

Viabilidade do inoculante turfoso produzido com bactérias associativas e molibdênio¹

Viability of peat inoculum produced with associative bacteria and molybdenum

Salomão Lima Guimarães^{2*}, Vera Lúcia Divan Baldani³ e Jorge Jacob-Neto⁴

RESUMO - Dentre os veículos de inoculação de bactérias diazotróficas, o turfoso é considerado o mais utilizado no Brasil. A turfa possibilita a viabilidade de um grande número de células, protegendo-as também das adversidades do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do inoculante turfoso desenvolvido com bactérias diazotróficas associativas e molibdênio. As bactérias BR11417 (*Herbaspirillum seropedicae*) e BR11340 (*Burkholderia* sp.), foram multiplicadas por um período de 24 horas e uma alíquota de 10 mL com 10^8 cel. mL⁻¹ foi transferida para sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa. Foram adicionadas duas doses e duas fontes de molibdênio: 1,12 e 2,25 g de molibdato de sódio e de amônio, respectivamente. Como controle, foi utilizado o inoculante sem molibdênio. A legislação brasileira, por meio da lei n° 86955, especifica que os inoculantes comerciais à base de micro-organismos fixadores de nitrogênio apresentem concentrações mínimas de 10^8 células viáveis por grama do produto no momento do uso e que a viabilidade das células seja mantida por um período mínimo de seis meses. Este estudo mostrou que sem a adição do molibdênio ao inoculante, as bactérias sobreviveram com um número de células viáveis em torno de 10^8 células g⁻¹ de inoculante, por um período de até 110 dias. Com a adição do molibdênio, o inoculante manteve-se viável por um período de 180 dias. A aplicação do molibdênio contribuiu para o aumento da viabilidade do inoculante turfoso produzido com as estirpes BR11417 e BR11340.

Palavras-chave: Bactérias. Inoculação. Molibdênio.

ABSTRACT - Among the vehicles in use for diazotroph inoculation, peat is considered the most-widely used in Brazil. Peat makes possible the viability of a large number of cells, at the same time protecting them from adversities found in the soil. The objective of this study was to evaluate the viability of peat inoculum developed with diazotroph bacteria and molybdenum. The bacteria BR11417 (*Herbaspirillum seropedicae*) and BR11340 (*Burkholderia* sp.) were allowed to multiply for a period of 24 hours, and a sample of 10 ml with 10^8 cel. mL⁻¹ was transferred to polypropylene bags containing 35 g of peat. Two dosages and two sources of molybdenum were then added: 1.12 and 2.25 g of sodium molybdate and ammonium molybdate respectively. Inoculum with no molybdenum was used as control. With law No. 86955, Brazilian legislation specifies that commercial inoculants based on nitrogen-fixing microorganisms have minimum concentrations of 10^8 viable cells per gram of product at the time of use, and that viability of the cells be maintained for a period of at least six months. This study showed that without the addition of molybdenum to the inoculum, bacteria survived with a viable-cell total of about 10^8 cells g⁻¹ of inoculum for a period of up to 110 days. With the addition of molybdenum, the inoculum remained viable for a period of 180 days. The application of molybdenum contributes to the increased viability of peat inoculum produced with the bacterial strains BR11417 and BR11340.

Key words: Bacteria. Inoculation. Molybdenum.

*Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 08/08/2011; aprovado em 05/06/2012

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ

²Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Rondonópolis/ICAT, Rodovia Rondonópolis-Guiratinga, km 06, Rondonópolis-MT, Brasil, 78.735-901, slguimaraes@ufmt.br

³Embrapa Agrobiologia, Seropédica-RJ, Brasil, 23.890-000, vera@cnpab.embrapa.br

⁴Departamento de Fitotecnia, Instituto de Agronomia/UFRRJ, Seropédica-RJ, Brasil, 23.890-000, jacob@ufrj.br

INTRODUÇÃO

O nitrogênio atmosférico pode ser reduzido a compostos amoniacais que podem ser aproveitados pelas plantas. Este processo é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN), sendo realizado apenas por micro-organismos procariotos que possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase, composta basicamente por duas unidades: a ferro-molibdênio e a ferro-proteína (DIXON; KAHN, 2004; VESSEY; PAWLOWSKI; BERGMAN, 2004.). Esses organismos são conhecidos como diazotróficos e podem apresentar maior eficiência de FBN na presença da nitrogenase, que contem molibdênio (YATES; SOUZA; KAHING, 1997).

