com os fungicidas carboxin e thiram). As sementes foram desinfestadas seguindo-se a mesma metodologia descrita no item 3.4.2. Após a secagem, 200g de sementes desinfestadas foram colocadas em um saco de polipropileno com capacidade para 1L e recobertas com 0,8mL de inoculante, e então procedeu-se à agitação manual, de forma vigorosa, para uma boa homogeneização e aderência do inoculante à semente. Em seguida, as sementes inoculadas foram depositadas em uma bandeja de polipropileno para secagem durante 2h.

Como controle, realizaram-se os procedimentos de diluição e inoculação em placa logo após a inoculação das sementes, denominado tempo

0h. Os nove tempos de armazenamento foram de 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas após a inoculação das sementes. Foram colocadas 50 sementes em cada um de nove sacos de polipropileno de 1L e armazenadas à temperatura ambiente.

A série de diluições foi repetida em duplicata, compondo as subamostras A e B. Seis gotas de 20µL da amostra bruta e das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foram inoculadas usando-se o Método de Gota em placas de Petri contendo meio NFb. Cada diluição foi inoculada em triplicata para cada uma das subamostras A e B, totalizando 18 placas. As placas inoculadas foram incubadas à 28°C durante três dias em estufa, e ao fim do período realizou-se a contagem das UFC utilizando contador de colônias.

O número de rizóbios por semente de milho foi calculado utilizando os valores de contagem de UFC obtidos nas amostras inoculadas a partir da amostra bruta e das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  através da seguinte fórmula:

$$N = \frac{\text{UFC} \times \text{FD} \times 200 \times 50}{100}$$

Onde:

N = número de UFC por mililitro de inoculante;

UFC = número de UFC;

FD = fator de diluição.

### **3.6 Análise estatística dos dados**

Os dados de contagem obtidos foram transformados para  $\sqrt{x+1}$  tanto nos experimentos com métodos controle de qualidade de inoculantes para leguminosas quanto para o controle de qualidade de inoculantes de gramíneas. Os resultados foram submetidos à ANOVA e a comparação das médias foi realizada utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade por meio do software Assistat 7.6 beta (Silva, 2011).



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na comparação dos métodos de controle de qualidade de inoculantes avaliaram-se diferentes formas de agitação dos tubos de ensaio no método de diluição seriada, diferentes tipos de diluentes utilizados na metodologia de diluição seriada e a comparação entre o Método de Espalhamento em Superfície e o Método de Gota na inoculação em placa. Para o controle de qualidade de sementes inoculadas testaram-se a sobrevivência dos rizóbios ao longo do tempo de armazenamento das sementes e a utilização de esferas de vidro em substituição às sementes.

### **4.1 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para leguminosas**

Verificou-se o uma diferença no número de células viáveis por mililitro ou grama de inoculante dependendo da forma de agitação dos tubos. Entretanto, esta diferença não foi observada com relação ao tipo de diluente utilizado e com o método de inoculação. Houve uma diminuição do número de UFC por semente ao longo do tempo de armazenamento das sementes.

#### 4.1.1 Comparação dos métodos de diluição e inoculação

Na avaliação das diferentes formas de agitação em vórtex, observou-se, após análise estatística, uma diferença significativa entre o número de UFC entre os tempos testados. A comparação dos valores médios dos números de UFCs das amostras do inoculante líquido L1, selecionado aleatoriamente, mostrou que a agitação em vórtex durante 10s apresentou os melhores resultados, inclusive em relação ao procedimento baseado em agitação manual recomendado pela legislação (Figura 2).

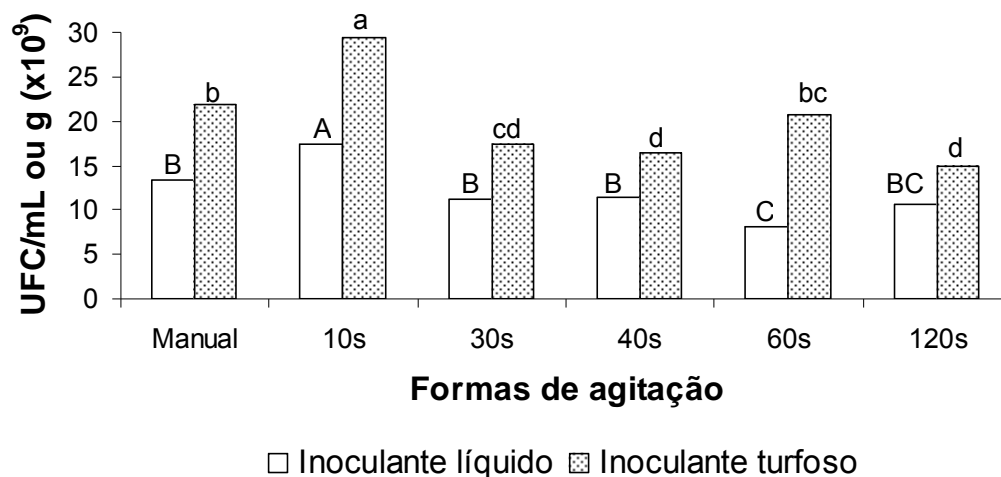


Figura 2. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/mL de uma amostra do inoculante líquido L1 e de unidades formadoras de colônia/g de uma amostra do inoculante turboso T3 submetidos a diferentes formas de agitação. Médias seguidas por letras maiúsculas ou minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultado semelhante foi constatado nos valores de contagem de UFCs obtidos na análise do inoculante turboso T3, selecionado aleatoriamente (Figura 2). A agitação por 10s em vórtex produziu melhores resultados em

relação às demais formas de agitação. A agitação manual e a agitação em vórtex durante 60s apresentaram valores semelhantes, entretanto, com maiores valores de contagens de UFCs quando comparadas às agitações por 30, 40 e 120s.

A recuperação do menor número de células viáveis nas diluições submetidas aos maiores tempos de agitação em vórtex pode ser devido a ação dos compostos presentes no inoculante, os quais apresentam a capacidade de formação de espuma quando sofrem agitação. De acordo com estudos de Rossi (2006), como um maior tempo de agitação gera uma maior quantidade de espuma no líquido contido no tubo, as células são capturadas nas bolhas da espuma e tornam-se inacessíveis para serem coletadas e diminuindo a concentração de células na fração líquida.

Analisando-se conjuntamente os números de células viáveis de amostras dos inoculantes líquidos obtidos por agitação manual e em vórtex por 10s, observou-se que os números de UFCs obtidos com a agitação manual não diferiram dos obtidos com o uso de agitação em vórtex por 10s para os inoculantes líquidos L1, L3, L4, L5 e LT1 (Figura 3). No entanto para as amostras dos inoculantes líquidos L2 e L6 a recuperação das células fazendo uso de agitação manual foi superior, provavelmente em razão do tipo de formulação empregada na fabricação destes inoculantes. Logo, os diferentes resultados podem ser explicados de acordo com o veículo de produto inoculante, o qual apresenta atributos físico-químicos e físico-mecânicos distintos, como pH, viscosidade, presença de cargas elétricas, que podem influenciar na sobrevivência dos rizóbios no inoculante.

