RECUPERAÇÃO DE MICRORGANISMOS EM SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM OSMOPROTETORES

CAMACHO, C. S. P[1]; MELO, A. R. M. D[1]; ARAUJO, G. M. S[1]; CAMPOS, D. T. S[2].

[1]Filiação: Discentes de Agronomia, UFMT campus de Cuiabá, MT/FAAZ, email: cayocamacho1@gmail.com; duarteamanda98@yahoo.com; gelson062011@gmail.com.

[2]Filiação: Profª. UFMT campus de Cuiabá, MT/FAAZ/ Dep. Fitotecnia e Fitossanidade, email: daniela.campos@ufmt.br

RESUMO

As sementes de soja são sempre inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio (N) antes do processo de semeadura, uma técnica já consolidada, porém problemas podem acontecer nesse momento da semeadura. Dessa forma, a pré-inoculação das sementes é um processo que visa reduzir os problemas que podem ser gerados com as sementes que são guardadas inoculadas com as bactérias fixadoras de N. Há vários indícios que apontam que o processo de pré-inoculação comumente é falho devido ao efeito do defensivo agrícola sobre tais bactérias. Como forma de reduzir o efeito dos defensivos agrícola tem-se os osmoprotetores, substâncias que tem como função a proteção bacteriana. Assim sendo, objetiva-se com o presente trabalho a avaliação de cinco osmoprotetores – ácido glutâmico, maltose, sacarose, um produto comercial que contém resíduos de peixe e outro fonte de aminoácidos – na bioproteção da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja da cultivar Intacta RR2PRO tratadas com o defensivo agrícola Standak Top, analisando-se também o tempo (0, 4, 8 e 24 horas) em que a dosagem bacteriana se mantém. Os resultados indicaram funcionalidade, por mais que aquém da dosagem bacteriana assegurada pelo inoculante, de todos os osmoprotetores, sendo o tratamento realizado com o produto a base de peixe o que melhor apresentou resultados nos tempos de 0 e 4 horas, e o tratamento com sacarose nas contagens de 8 e 24 horas. Os demais osmoprotetores demonstraram-se menos eficientes.

Palavras-chave: pré-inoculação; *Bradyrhizobium japonicum*; bioproteção; defensivo agrícola.

INTRODUÇÃO

A utilização do Nitrogênio (N) se faz necessária para as plantas, e consequentemente para a agricultura, sendo ele um dos elementos imprescindíveis para diversas culturas, fato esse contemplado por projetos da cientista Johanna Döbereiner, uma das principais pesquisadoras na área da fixação biológica de Nitrogênio (FBN). Sabendo-se disso, o ciclo de N possui extrema influência de bactérias fixadoras, como relatado primariamente por Hellriegel e Wilfarth, em 1888, de que as bactérias presentes nos nódulos das plantas leguminosas eram as que transformavam o Nitrogênio molecular em amônia.

Portanto, ao longo de décadas foram criados os chamados inoculantes, os quais possuem a função de conduzir uma quantidade considerável de bactérias à planta. Em síntese, esse produto é amplamente utilizado, mas com diversas divergências entre os agricultores. Dentre elas, a principal está no fato de ser um processo manual e burocrático, impossibilitando uma maior maleabilidade em relação ao prazo de semeadura e inoculação (Campo; Hungria, 2007).

Por conseguinte, há a necessidade de uma técnica que possibilite o que a inoculação comum não permite: a pré-inoculação. Em suma, trata-se da inoculação feita com antecedência, possuindo uma grande importância por economizar tempo, permitir com que prazos sejam estendidos de acordo com os planos do agricultor (Zilli, et al., 2009).

Contudo, tal processo de pré-inoculação apresenta algumas dificuldades, como a morte bacteriana precoce – mesmo com osmoprotetores, substâncias que visam proteger as bactérias de componentes prejudiciais a ela por intermédio de uma película protetora na camada externa da semente, fazendo com que haja um menor contato do inoculante ao defensivo agrícola presente na semente (Deaker; Roughley; Kennedy, 2007). Uma clara exemplificação disso é relatado por Ferreira, et al. (2011), alegando que alguns produtos já comercializados não chegaram a sobreviver por períodos acima de 10 dias.