Alguns gêneros compostos por micro-organismos diazotróficos como o *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, dentre outros, são capazes de formar associações mutualistas com algumas espécies vegetais, principalmente leguminosas, apresentando estruturas especializadas denominadas de nódulos (WILLEMS, 2006). No entanto, outros grupos de diazotróficos formam associações não mutualistas (diazotróficos associativos) com diversas famílias botânicas, dentre elas as gramíneas, localizando-se em tecidos como o córtex radicular, xilema, protoxilema e em folhas e colmos (BALANCHADAR *et al.*, 2007). Apesar de pouco explorado, há um grande potencial de uso desses diazotróficos associativos na agricultura.

A inoculação com bactérias diazotróficas em plantas de importância agrícola já era utilizada desde o século XIX (HUNGRIA, *et al.*, 1994). Contudo, no final da década de 1920, houve a introdução da turfa como veículo para a produção de inoculantes comerciais, passando a ser um dos substratos mais utilizados em todo o mundo (SMITH, 1997), por apresentar alto teor de matéria orgânica e preservar elevado número de células viáveis por longos períodos.

No Brasil, mais de 90% dos inoculantes produzidos são para a soja, com uma produção em média de 12 milhões de doses por ano, sendo 72% com turfa, 18% líquidos e 10% feitos com pó molhável (ARAÚJO; HUNGRIA, 1999; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Apesar de a maioria dos inoculantes no país ser à base de turfa, esta é frequentemente importada, uma vez que a turfa brasileira não é considerada de boa qualidade além de ser um recurso natural pouco frequente (BUCHER; REIS, 2008).

Para que as bactérias com alto potencial de FBN cheguem viáveis até o produtor agrícola, são necessários veículos de inoculação capazes de mantê-las biologicamente ativas. A legislação brasileira torna obrigatório que os inoculantes devam ser capazes de manter uma concentração mínima de 10^8 células viáveis por grama do produto por um período de 180 dias.

Assim, a nossa hipótese foi que a adição do molibdênio ao inoculante turfoso aumenta a viabilidade de bactérias diazotróficas associativas por um período de 180 dias. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar a sobrevivência das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia* sp. em inoculante a base de turfa contendo molibdênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas as estirpes de bactérias diazotróficas associativas BR11417 e BR11340, as quais têm demonstrado elevado potencial para a FBN, sendo consideradas bastante promissoras na produção de um inoculante para plantas não leguminosas (FERREIRA; BALDANI; BALDANI, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2010). A estirpe BR11417 foi isolada de raízes desinfestadas de arroz e pertence à espécie *Herbaspirillum seropedicae*. Esta espécie apresenta baixa sobrevivência quando inoculada em solos naturais ou até mesmo esterilizados, podendo ser cultivada em meio JNFb semi-sólido, com temperatura ótima em torno de 34 °C e pH variando de 5,3 a 8,0. A estirpe BR11340 pertence ao gênero *Burkholderia*, e foi isolada de raízes lavadas de arroz. Desenvolve-se bem em meio JMV semi-sólido, com temperatura ótima em torno de 30 °C e pH 5,0 (BALDANI *et al.*, 1997).

Para o preparo do inoculante, o veículo utilizado foi a turfa nacional, a qual teve o pH corrigido para 7,0 com carbonato de cálcio. Em seguida, foi esterilizada duas vezes em autoclave a 120 °C durante 20 minutos, com um intervalo de 24 h entre cada esterilização.

As estirpes foram multiplicadas em erlenmeyer contendo 50 mL do meio DYGS (composição por litro: 2,0 g ácido málico, 2,0 g glucose, 1,5 g peptona bacteriológica, 2,0 g extrato de levedura, 0,5 g fosfato de potássio monobásico, 0,5 g sulfato de magnésio, 1,5 g ácido glutâmico) por um período de 24 h. O pH do meio de cultura foi ajustado para 6,0 para a estirpe BR11417 (*H. seropedicae*) e 5,0 para a estirpe BR11340 (*Burkholderia* sp.). O número de células viáveis foi determinado por meio da técnica do número mais provável - NMP (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), cujos valores encontrados foram de 10^8 células mL⁻¹.