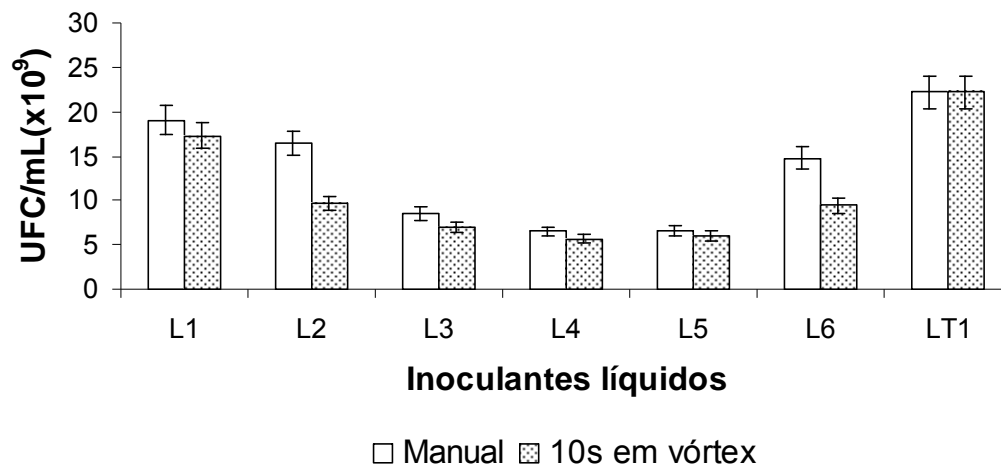


Figura 3. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6 e LT1) submetidas a agitação manual e agitação em vórtex por 10s. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade.

Na análise conjunta dos números de UFCs recuperadas dos inoculantes turfosos, observou-se que nas amostras dos inoculantes T1, T2 e T3 os valores foram semelhantes tanto na utilização de agitação manual como de agitação em vórtex por 10s (Figura 4). Não foi possível realizar a contagem das UFC nas amostras dos inoculantes T4 e T5 devido à presença de alta concentração de contaminantes nas placas, impedindo a visualização das colônias de *Bradyrhizobium*.

Estes resultados indicam que utilização de agitação em vórtex por 10s pode substituir a agitação manual na suspensão das amostras de inoculantes nos tubos de diluição seriada tanto para inoculantes líquidos como para os turfosos. Desta forma, sugere-se a utilização do método de agitação em vórtex durante 10s, pois se mostrou como a técnica mais prática para ser utilizada no controle de qualidade de inoculantes.

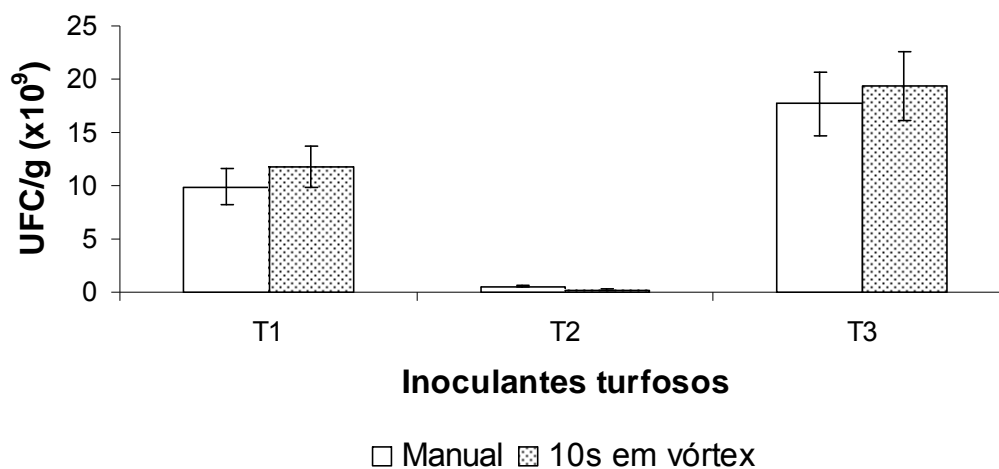


Figura 4. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos (T1, T2 e T3) submetidas a agitação manual e agitação em vórtex por 10s. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade.

Na avaliação de diferentes diluentes no método de diluição seriada após cálculo da média entre sete amostras de inoculantes líquidos, verificou-se que a utilização de água destilada e solução salina (0,85%) proporcionaram a maior concentração de bactérias por mililitro de inoculante (Figura 5). A solução de tween 80 (0,01%), em contrapartida, gerou uma contagem menor no número de UFC por mL. O efeito observado com o uso de tween como diluente foi verificado no estudo de Buck & Cleverdon (1961), onde a adição de 20ppm de tween 80 em meio de cultura inibiu o crescimento das bactérias inoculadas. Os autores inferem também que variações no procedimento de agitação dos tubos podem prejudicar a homogeneização do diluente, interferindo na ação do tween nas células.

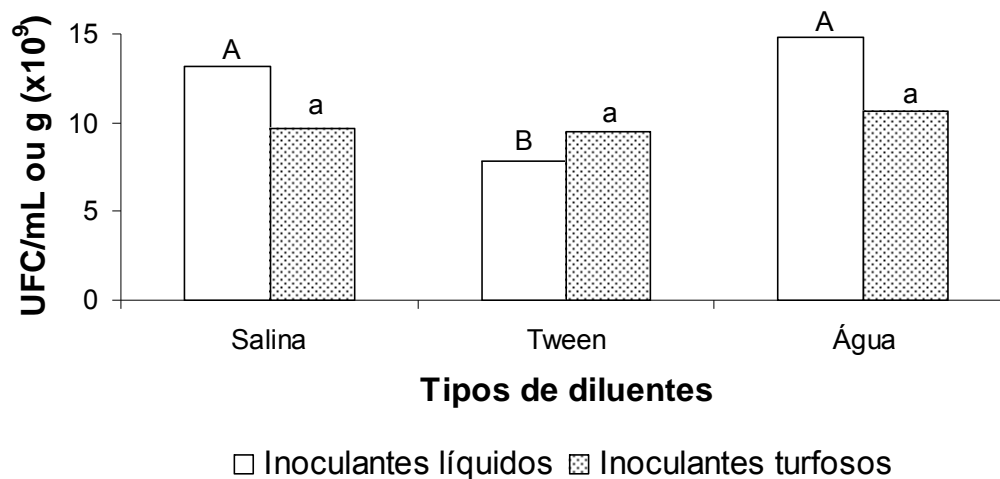


Figura 5. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela média das contagens do número de unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos e de unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos utilizando diferentes diluentes no método de diluição seriada. Médias seguidas por letras maiúsculas ou minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não verificou-se diferença significativa na utilização de tween no inoculante turfoso quando comparada à solução salina e à água destilada. (Figura 6). Na avaliação de todos os inoculantes líquidos, a utilização de água destilada possibilitou a recuperação de maior número de células viáveis por mL de inoculante para as amostras dos inoculantes L2, L3, L5 e LT1, portanto, para a maioria dos produtos (Figura 6). Para os inoculantes L1, L4 e L6, a solução salina (0,85%) recuperou o maior número de células viáveis. Em contrapartida, a solução de tween 80 (0,01%) gerou a contagem dos menores valores de células por mL para todos os inoculantes, com exceção de L1.