Juntando-se isso à falta de informação sobre os benefícios dessas práticas, principalmente em solos arenosos e com pouca matéria orgânica (Zilli, et al., 2010), o trabalho tem como objetivo testar cinco osmoprotetores, em sementes de soja, no intuito de garantir a sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em diferentes períodos de tempo.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Mato Grosso, campus de Cuiabá, MT, Faculdade de Agronomia e Zootecnia (UFMT/FAAZ).

Para o desenvolvimento do trabalho utilizou-se a variedade de soja Intacta RR2PRO; o defensivo químico Standak Top; um produto comercial contendo o *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 e 5080 e os osmoprotetores apresentados na Tabela 1, a qual também apresenta as demais constituições dos tratamentos.

Para a seleção dos osmoprotetores e suas devidas proporções, fez-se por necessária uma revisão bibliográfica. O trabalho de avaliação de efeito dos bioprotetores orgânicos em *Aeromonas trota* e *A. hydrophila* em altas condições de Cloreto de sódio (Delamare., et al. 2003) foi de suma importância para a escolha de determinados osmoprotetores.

A metodologia de análise seguiu o protocolo que consta na Portaria 341 do MAPA (Penna, et al., 2004) que está publicada no Diário Oficial da União (D.O.U. 01/10/2009). Também foi realizada a análise do inoculante utilizado no ensaio, seguindo metodologia oficial de análise preconizada pelo MAPA (Portaria nº 31, 1982).

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos de sementes de soja em pré-inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* Semias 5079 e 5080

Tratamentos	Descrição
T1	Semente sem tratamento químico e biológico
T2	Semente apenas com Standak Top
T3	Semente com Standak Top e *B. japonicum*
T4	Semente com Standak Top, *B. japonicum* e ácido glutâmico
T5	Semente com Standak Top, *B. japonicum* e maltose
T6	Semente com Standak Top, *B. japonicum* e sacarose

T7	Semente com Standak Top, *B. japonicum* e produto comercial a base de peixe
T8	Semente com Standak Top, *B. japonicum* e produto comercial fonte de aminoácidos

A tabela 2 apresenta a proporção dos produtos utilizados com a quantidade de semente. Tal proporção foi utilizada tanto no tratamento químico quanto no biológico, seguindo as recomendações dos fabricantes.

Tabela 2 – Quantidade de produtos utilizados no tratamento químico e biológico em pré-inoculação de sementes de soja

Produto	**Dosagem**
Água	4mL/kg de sementes
Bactéria *B.japonicum*	2 mL/kg de sementes
Standak Top	2 mL/kg de sementes
Osmoprotetor	0,5 mL/kg de sementes

As soluções de osmoprotetores foram preparadas para um volume total de 250 mL, sendo 50 mL para cada tratamento com osmoprotetor. Todas soluções foram padronizadas em 0,05%.

O trabalho iniciou-se com o preparo da semente, sendo realizado respectivamente o tratamento químico e o biológico nas devidas proporções da tabela 2. O armazenamento das sementes, após tratamento biológico, foi feito em sacos duplos de papel em temperatura de 22 °C.

A partir disso foi realizada a Técnica de Diluição Seriada, diluindo-se até o 10^{-8} e o plaqueamento com a técnica da microgota, cuja alíquota de cada repetição (gota) foi de 10 µL, sendo quatro repetições por diluição. O plaqueamento foi realizado em meio YMA (Vicent, 1970), indicado para a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*.

As placas foram incubadas à temperatura de 28 °C. A análise do inoculante comercial seguiu a metodologia oficial do MAPA para a averiguação da presença das cepas designadas no rótulo do produto e do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL^{-1} assegurada pelo fabricante.

Quanto à análise de dados, ela foi realizada como um fatorial simples (A + B), de 6 x 4 (seis tratamentos testados em quatro tempos) com três repetições, sendo feito em delineamento em blocos casualizados. O Software estatístico usado para análise de dados foi o programa SISVAR, cujos dados foram submetidos à análise de variância. Suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para o uso de diferentes osmoprotetores e tempos de armazenamento de sementes de soja encontram-se no Gráfico 1.

