

Análise da viabilidade celular em inoculantes líquidos para soja em diferentes períodos de estocagem pelo ensaio respiratório de redução de INT

(Analysis of cell viability in liquids inoculants for soybean in different periods of storage for INT respiratory reduction test)

Wellington Marcelo Queixas Moreira^{1,2}; Jackson Antônio Marcondes de Souza¹; Eliana Gertrudes de Macedo Lemos¹; Lúcia Maria Carareto Alves¹

¹Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, Departamento de Tecnologia, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

moreira_wellington@yahoo.com.br; jackson@fcav.unesp.br ; egerle@fcav.unesp.br;
lmcalves@fcav.unesp.br

²Centro Universitário UNIFAFIBE, Bebedouro, SP, Brasil.
moreira_wellington@yahoo.com.br

Abstract. The expansion of soybean cultivation in Brazil is mainly by the addition of soil bacteria capable of fixing atmospheric nitrogen, using inoculants as vehicle. In view of the analysis of quality of commercial inoculants for soybeans, a study of the respiratory metabolism of bradyrhizobia was performed *in vitro*. Inoculants with 12, 27 and 48 months of production were analyzed as to their biochemical and physiological characteristics. The inoculants stored up to 27 months showed no interference in the number of cells, remaining within recommended. However, when the product is stored for a prolonged period of time (48 months) there is a sharp decrease in cell number and also in the respiratory activity. Thus, long periods of stock directly influence the quality of the product, making it unsuitable for use.

Keywords: *Bradyrhizobium*; *Inoculants*; *Cell viability*, *INT-formazan*.

Resumo. A expansão da cultura de soja no Brasil se deve principalmente pela adição de bactérias no solo capazes de fixar nitrogênio atmosférico, utilizando como veículo os inoculantes comerciais. Tendo em vista a análise de qualidade de inoculantes comerciais para soja, um estudo do metabolismo respiratório de bradírrizóbios foi realizado “*in vitro*”. Inoculantes comerciais com 12, 27 e 48 meses de fabricação foram analisados quanto à suas características bioquímicas e fisiológicas. Os inoculantes estocados em até 27 meses não apresentaram interferência quanto ao número de células, permanecendo dentro dos padrões recomendados. Contudo, quando o produto é estocado por um prolongado período de tempo (48 meses) ocorre um decréscimo acentuado no número de células e também na atividade respiratória. Sendo assim, períodos prolongados de estoque,

influenciam diretamente a qualidade do produto, tornando-o inadequado para o uso.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium; Inoculantes; Viabilidade celular; INT-Formazan.*

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill), leguminosa da família Fabaceae (Delorit & Gunn, 1986), é extensamente utilizada para alimentação humana, ração animal e diversas aplicações industriais (Mahrous *et al.* 2007) .Sendo considerada uma das mais importantes fontes de proteína e óleo vegetal, os quais são constituintes de seus grãos é responsável por 30% de toda produção de óleos de origem vegetal no mundo além de empregado como fonte para produção de biodiesel (Hussain *et al.* 2011).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e apresentou produção de 66,37 milhões de toneladas na safra de 2012, em uma área cultivada de 25.037,5 mil hectares (CONAB, 2012; USDA 2012). Deste modo essa grande produtividade é a razão pela qual a soja é uma das culturas de maior importância econômica para o país. Para uma alta produtividade de grãos essa cultura requer grandes quantidades de nitrogênio (N). Por outro lado, espécies vegetais produtoras de grãos, como a soja, destacam-se quanto ao seu potencial para formar simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico (N₂) (Kumaga & Ofori, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) constitui a fonte de nitrogênio mais viável para a cultura da soja, tanto economicamente como ecologicamente. Avaliações realizadas em diversas regiões produtoras de soja indicam que a FBN é responsável por mais de 80% do nitrogênio acumulado pela planta. A introdução destas bactérias no solo se dá através da utilização de inoculantes comerciais, formulações que incluem as bactérias *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum* em sua composição.