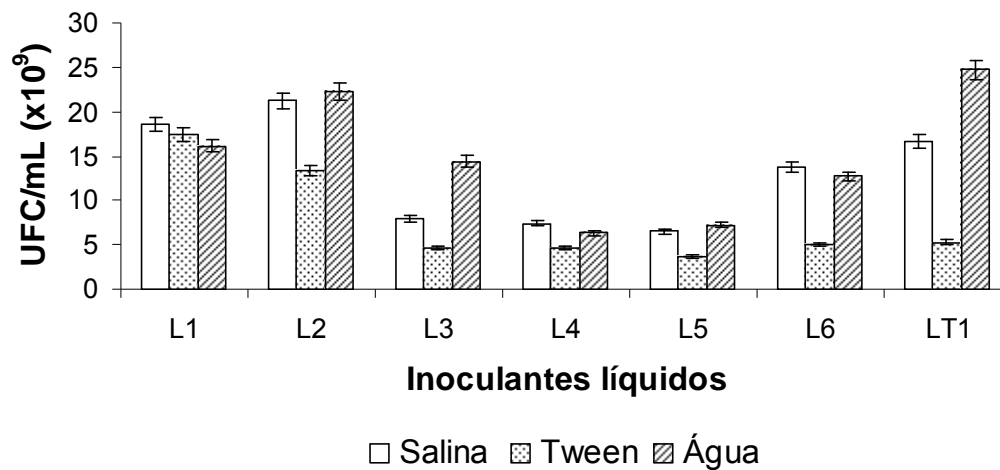


Figura 6. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6 e LT1) utilizando diferentes diluentes no método de diluição seriada. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade.

Resultado distinto foi observado quanto aos diluentes com melhor desempenho na recuperação de células viáveis nos inoculantes turfosos (Figura 7). No caso do inoculante T1, não houve diferença entre a utilização de salina e água destilada, mas verificou-se que a solução de tween apresentou a menor concentração de bactérias. Para amostras do inoculante T2 a solução de tween gerou o maior número de rizóbios (embora não graficamente observável, pois apresentou a contagem de UFC em  $10^8$ ) e para T3 não houve diferença em todos os diluentes testados. Não foi possível realizar a contagem das UFC nas amostras dos inoculantes T4 e T5 devido à presença de alta concentração de contaminantes nas placas, impedindo a visualização das colônias de *Bradyrhizobium*.

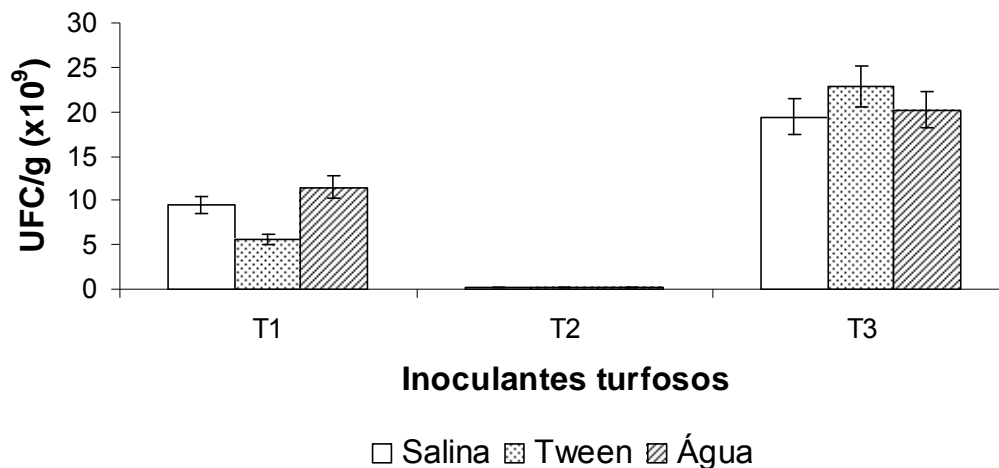


Figura 7. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos (T1, T2 e T3) utilizando diferentes diluentes no método de diluição seriada. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade.

As diferenças ocorridas entre os diluentes que apresentaram o maior número de células viáveis de acordo com o tipo de inoculante analisado podem ser explicadas pela presença de compostos distintos no veículo do inoculante, como citado no teste de diferentes formas de agitação.

Por outro lado, apesar da diferença estatística detectada entre a solução de tween (0,01%) e a solução salina (0,85%) e a água destilada, podem não haver diferenças reais no que se refere ao controle de qualidade de inoculantes, onde o tipo de análise estatística empregado apresentou um refinamento não aplicável neste tipo de experimento. As variações dos dados encontradas entre os diluentes podem não ser suficientes para afirmar que houve diferença entre salina, tween e água, quando comparadas às variações decorrentes da fisiologia dos microrganismos e do processo de realização da metodologia de controle de qualidade.



Desta forma, pela ausência de diferença significativa entre os diluentes testados, sugere-se o uso de água destilada para a realização da metodologia de diluição seriada por sua praticidade quando utilizada no controle de qualidade de inoculantes.

Na comparação entre o Método de Espalhamento em Superfície e o Método de Gota para inoculação em placa dos microrganismos das amostras analisadas de sete inoculantes líquidos, não se observou diferença estatística significativa entre os métodos de inoculação em placa (Figura 8).