O inoculante foi preparado em sacos de polipropileno contendo 35 g de turfa. Em cada saco foram adicionados 10 mL do caldo bacteriano contendo 10^8 células mL⁻¹ de cada estirpe. Após o preparo do inoculante, foram adicionadas duas doses de molibdênio: 1,12 e 2,25 g adaptadas de (CAMPO; LANTMANN, 1997), na forma de molibdato de sódio (Na₂MoO₄·2H₂O) e molibdato de amônio

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$), respectivamente. Após esta etapa, o inoculante foi colocado para incubar à 30 °C por um período de 24 horas para a etapa de maturação. Em seguida, foi mantida temperatura a 4 °C, por um período de até 230 dias.

A viabilidade das células bacterianas no inoculante foi avaliada por meio de contagens a cada 15 dias, utilizando-se a técnica do NMP, descrita por Döbereiner, Baldani e Baldani, 1995.

Os dados obtidos das contagens foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de significância e também à análise de regressão, sendo utilizado o software estatístico SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A turfa é um veículo de inoculação que possibilita a manutenção de um elevado número de células viáveis, além de servir como proteção contra as adversidades do solo (LUPWAYI; RICE; CLEYTON, 2005). No entanto, devido à falta de informações sobre o tema proposto, surgiu a necessidade de se avaliar a sobrevivência de bactérias diazotróficas associativas no inoculante turfoso contendo molibdênio.

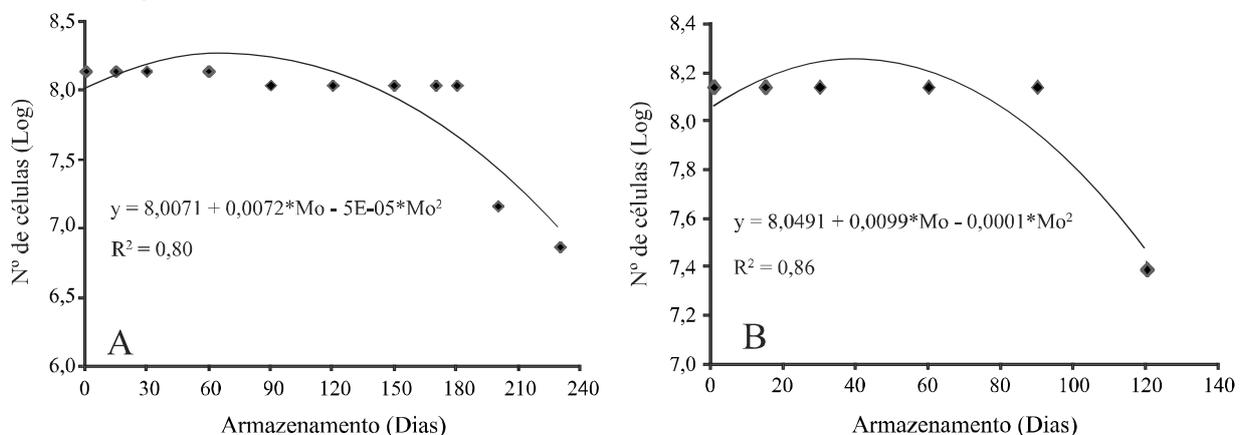
Um fator importante relacionado à produção de um inoculante diz respeito ao tempo de sobrevivência das bactérias. De acordo com a legislação brasileira inoculantes comerciais à base de micro-organismos fixadores de nitrogênio devem apresentar concentrações mínimas de 10^8 células viáveis por grama do produto por um período mínimo de seis meses. Neste trabalho, foram observados resultados promissores quanto ao potencial de sobrevivência das células bacterianas no inoculante turfoso.