Atualmente, quatro estirpes são recomendadas oficialmente no Brasil para a utilização nos inoculantes comerciais: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA 587 e SEMIA 5019; *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Avaliações conduzidas na maioria das regiões produtoras de soja brasileiras mostraram que estas estirpes possuem alta eficiência em fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com plantas de soja (Zilli *et al.*, 2005). Contudo, a qualidade dos produtos oferecidos comercialmente requer uma verificação apropriada para estabelecimento de células viáveis para o processo de nodulação.

A tendência para uso de inoculantes líquidos tem facilitado à prática da inoculação em campo. No entanto, o sucesso da inoculação depende da qualidade dos inoculantes comerciais, os quais devem ser fabricados com estirpes recomendadas pelos laboratórios de pesquisa credenciados e apresentarem uma quantidade mínima de células de bradirrizóbio ($1,0 \times 10^9$ células viáveis por grama ou ml). Atualmente, a legislação que rege a produção de inoculantes é regulamentada pela instrução normativa nº 13 (24/04/2011) e, registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento brasileiro (MAPA).

Tratando de um produto composto por materiais biológico, os prazos de validade dos mesmos, geralmente são curtos (no mínimo 6 meses), dificultando a produção e estocagem do mesmo. Além dos constituintes da formulação, o oxigênio contido no interior das embalagens tende a sofrer uma redução dificultando mais ainda a sobrevivência das células bacterianas no produto.

Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade das células de bradirrizóbios em inoculantes líquidos comerciais para soja, em diferentes períodos de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras Biológicas

Os inoculantes comerciais líquidos para soja foram utilizados nos testes bioquímicos e fisiológicos. Estes compostos por *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. elkanii* SEMIA 587, foram acondicionados sob condições recomendadas pelo fabricante e suas idades correspondiam a 12, 27 e 48 meses desde a data de fabricação. **Análise das características das amostras biológicas**

Os inoculantes foram analisados quanto à densidade ótica (DO 600) através da leitura em Biofotômetro (Eppendorf) e o pH foi medido em pHmetro (Analyser pH 300). Os mesmos também foram inoculados em meio de cultura YMA para se proceder à contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) pelo método de diluição seriada.

Ensaio Respiratório pela redução de INT

Para a verificação da taxa respiratória dos inoculantes acima descritos, foram submetidos a um ensaio bioquímico de redução de INT (2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium) em INT-Formazan como descrito por Zimmermann (1978), Trevors (1984) e Rodrigues (1992). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores únicos representam a média encontrada.

RESULTADOS

Análises das características dos inoculantes em diferentes idades e diferentes cultivos de *B. elkanii*

Os inoculantes foram analisados quanto ao número de células (UFC), pH, densidade óptica (DO 600) e análise da cadeia respiratória (extrato etanólico) e os resultados estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1: Análise das características de Inoculantes em diferentes períodos de armazenamento

Condições de Cultivo	(cels/ml)	DO (600nm)	pH*	DO INT-formazam
Inoculante 12 meses	$1,43 \times 10^9$	3,0	7,08	0,230
Inoculante 27 meses	$3,32 \times 10^9$	5,1	7,1	0,411
Inoculante 48 meses	$0,4 \times 10^9$	7,2	7,04	0,121

*pH Inicial da formulação dos inoculantes (pH – 6,2)

Os produtos com 12 e 27 meses apresentaram número de células considerado dentro dos padrões das entidades fiscalizadoras de controle de qualidade, que é de no mínimo $1,0 \times 10^9$, entretanto, o de 48 meses apresentou um numero de células inferior ao recomendado. O pH registrado para a formulação (utilizada como padrão para as demais leituras) foi inferior ao encontrado nos inoculantes analisados. Porém, não foi observado alterações significativas de pH. Quanto à análise da DO dos mesmos, quanto maior o tempo de estocagem dos inoculantes, maior a densidade ótica dos mesmos, sendo o inoculante de 48 meses, o que apresentou o maior valor na leitura.