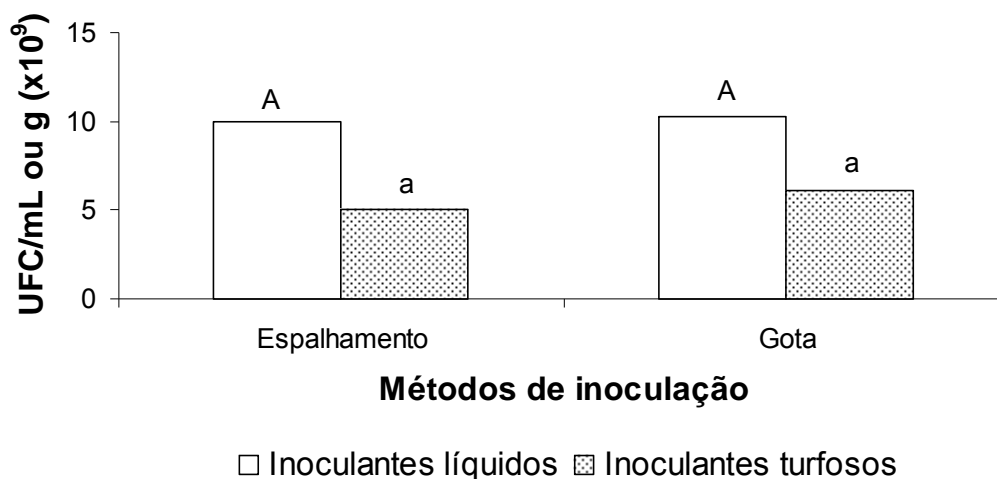


Figura 8. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela média das contagens do número de unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos e das unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos utilizando diferentes técnicas de inoculação em placa. Médias seguidas por letras maiúsculas ou minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultado semelhante foi observado para os inoculantes turfosos analisados, pois na média entre todos os produtos testados, não houve diferença significativa entre os métodos de inoculação (Figura 8). Resultados similares foram encontrados por Hoben & Somasegaran (1982) com a análise

de 10 inoculantes turfosos, onde a contagem de células viáveis para o Método de Espalhamento em Superfície e o Método de Gota apresentou valores entre  $8,8 \times 10^{10}$  e  $10,1 \times 10^{10}$ , e entre  $8,7 \times 10^{10}$  e  $10,1 \times 10^{10}$  células por grama de inoculante, respectivamente, demonstrando que ambas metodologias produzem valores semelhantes para contagens de UFC em placas.

A análise conjunta de todos os inoculantes mostra que, em média, o número de células viáveis recuperado das amostras de inoculantes líquidos e turfosos (Figuras 9 e 10, respectivamente) não difere com o uso dos métodos de inoculação em placas por espalhamento em superfície ou pelo método de gota. Sugere-se, então, que o Método de Gota seja utilizado para inoculação das bactérias tanto para avaliação da qualidade de inoculantes líquidos quanto para inoculantes à base de turfa, por ser mais prático e econômico em termos de material empregado e tempo para a realização da técnica.

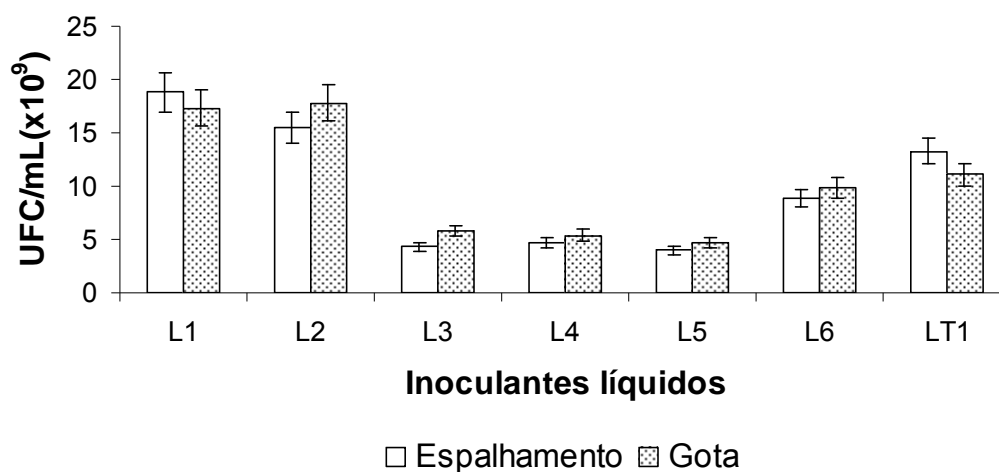


Figura 9. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/mL de sete amostras de inoculantes líquidos (L1, L2, L3, L4, L5, L6 e LT1) utilizando diferentes técnicas de inoculação em placa. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade.

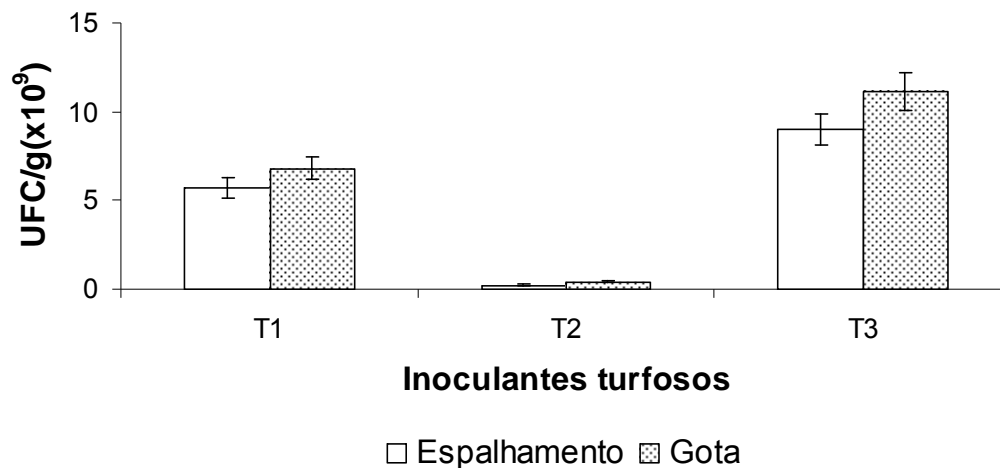


Figura 10. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número unidades formadoras de colônia/g de três amostras de inoculantes turfosos (T1, T2 e T3) utilizando diferentes técnicas de inoculação em placa. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade.

#### 4.1.2 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em sementes de soja

No experimento utilizando inoculante líquido, ao longo do tempo de armazenamento pôde-se observar que houve uma diminuição significativa do número de bactérias que sobreviveram na superfície da semente (Figura 11). Após seis horas, ocorreu redução de uma unidade logarítmica no número de rizóbios, e o mesmo padrão deu-se após 12, 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

Com exceção da concentração inicial de microrganismos (tempo zero), o número de bactérias permaneceu abaixo do valor permitido pela legislação até o final do experimento.