A contagem do número de células viáveis (NMP) presentes no inoculante demonstrou que, sem a adição do molibdênio ao inoculante turfoso, as estirpes BR11417 e BR11340 sobreviveram com um número de células viáveis em torno de 10^8 por grama de inoculante, por um período de até 110 dias (Figura 1A e B). Resultados similares foram encontrados em outros trabalhos. Avaliando-se a sobrevivência de bactérias diazotróficas em diferentes turfas, o número de células viáveis foi mantido por um período inferior a 180 dias quando utilizado a turfa nacional (FERREIRA; BALDANI; BALDANI, 2010). Já o número satisfatório (10^8) de células viáveis da estirpe Am15 de *Azospirillum amazonense* foi mantido apenas por um período de até 15 dias após a inoculação em turfa (SILVA *et al.*, 2009).

No estudo de seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas associativas em duas variedades de arroz, ao avaliar a sobrevivência da estirpe BR11340, Ferreira, Baldani e Baldani (2010) verificaram que somente o inoculante produzido com a turfa importada do Canadá estava de acordo com a lei. Os autores ressaltaram que de maneira geral, os tratamentos que utilizaram a turfa importada apresentaram maior sobrevivência das estirpes de bactérias diazotróficas, quando comparados com os tratamentos inoculados na turfa nacional, podendo ter ocorrido em função das diferenças existentes entre teores de nutrientes e a origem do material dos substratos turfosos. No trabalho desenvolvido por Ferreira *et al.* (2003), visando à seleção de veículos para inoculação de bactérias diazotróficas associativas em arroz, mesmo sem a presença do molibdênio, o inoculante turfoso foi capaz de manter a viabilidade celular e promover aumentos na produção de grãos das variedades IR42 e IAC4440.

As avaliações da viabilidade celular no inoculante turfoso com a adição de molibdênio, na dosagem de 1,12 g de molibdato de sódio por cada 35 g de turfa, mostraram que o

Figura 1 - Viabilidade de *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417 (A) e *Burkholderia* sp., estirpe BR11340 (B) em inoculante turfoso sem a adição de molibdênio. *: $P < 0,05$



número de células viáveis das estirpes BR11417 e BR11340 mantiveram-se acima de 10^8 células g^{-1} de inoculante por 180 dias com posterior decréscimo (Figura 2A e B). Entretanto, quando foi utilizada a dosagem maior de molibdato de sódio ao inoculante (2,25 g), a sobrevivência da estirpe BR11417 de *H. seropedicae* superou os 180 dias preconizados pela legislação brasileira, começando a decrescer a partir de 200 dias. Já a estirpe BR11340 de *Burkholderia* sp., apresentou viabilidade maior que a BR11417, diminuindo a viabilidade no inoculante a partir de 210 dias (Figura 2C e D).

Na dosagem de 1,12 g de molibdato de amônio a estirpe BR11417 apresentou queda no número de células viáveis antes dos 180 dias de armazenamento do inoculante (Figura 3A). No entanto, comportamento diferente foi observado na estirpe BR11340 que, utilizando a mesma dosagem de molibdato de amônio, manteve a viabilidade celular por um período superior a 180 dias (Figura 3B). As

duas estirpes mantiveram a viabilidade celular em consonância com a legislação na dosagem de 2,25g de molibdato de amônio, sugerindo que doses de até 1,12g dessa fonte de molibdênio não é suficiente para manter a sobrevivência da estirpe de o *H. seropedicae* (Figura 3C e D).

A sobrevivência das bactérias está relacionada ao veículo utilizado para a produção do inoculante. Assim, a turfa seja considerada como um recurso natural não renovável, ainda constitui um dos melhores veículos para a produção de inoculantes no Brasil. Porém, deve-se obedecer alguns critérios como, por exemplo, alta retenção de umidade, ausência de toxidez para a bactéria, baixo custo, assim como uma boa adesão às sementes (SMITH, 1992). Lorda *et al.* (2007) observaram que a adição de goma xantana a inoculantes preparados com turfa que apresenta alta capacidade de retenção de umidade não afetou a sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Sinorhizobium fredii*.