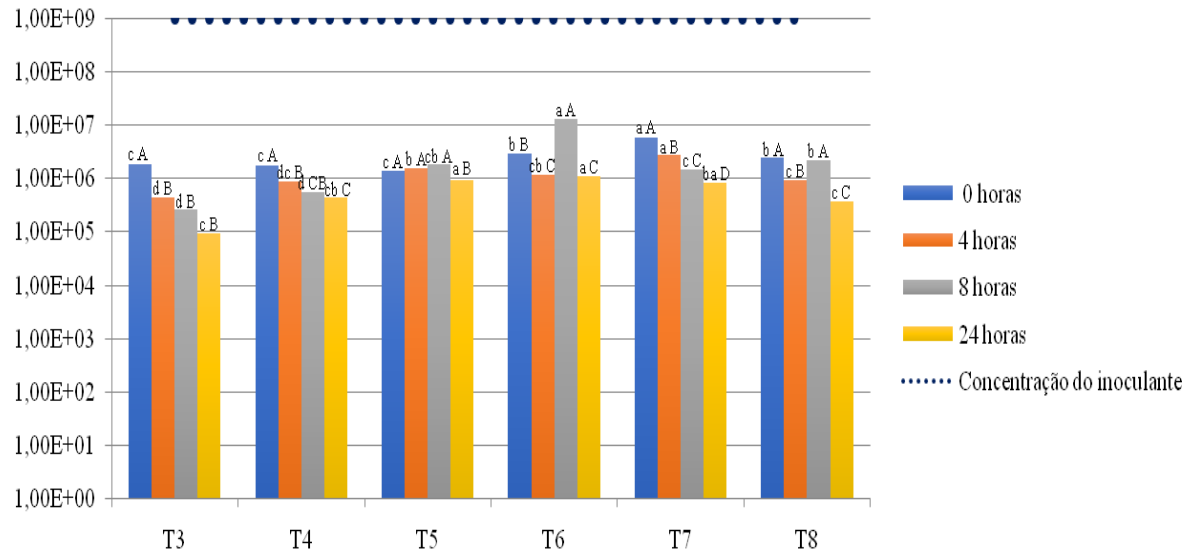

Gráfico 1 – Comparação de médias em relação ao UFC a partir do Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

*coeficiente de variação de 9,65%.
*médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Turkey ($p<0,05$).

Majoritariamente o reconto feito logo após o tratamento biológico (0 horas) foi o que manteve o maior número de *B. japonicum*, diferenciando-se estatisticamente somente no tratamento 6. O tratamento que apresentou o melhor resultado foi o tratamento 7.

O reconto após 4 horas, por sua vez, oscilou, apresentando os segundos melhores resultados em quatro de seis tratamentos. Os tratamentos que se diferenciaram foram o tratamento 5, o qual apresentou um dado um pouco acima do tempo anterior, e o 6, que ficou com um resultado semelhante aos outros tratamentos, mas menor se comparado aos resultados dele próprio no tempo de 0 e 8 horas. Constata-se que o tratamento com melhor resultado nesse tempo foi o 7, seguido do 5.

O reconto após 8 horas foi o que demonstrou mais resultados diferentes, ficando como o melhor – ou não se diferenciando estaticamente do melhor - em três de seis tratamentos. Nos demais tratamentos se caracterizaram por ter ficado com resultados abaixo do reconto após 4 horas, mas acima do após 24 horas. O que melhor apresentou dados nesse tempo foi o T6, chegando em $1,27x10^7$.

Por fim, o reconto após 24 horas foi o que teve pior desempenho em todos tratamentos. Apesar disso, a melhor dose bacteriana, nesse caso, foi encontrada no tratamento 6 e 5 respectivamente, ambos açúcares. O tratamento 7 também apresentou uma proporção considerável.

Em todos os tempos de reconto, o tratamento 3, sem nenhum protetor bacteriano, foi o que proporcionou menor quantidade de *B. japonicum*. Apesar de previsível, demonstra a importância dessas moléculas na proteção da bactéria.

O tratamento com ácido glutâmico apresentou-se como um dos menos eficazes nos quatro tempos. Além disso, seguiu a teoria bibliográfica (Lopes, 2016), diminuindo, por mais que pouco, ao longo dos tempos de recontagem.