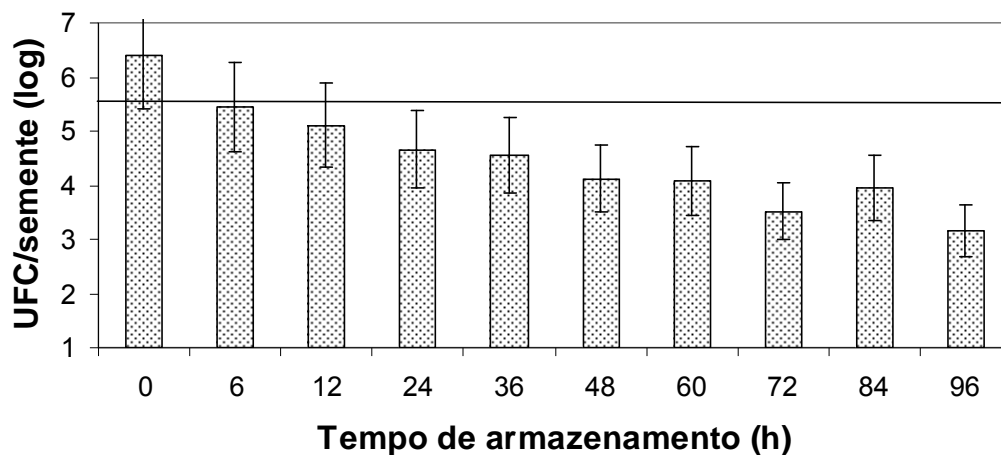


Figura 11. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/mL de uma amostra do inoculante líquido L1 em sementes de soja armazenadas por 96 horas. A linha de corte representa o valor mínimo exigido pela legislação de 600.000 células/semente. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade. Dados em escala logarítmica.

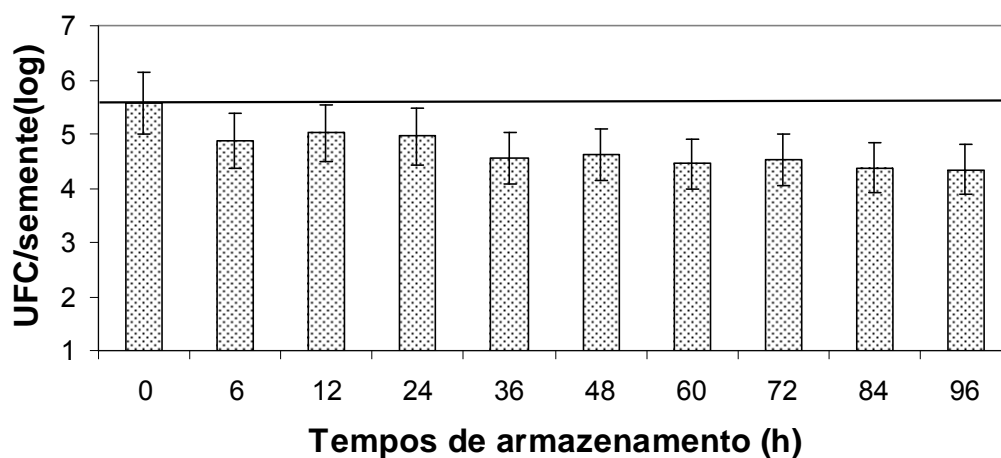


Figura 12. Recuperação de células viáveis de rizóbios avaliadas pela contagem do número de unidades formadoras de colônia/g de uma amostra do inoculante turboso T3 em sementes de soja armazenadas por 96 horas. A linha de corte representa o valor mínimo exigido pela legislação de 600.000 células/semente. As barras verticais representam o desvio padrão a 95% de probabilidade. Dados em escala logarítmica.

No teste com um inoculante turfoso (Figura 12), houve a redução de uma unidade logarítmica de células por semente após 6 horas de armazenamento das sementes. Ao longo do tempo observou-se uma redução significativa do número de rizóbios, chegando a valores próximos a 10.000 células/semente em 96 horas de armazenamento.

Roughley et al. (1993) também relataram uma alta mortalidade de *Bradyrhizobium* spp. com redução de uma unidade logarítmica do número de rizóbios após uma hora de inoculação sobre a semente. Esta redução atingiu duas unidades logarítmicas após quatro horas de armazenamento, e mais três unidades após um dia no solo. E o mesmo padrão de decréscimo foi encontrado por Catroux et al. (1996) utilizando inoculantes contendo *Bradyrhizobium japonicum* misturados a microgrânulos minerais, estes utilizados como carreadores do inoculante quando aplicado no sulco de semeadura.

É necessário que a população de rizóbios mantenha-se em uma concentração elevada por semente, pois dela depende a ocorrência de uma nodulação efetiva nas raízes da planta. A aplicação de  $10^6$  rizóbios nas sementes foi necessária para garantir 90% de nodulação eficaz, de acordo com trabalhos de Ireland & Vincent (1968). Além disso, Thies et al. (1991a) relataram um efeito positivo da inoculação em oito leguminosas, onde a população de rizóbios do solo apresentou valores entre 10 e 100 células por grama de solo. Os mesmos autores propuseram um modelo para prever a resposta à inoculação e descobriram que 59% da variação em produtividade poderia ser explicada pelo número de rizóbios presentes no solo no momento

da semeadura (Thies et al. 1991b). Hume e Blair (1992) relataram um incremento de 15-25% no rendimento da cultura da soja em grãos por meio do aumento na taxa de inoculação de  $10^5$  para  $10^6$  rizóbios/semente.

Portanto, há a necessidade de inoculação com alto número de rizóbios viáveis a fim de superar a competição com populações de rizóbios ineficientes já presentes no solo, além de aumentar a probabilidade de gerar uma elevada concentração de células onde as condições do solo são limitantes para a sobrevivência desses microrganismos.

#### **4.1.3 Avaliação do número de células viáveis de rizóbios em esferas de vidro**

A comparação entre a recuperação de células viáveis de rizóbios de produtos inoculantes, inoculados sobre sementes e esferas de vidro, mostrou diferença no número de UFCs (Tabela 2). As sementes proporcionaram uma maior sobrevivência dos microrganismos no inoculante líquido, no entanto, esse não foi o resultado observado no inoculante turfoso, pois se verificou uma maior concentração de células por unidade de material nas esferas de vidro em relação às sementes de soja.

As diferenças no número de células viáveis recuperadas entre os materiais podem ser devido as diferentes características de superfície entre a semente de soja e a esfera de vidro. A superfície mais porosa da semente quando comparada à da esfera pode ter interferido na adesão do inoculante líquido, proporcionando a maior concentração de bactérias por semente. Outro fator que dever ser considerado é a maior ação da dessecação do inoculante

líquido quando em contato com a esfera de vidro do que quando em contato com a semente.