Figura 2 - Viabilidade de *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417 (A e C) e *Burkholderia* sp., estirpe BR11340 (B e D) em inoculante turfoso contendo 1,12 g (A e B) e 2,25 g (C e D) de molibdênio sob a forma de molibdato de sódio. *: P < 0,05

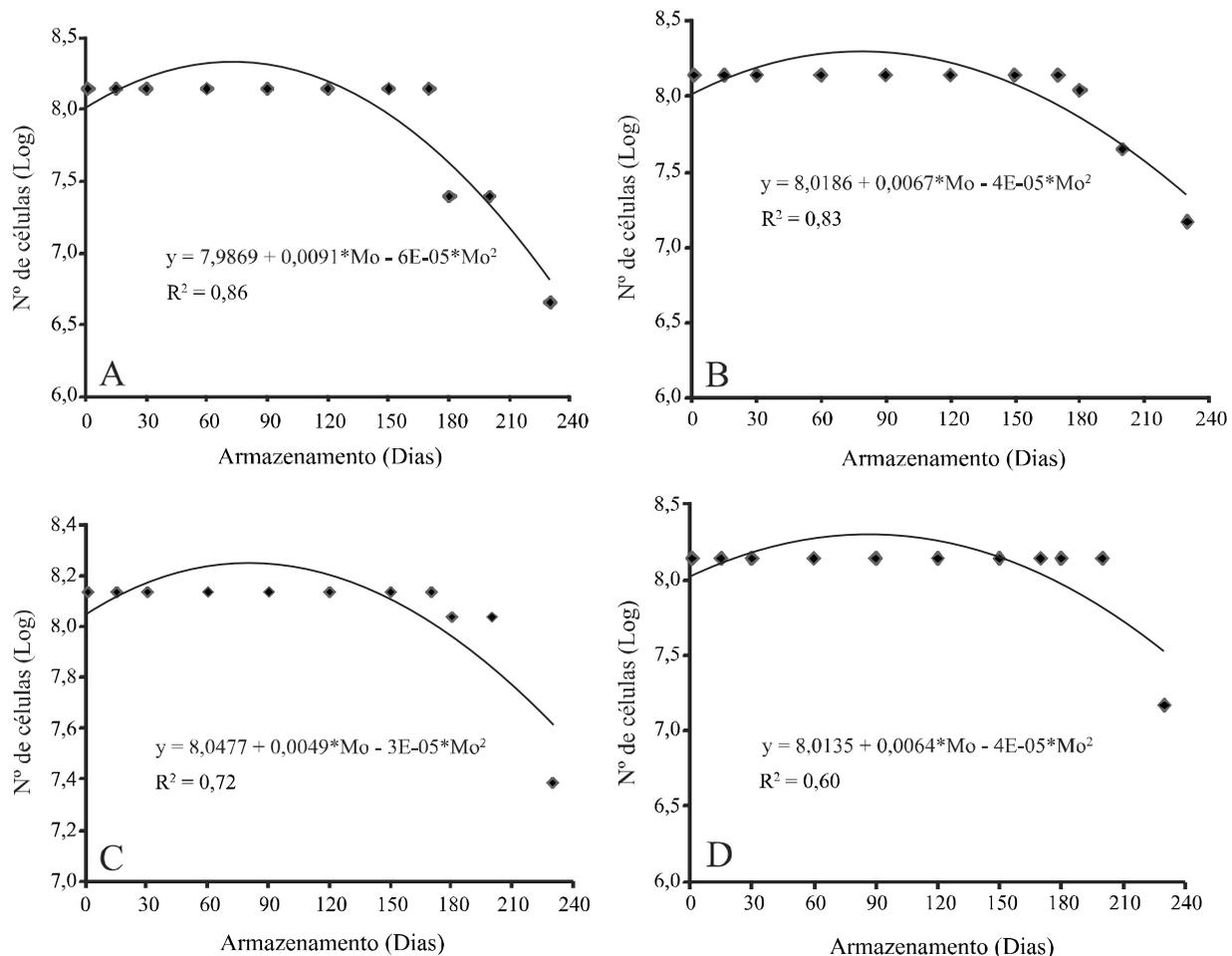
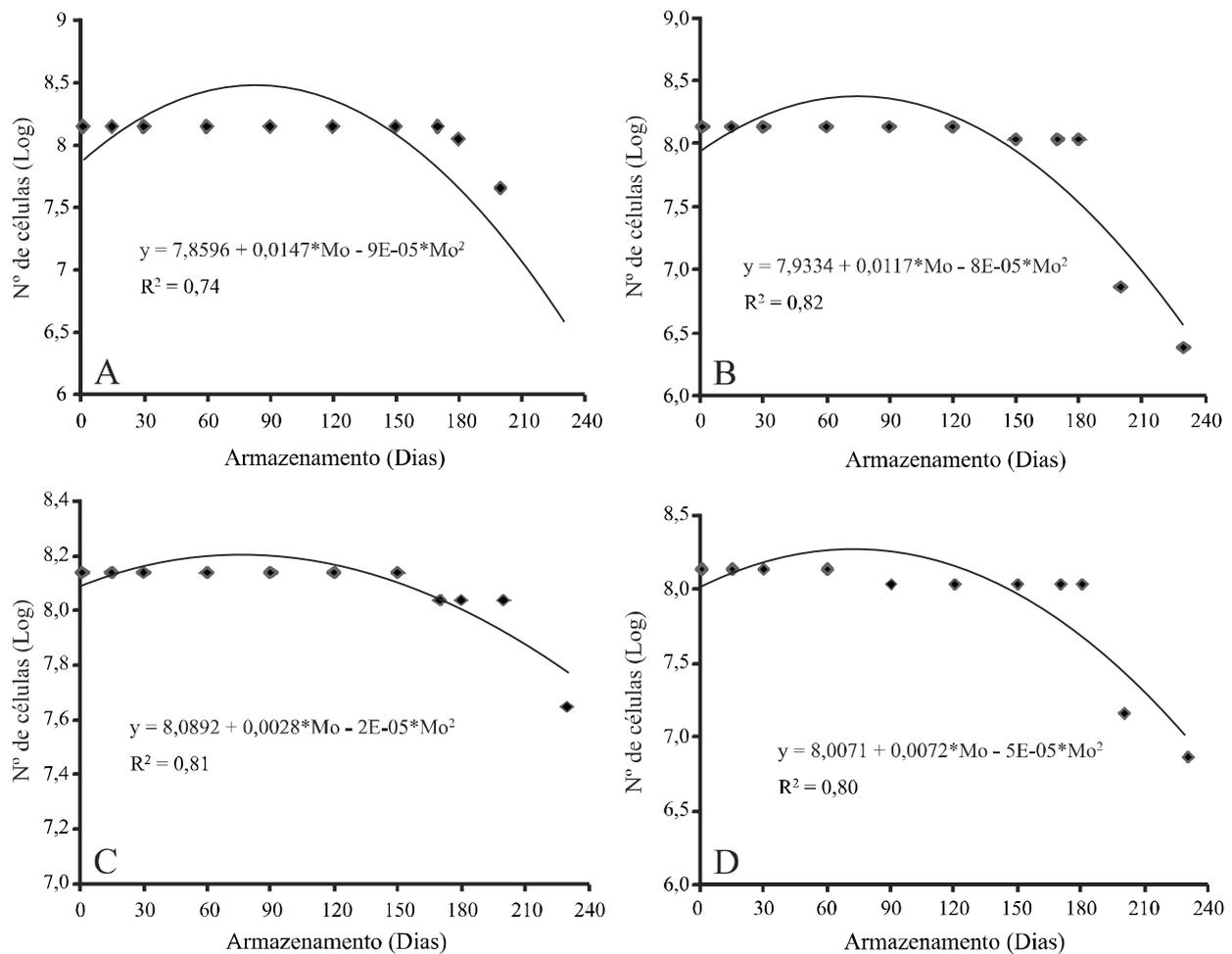