O tratamento com a maltose apresentou destaque no último tempo de contagem. Apresentou um número de UFC crescente até o tempo de 8 horas, mas pouco significativo. Outrossim, também decaiu no tempo de 24 horas, mas manteve uma mínima regularidade.

De modo semelhante ao anterior, o tratamento com sacarose caracterizou-se pelo número de UFC considerável nos dois últimos tempos de contagem. Foi o tratamento que mais se diferenciou quanto à reta decrescente ao longo das recontagens e no caso em questão houve irregularidades principalmente no tempo de 8 horas, por mais que positivas.

Por outro lado, o tratamento 7 seguiu totalmente a tendência demonstrada nos materiais teóricos (Lopes, 2016), apresentando decréscimo ao longo das contagens. Seus tempos de maior destaque, ao comparado com os demais tratamentos, foram os tempos de 0 e 4 horas respectivamente.

O tratamento 8 ficou na linha intermediária ao comparado com os demais. Apresentou dosagens consideráveis nos tempos de 0 e 8 horas.

Vale salientar que os tratamentos 1 e 2 não foram apresentados por serem testemunhas, não totalizando nenhuma colônia da bactéria procurada. Isso em tese já era previsto, afinal ambos não possuíam inoculante em sua composição, sendo parte do trabalho justamente para analisar outras bactérias na semente com e sem defensivo agrícola, as quais naturalmente disputariam o meio de cultura.

O tratamento com ácido glutâmico, por mais que tenha apresentado um efeito positivo nas últimas três contagens, demonstrou mínima eficiência, diferenciando-se pouco de outro trabalho com esse mesmo bioprotetor (Delamare, et al., 2003). Portanto, evidencia-se que como único constituinte não é tão considerável.

Os tratamentos com açúcares tendem a serem consideráveis na composição de osmoprotetores devido aos seus melhores resultados em algumas contagens.

Por outro lado o tratamento 7 deve ser analisado de forma única, devido ao fato de ser um produto com base em outros componentes, já possuir função no mercado e, principalmente, ter tido bons resultados.

O tratamento 8 apresentou osmoproteção, mas mínima, com pouco destaque em todas as contagens.

CONCLUSÕES

Os osmoprotetores utilizados não proporcionam a sobrevivência de *B. japonicum* quando inoculado em sementes de soja tratada com Standak Top.

Os osmoprotetores testados apresentam um resultado comparado ao tratamento testemunha, por mais que aquém da dosagem bacteriana de $1x10^9$ assegurada pelo inoculante, fazendo-se por necessários mais estudos e testes quanto à pré-inoculação.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, S. A evolução da produção de inoculantes no Brasil. **Anpii**. São Paulo, 2013.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Protocolo para análise da qualidade e da eficiência agronômica de inoculantes, estirpes e outras tecnologias relacionadas ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. Londrina: **Embrapa Soja**, 2007. P89-123 (Embrapa Soja. Documentos, 290).

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology and Biochemistry**, **Oxford**, v. 39, n. 2, p. 573–580, 2007.

DELAMARE, A. P., et al. The effect of organic osmoprotectors on *Aeromonas trota* and *A. hydrophila* grown under high Sodium Chloride concentrations. **Brazilian Journal of Microbiology** [online], Florianópolis, v. 34, p. 128-130, nov. 2003.

EMBRAPA. Johanna Döbereiner: a cientista que revolucionou a agricultura. **Embrapa**. 2013.

FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; FUKAMI, J.; et al. Nova legislação, recomendação de doses de inoculantes e pré-inoculação: riscos ao sucesso da contribuição da fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja. **Resumos da XXXII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil**, 32º edição, pp.325-327. 2011, São Paulo.

LOPES, K. Avaliação da eficiência agronômica de inoculante para pré-inoculação de sementes de soja com tratamento químico até 20 dias antes do plantio. 38 p. **Trabalho de conclusão de curso** (Bacharel em Gestão de Agronegócio) – Universidade de Brasília, 2016. Orientador: Dra. Donária Coelho Duarte. Planaltina – DF. 2016.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de Bradyrhizobium em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online]. 2010, v. 45, n. 3, pp. 335-337.

ZILLI, J. E.; RIBEIRO, K. G.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 917-923, 2009.