No caso do inoculante turfoso, o maior número de UFCs recuperados na esfera de vidro poderia ser explicado pela solução adesiva que é utilizada neste tipo de inoculante para que a turfa seja aderida mais eficientemente na superfície da semente. A solução açucarada utilizada poderia apresentar, neste caso, maior capacidade de aderência do inoculante turfoso na esfera de vidro do que na semente.

O tipo de formulação do inoculante líquido e do turfoso também pode ter influenciado a adesão do produto nos diferentes materiais, pois alguns compostos presentes nos inoculantes podem manter a sobrevivência dos rizóbios em semente por maior período de tempo. Segundo Vargas & Suhet (1980), por exemplo, quando a mistura de goma-arábica (40%) e sacarose (25%) foi adicionada ao inoculante na proporção 1:1, houve uma maior sobrevivência de rizóbios do que a mistura simples do inoculante com água.

Tabela 2. Comparação entre os números de células viáveis recuperadas (UFCs) por unidade de produto inoculante aplicado sobre sementes de soja e esferas de vidro.

	Inoculante líquido	Inoculante turfoso
Sementes de soja	$3,5 \times 10^7$ A	$0,7 \times 10^7$ b
Esferas de vidro	$2,8 \times 10^7$ B	$0,9 \times 10^7$ a

Obs.: Letras maiúsculas e minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar da diferença observada, ambos os materiais possibilitaram a recuperação de número de células viáveis de rizóbios dos produtos inoculantes dentro dos limites exigidos pela legislação atual. E como apresentado na

análise de diferentes tipos de diluentes na metodologia de diluição seriada, devido ao excessivo refinamento do teste estatístico empregado, as variações entre os dados obtidos para o número de UFC por semente de soja ou esfera de vidro pode não representar uma diferença real e significativa quando realizado o controle de qualidade de inoculantes em semente.

## **4.2 Metodologias de controle de qualidade de inoculantes para gramíneas**

Na proposta de metodologias para controle de qualidade de inoculantes para gramíneas através da utilização dos métodos de diluição seriada, inoculação em placa e contagem não foi observada diferença entre os formas de agitação dos tubos, nem entre os diluentes e métodos de inoculação testados. Verificou-se uma diminuição do número de células viáveis após armazenamento durante seis horas de sementes inoculadas com produto inoculante.

### **4.2.1 Adaptação de métodos de diluição e inoculação**

No teste realizado com diferentes formas de agitação em vórtex verificou-se o intervalo entre  $3,8 \times 10^8$  e  $4,3 \times 10^8$  células viáveis por mililitro de inoculante. Após análise estatística, observou-se que não houve diferença significativa entre todos os tempos de agitação, incluindo o exigido pela legislação, por meio de agitação manual. Desse modo, recomenda-se a utilização do vórtex como equipamento no auxílio do processo de homogeneização do inoculante para gramíneas com o diluente na metodologia



de diluição seriada. E como todos os tempos de agitação geraram uma contagem semelhante de UFC por mL, o emprego do tempo de agitação durante 10s mostra-se como a forma mais rápida e prática para o operador.

Após análise dos diferentes tipos de diluentes, observou-se que a solução salina (0,85%) e a água destilada proporcionaram uma concentração de células significativamente maior, quando comparadas à solução de tween 80 (0,01%), com valores de  $4,0 \times 10^8$ ,  $3,8 \times 10^8$  e  $2,9 \times 10^8$  células por mL de inoculante, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos nos experimentos com inoculantes para leguminosas, no qual o uso de tween pode influenciar no crescimento das bactérias.

Por outro lado, as características de parede celular dos microrganismos também podem influenciar em seu comportamento quando imersos em solução diluente. Estudos realizados por Burdman et al. (2000) na análise da concentração relativa de cinco dos principais carboidratos presentes nos polissacarídeos extracelulares (EPS) de quatro estirpes de *Azospirillum brasilense* sugeriram que a arabinose presente no EPS pode desempenhar um importante papel na determinação da capacidade de agregação da bactéria, bem como no processo de floculação. Portanto, este açúcar pode interferir de maneira significativa na adesão entre as células bacterianas, dificultando sua liberação na solução, e conseqüentemente, subestimando os resultados de contagem.

Na comparação entre métodos de inoculação em placa para contagem de microrganismos não foi constatada diferença estatística significativa entre o Método de Espalhamento em Superfície e o Método de

Gota, com  $1,1 \times 10^8$  e  $1,2 \times 10^8$  células por mililitro de inoculante, respectivamente. Desta forma, sugere-se que a técnica de gota seja utilizada por sua praticidade de execução e pelo fato de ser um método que exige menor consumo de tempo e material de laboratório.

#### **4.2.2 Avaliação do número de células viáveis de diazotróficos em sementes de milho**

Na avaliação da sobrevivência das bactérias aderidas na semente de milho ao longo de um período de 96 horas, a partir da concentração inicial de 1.100 células por semente, notou-se a drástica redução do número de células após 6 horas de armazenamento, com valores médios de 8,3 células por semente. Doze horas após a inoculação, e até o final do experimento, a contagem dos microrganismos foi nula para todas as diluições e repetições inoculadas.

A ocorrência desta redução brusca na sobrevivência das células de *A. brasilense* nas sementes de milho pode ser explicada pela presença de fungicidas com o qual as sementes foram tratadas. O contato com os pesticidas pode influenciar a viabilidade das bactérias, subestimando a concentração real de células presentes nas sementes inoculadas.

Logo, a ação negativa dos fungicidas aplicados no tratamento de sementes de milho sobre os microrganismos presentes nos inoculantes prejudica os resultados obtidos no controle de qualidade.

Portanto, para a otimização do protocolo de controle de qualidade de inoculantes para leguminosas contido na Instrução Normativa nº 30, de 12 de

novembro de 2010 (MAPA, 2010), recomenda-se a utilização de agitação em vórtex durante 10s e de água destilada no método de diluição seriada, bem como o Método de Gota como metodologia de inoculação em placa para contagem de rizóbios. Para o controle de qualidade de sementes inoculadas recomenda-se realizar a avaliação logo após a inoculação das sementes, e utilizar esferas de vidro em substituição às sementes.

Da mesma forma, indica-se um protocolo para controle de qualidade de gramíneas, por meio da metodologia de diluição seriada decimal usando vórtex para agitação dos tubos de ensaio durante 10s e água destilada como diluente padrão. O Método de Gota apresenta-se como mais indicado para inoculação em placa. Para controle de qualidade em sementes de milho inoculadas, recomenda-se não utilizar sementes tratadas com fungicidas na análise do número de células viáveis para que haja subestimação da concentração de diazotróficos.

## 5. CONCLUSÕES

1 – A agitação das diluições em vórtex durante 10s é a técnica mais indicada para a realização da metodologia de diluição seriada decimal.