Figura 3 - Viabilidade de *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR11417 (A e C) e *Burkholderia* sp., estirpe BR11340 (B e D) em inoculante turfoso contendo 1,12 g (A e B) e 2,25 g (C e D) de molibdênio sob a forma de molibdato de amônio. *: P < 0,05.



No inoculante, a sobrevivência das bactérias pode ser afetada por fatores como a umidade e o pH, os quais estão ligados ao veículo de inoculação. Além disso, a sobrevivência das bactérias também pode ser afetada pela ação do molibdênio, cuja aplicação nas sementes, em virtude de seu contato com o inoculante, pode reduzir o número de células de *Bradyrhizobium*, a nodulação e a fixação biológica de nitrogênio (CAMPO; ALBINO, 2001), podendo também gerar perdas de produtividade dos grãos.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a necessidade de estudos quanto à viabilidade do inoculante turfoso com bactérias associativas. Os inoculantes desenvolvidos no Brasil com turfa e que estão de acordo com a legislação são aqueles utilizados em culturas leguminosas que se associam com o rizóbio. As bactérias diazotróficas associativas como *Herbaspirillum* e *Burkholderia* têm grande potencial de FBN quando associadas com plantas não leguminosas,

como por exemplo, o arroz, milho, cana-de-açúcar, dentre outras (FERREIRA; GUIMARÃES; BALDANI, 2011; GUIMARÃES; BALDANI; BALDANI, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2009). No entanto, há necessidade de suas células permanecerem viáveis por pelo menos seis meses. A adição do molibdênio ao inoculante possibilitou que as células bacterianas permanecessem viáveis por períodos superiores há seis meses, sendo, portanto bastante promissor para uso em escala comercial de inoculantes turfosos no Brasil.

CONCLUSÃO

A aplicação do molibdênio ao inoculante turfoso contribui para o aumento da viabilidade das estirpes BR11417 e BR11340 por um período de 180 dias.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-inoculada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* *B. elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 09, p. 1633-1643, 1999.
- BALANCHADAR, *et al.* Non-rhizobial nodulation in legumes. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 02, n. 02, p. 49-57, 2007.
- BALDANI, J. I. *et al.* Recent advances in BFN with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29, n. 05, p. 911-922, 1997.
- BUCHER, C. A.; REIS, V. M. **Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Documentos, 247).
- CAMPO, R. J.; ALBINO, U. B. Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 03, p. 527-534, 2001.
- CAMPO, J. R.; LANTMANN, A. F. Efeitos de micronutrientes na fixação biológica de nitrogênio e produtividade de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 08, p. 1245-1253, 1997.
- 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. p. 60.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**, v. 02, p. 621-631, 2004.
- FERREIRA, J. S. *et al.* Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 02, p. 06-12, 2003.
- FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 01, p. 179-185, 2010.
- FERREIRA, J.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 07, n. 13, p. 826-833, 2011.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 02, p. 25-30, 2003.
- GUIMARÃES, S. L. *et al.* Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 03, p. 393-398, 2007.
- GUIMARÃES, S. L. *et al.* Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**, v. 23, n. 04, p. 32-39, 2010.
- HUNGRIA, M. *et al.* Fixação biológica de nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Micro-organismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 09-89.
- LORDA, G. *et al.* Peat-based inoculum of *Bradyrhizobium japonicum* and *Sinorhizobium fredii* supplemented with xanthan gum. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, n. 01, p. 01-05, 2007.
- LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W.; Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, v. 15, n. 02, p. 289-321, 2005.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras:UFLA, 2006. 729 p.
- RAYMOND, J. *et al.* The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biological Evolution**, v. 21, n. 03, p. 541-554, 2004.
- SILVA, M. F. *et al.* Produção, caracterização e aplicação de anticorpo policlonal contra *Azospirillum amazonense*, estirpe Am15. **Bragantia**, v. 68, n. 01, p. 01-11, 2009.
- SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 06, p. 485-492, 1992.
- SMITH, R. S. New inoculant technology to meet changing legume management. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, E. D. (Ed.). **Biological nitrogen fixation for the 21st century**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. p. 621-622.
- VESSEY, J. K.; PAWLOWSKI, K.; BERGMAN, B. Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. **Plant and Soil**, v. 266, n. 01, p. 205-230, 2004.
- YATES, M. G.; SOUZA, E. M.; KAHIND, J. H. Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 05/06, p. 863-869, 1997.
- WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, n. 01/02, p. 03-14, 2006.