2 – A água destilada é o diluente preferencial para ser utilizado na recuperação de células viáveis de produtos inoculantes usando-se a metodologia de diluição seriada decimal.

3 – O método de inoculação em placas por espalhamento em superfície pode ser substituído pelo método de gota na análise da riqueza de produtos inoculantes.

4 – A avaliação do número de células em sementes de soja inoculadas com os produtos inoculantes deve ser realizada imediatamente após a inoculação.

5 – Sementes de soja podem ser substituídas por esferas de vidro na avaliação do número de células viáveis de rizóbios.

6 – As técnicas utilizadas para a avaliação da qualidade de inoculantes para leguminosas podem ser utilizadas na avaliação do número de células de diazotróficos de produtos inoculantes para gramíneas.

7 – A avaliação do número de células viáveis de inoculantes aplicados sobre sementes de milho tratadas com fungicidas é fortemente prejudicada pelos fungicidas contidos na semente.

## 6. REFERÊNCIAS

A inoculação de leguminosas: aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. Brasília: ano 1, n.3, nov./dez, 1997. Suplemento.

ANPII, 2010. Fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijão: fundamentos e resultados recentes. IN: I Simpósio de Nutrição e Adubação da Cultura do Feijão: Piracicaba, ESALQ/USP. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/homesite/default.asp>. Acesso em 14/03/2011.

BARCELOS, A.O., VILELA L. Leguminosas forrageiras tropicais: Estado de arte e perspectivas futuras. In: **Simpósio Internacional de Forragicultura**, 1994, Maringá, Anais... Maringá: UEM/SBZ, Jul, 1994, p. 1-56.

BENINTENDE, S. Calidad de inoculantes comerciales para el cultivo de soja en la Argentina: concentración de rizobios viables y presencia de contaminantes. **Revista Argentina de Microbiología**. v.42, p.129-132, 2010.

BROCKWELL, J. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**. v. 174, p.143-180, 1995.

BROCKWELL, J., Bottomley, P. J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**. v.27, p.683-697, 1995.

BUCK, J. D., CLEVERDON, R. C. The effect of tween 80 on the enumeration of marine bacteria by the spread and pour plate methods. **Limnology and Oceanography**. v.6, n°.1, p.42-44, 1961.

BURDMAN, S., JURKEVITH, E., SORIA-DÍAZ, M. E., SERRANO, A. M. G., OKON, Y. Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. **Microbiology Letters**. v. 189, p.259-264, 2000.

BURTON, J. C. 1967. Rhizobium culture and use. **Microbial Technology**. Reinhold, New York. pp. 1-33.

CÂMARA, G. M. S. Inoculação das sementes de soja. IN: CÂMARA, G.M. S. **Soja: tecnologia de produção**. Piracicaba: [s.n.], 1998, p.278-293.

CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.141-155, 1992.

CATROUX, G., REVELLIN, C., HARTMANN, A. Practical aspects of legume inoculation: inoculant quality and inoculation efficacy. Consequences for the soil microflora. *In Seminario microorganismos utiles para la agricultura y la forestacion Acts*, 1996, mayo 10–22, La Pampa. Eds. LAICH, F., GONZALES, N., ECHEVERRIA, H. p.108–125, INTA/CERBAS, Balcarce, Argentina. 1996.

CHUEIRE, L.M. O., BANGEL, E., FERREIRA, M.C., GRANGE, L., CAMPO, R.J., MOSTASSO, F.L., ANDRADE, D.S., PEDROSA, F.O., HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa. 2000. 32p.

DATE, R. A. Sources and quantities of yeast extract for growth of rhizobia. **Journal of Applied Bacteriology**. v.35, p.379-387, 1972.

DEAKER, R., ROUGHLEY, R.J., KENNEDY, I.R. Legume seed inoculation technologyda review. **Soil Biology and Biochemistry**. v.36, p.1275–1288, 2004.

DÖBEREINER, J., DE-POLLI, H. **Diazotrophic rhizocoenoses**. London: Academic Press, p.301-334, 1980.

DÖBEREINER, J., BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília:EMBRAPA – SPI: Itaguaí, RJ:EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

FAO report, 1991. **Report on the expert consultation on legume inoculant production and quality control** (19-21 March, 1991, Rome). Food And Agriculture Organization of the United Nations. *Edited by*: J. A. Thompson. 145 pp.

FRANCO, A.A. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja no Brasil: Uma lição para o futuro**. Seropédica: EMBRAPA-SPI, 2009. p.23-24.

GARRITY, G. M.; HOLT, J.G. The road map to the manual. In: BOONE, D.R.; CATENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York: Springer-Verlag, v.1, p.119-166, 2001.

GARRITY, G.M.; LILBURN, T.G.; COLE, J.R.; HARRISON, S.H.; ENZEBY, J.; TINDALL, B.J. **Taxonomic outline of bacteria and archaea (TOBA) Release 7.7**. Michigan: Michigan State University, p. 112-147, 2007. disponível em: < <http://www.taxonomicoutline.org/>>. Acesso em: 02 fev. 2011.

GOMEZ, M.; SILVA, N.; HARTMANN, A.; SAGARDOY, M.; CARTROUX, G. Evaluation of commercial soybean inoculants. **World Journal of Microbiology and Biothecnology**, v.13, p.167-173, 1997.

HITBOLD, A. E., THURLOW, D. L.; SKIPPER, H. D. Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. **Agronomic Journal**. v.72, p.675-681, 1980.

HOBEN, H. J., SOMASEGARAN, P. Comparison of pour, spread and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. In inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**. v.44, n.5, 1982.

HUME, D. J., BLAIR, D. H. Effect of numbers of *Bradyrhizobium japonicum* applied in commercial inoculants on soybean seed yield in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**. v.38, p.588-593, 1992.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação Biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja. 2001. 48p. (Circular Técnica. Embrapa Soja, ISSN 1516-7860, n.35)

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

JARDIM-FREIRE, J.R.; VERNETTI, F.J. A pesquisa com soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.5, p.117-126, 1999.

KEYSER, H. H. 1987. The role of culture collections in biological nitrogen fixation. In **Symbiotic Nitrogen Fixation Technology**. Edited by G. H. Elkan. Marcel Dekker, New York. pp. 413-428.

KEYSER, H.H. et al. Rhizobial ecology and technology. In: METTING, F.B. (Ed.) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**, New York: Marcel Decker, 1992. p.205-226.

LABANDERA, C.; MAYANS, M. Control de calidad de inoculantes: tecnologías aplicadas. 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.24.



LOMBARDI, M.L.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. **O Agrônomo**. v.51, n.1, 1999.

MAGALHÃES, F. M., BALDANI, J. I. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anuário da Academia Brasileira de Ciências**. v.55, p.417-429, 1983.

MATERON, L.A.,WEAVER, R.W. Inoculant maturity influences survival of rhizobia on seed. **Applied and Environmental Microbiology**. v.49, p.465–467, 1985.

MERCANTE, F.M., STRALIOTTO, R., DUQUE, F.F., FRANCO, A.A. **A Inoculação do feijoeiro comum com rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia – CNPBS. 1992. 8p.

MILES, A.A., MISRA, A.A. The estimation of the bacterial power of blood. **Journal of Hygiene**. v.38, p.732-749, 1938.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Portaria nº 31 de 08 de junho de 1982 – Capítulo IV**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n. 126 de 14 de junho de 1982.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa nº 5 de 10 de agosto de 2004 – Anexo I**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n. 153 de 10 de agosto de 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Portaria nº 340 de 28 de setembro de 2009**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n. 188 de 01 de outubro de 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa nº 30 de 12 de novembro de 2010**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, n. 4 de 17 de novembro de 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras:UFLA, 2006. 729p.

OLSEN, P.E., RICE, W.A. *Rhizobium* sp. strain identification and quantification in commercial inoculants by immnoblots analysis. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, n.2, p.520-522, 1989.

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

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.

RACCA, R., RUIZ, O. A. Legislación y normativa sobre comercialización y control de calidad de inoculantes para la agricultura en Argentina 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.6.

REUNIÃO DA REDE DE LABORATÓRIOS PARA RECOMENDAÇÃO, PADRONIZAÇÃO E DIFUSÃO DE TECNOLOGIAS DE INOCULANTES MICROBIOLÓGICOS DE INTERESSE AGRÍCOLA, 2010. Bonito. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2010. p.65-71.

ROSSI, M. J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator airlift**. (Doutorado em Engenharia Química), UFSC, 2006. 188p.

ROUGHLEY, R. J., GEMELL, L. G., THOMPSON, J. A., BROCKWELL, J. The number of *Bradyrhizobium* sp. (lupinus) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin. **Soil and Biology Biochemistry**. v.25, p.1453–1458, 1993.

RICE, W.A., CLAYTON, G.W. **Maintaining inoculant quality standards**. IN: INOCULANT FORUM 2005. Agriculture & Agri-Food Canada. Disponível em: <http://www.inoculantforum.com/abstracts.html>. Acesso em: 21/04/2009.

SANTILLANA, N., ARELLANO, C., ZÚÑIGA, D. Capacidad del *Rhizobium* sp. de promover el crecimiento en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller). **Ecología Aplicada**. v.4, p.47-51, 2005.

SCHUH, C.A. **Biopolímeros como suporte para inoculantes**. (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), UFRGS, 2005. 81p.

SILVA, F. A. S. Assistat versão 7.6 beta. **Programa de análise estatística**. 2011. Disponível em: <http://www.assistat.com/>.

SINGLETON, P., KEYSER, H., SANDE, E., 2002. Development and evaluation of liquid inoculants. In: Herridge, D. (Ed.), Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. **ACIAR Proceedings**. 109e, pp. 52–66.

SKINNER, F.; ROUGHLEY, R. J.; CHANDLER, M. R. Effect of yeast extract concentration on viability and cell distortion in *Rhizobium* sp. **Journal of Applied Bacteriology**. v.43, p.287-297, 1977.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia: Methods in legume rhizobium technology**. New York: Springer Verlag, 1994, 450p.

STEPHENS, J.H.G., RASK, H.M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**. v.65, p.249–258, 2000.

THIES, J. E., SINGLETON, P. W., BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.19–28, 1991a.

THIES, J. E., SINGLETON, P. W., BOHLOOL, B. B. Modelling symbiotic performance of introduced rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. **Applied and Environmental Microbiology**. v.57, p.29–37, 1991b.

TITTABUTR, P., PAYAKAPONG, W., TEAUMROONG, N., SINGLETON, P.W., BOONKERD, N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**. v.33, p.69–77, 2007.

THOME, D. Registration and testing of inoculants in the U.S. IN: **INOCULANT FORUM 2005**. Philom Bios Inc. Disponível em: <http://www.inoculantforumcom/abstracts.html>. Acesso em: 26/04/2009.

THOMPSON, J. A. 1984. Production and quality control of carrier-based legume inoculants. **Information Bulletin Nº. 17**. Patancheru, A.P., India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.

VARGAS, M. A. T., SUHET, A. R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.15, p.343-347, 1980.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of the root-nodule bacteria**. International Biological Programme Handbook No.15. Blackwell Scientific Publications, Ltd., Oxford, 1970.

WAKELIN, S.A., RYDER, M. H. Plant growth-promoting inoculants in Australian agriculture. **Crop Management Reviews**. St. Paul. March 2004. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/australia/> Acesso em: 26/04/2009.

WEIR, B. S. The current taxonomy of rhizobia. **New Zealand rhizobia website**. Disponível em: <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Última atualização em: 21 de outubro de 2010. Acesso em 28/02/2011.

## 7. APÊNDICES

**Apêndice 7.1** Meio de cultura Levedura-Manitol (Adaptado de Vincent, 1970):

Manitol.....	5,0g
Extrato de levedura.....	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
Ágar.....	15,0g
Solução de Vermelho Congo* .....	10mL
Água destilada.....	1000mL

\*0,25g em 100mL de água destilada

Ajustar o pH na faixa entre 6,8 – 7,0.

**Apêndice 7.2** Meio de cultura NFb (Döbereiner et al., 1995)

Ácido málico.....	5,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2g
NaCl.....	0,1g
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O.....	0,02g
Solução de azul de bromotimol <sup>A</sup> .....	2mL
Solução de micronutrientes <sup>B</sup> .....	2mL
Solução de Fe.EDTA 1,64% <sup>C</sup> .....	4mL
Solução de vitaminas <sup>D</sup> .....	1mL
KOH.....	4,5g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1000mL

Ajustar o pH na faixa entre 6,5 – 6,8.

A - solução de azul de bromotimol:

Azul de bromotimol.....	0,5g
KOH 2N.....	11,2g
Água destilada.....	100mL

## B – Solução de micronutrientes:

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	1,0g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O.....	1,175g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .....	1,4g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O.....	0,04g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	1,2g
Água destilada.....	200mL

## C - Solução de Fe.EDTA 1,64%:

Fe EDTA.....	1,64g
Água destilada.....	100mL

Manter a solução em geladeira após preparo. Refazer a cada 20 dias.

## D – Solução de vitaminas:

Biotina.....	10mg
Pyridoxol-HCl.....	20mg
Água destilada previamente esterilizada.....	100mL

As vitaminas devem ser dissolvidas em banho-maria entre 60-70°C e filtradas. Manter a solução em geladeira após preparo. Refazer a cada 20 dias.