Os dados obtidos pelo ensaio de redução corroboram os dados obtidos com a contagem de células dos mesmos inoculantes, em que ocorre um aumento de células

principalmente no inoculante de 27 meses de idade (figura 1). Um grande decréscimo na densidade ótica ocorreu em 48 meses, inoculante que apresentou menor número de células.

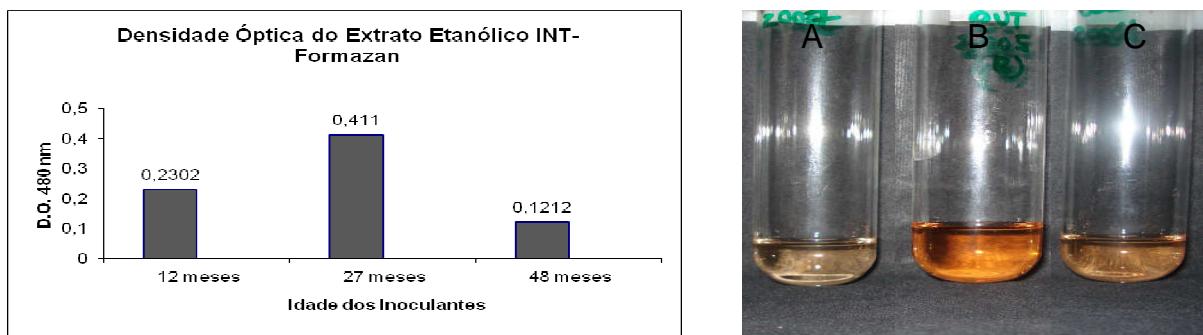


Figura 1: Análise espectrofotométrica do extrato etanólico proveniente dos inoculantes em diferentes tempos de estoque. E extratos etanólicos INT-Formazan **A** – inoculante 12 meses; **B** – inoculante 27 meses; **C** – inoculante 48 meses.

DISCUSSÃO

Análises das características dos inoculantes em diferentes idades

O desenvolvimento de tecnologia visando a produção de inoculantes líquidos se tornou importante para a diminuição dos custos de produção e para a real utilização desse insumo pelos produtores de soja (Hungria *et al*, 2007).

Um processo de aumento gradual da DO (densidade óptica) pôde ser observado nos inoculantes analisados em relação à idade dos mesmos. Quanto maior o período de estoque dos inoculantes, maior a quantidade de muco viscoso. Na maior parte das estirpes a quantidade de muco produzida é proporcional ao tempo de crescimento (Martins *et al.*, 1997). Além de produção de exapolissacarídeos (EPS) produzido pelas bactérias no meio (quanto mais antigo o inoculante maior concentração de EPS). Este composto tem importância conhecida para fenômeno de reconhecimento, interação e aderência dos rizóbios nas raízes da planta hospedeira (Stougaard, 2000). Sendo assim, esses compostos podem ser detectados através da leitura da densidade óptica aumentando a mesma ou podendo também ser atribuído ao acúmulo de células mortas.

O inoculante estocado durante 48 meses apresentou um número de células inferior ao recomendado, sendo assim, um período extremamente prolongado de estocagem (4 anos) influenciou diretamente o número de células viáveis uma vez que os nutrientes contidos na formulação tendem a se esgotar, refletindo o número de bactérias encontradas no mesmo.

Ensaio bioquímico de cinética respiratória através da redução de INT a INT-Formazan dos inoculantes

O sistema de transporte de elétrons (ETS) é um componente comum em bactérias, permitindo, através do processo respiratório, a produção de energia na forma de ATP. O sistema ETS reduz 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-fenil tetrazolium (INT) à INT-Formazan, uma vez que o INT compete diretamente com o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons. Métodos bioquímicos, como a determinação da atividade do sistema de transporte de elétrons (ETS) têm sido empregados para a dosagem do consumo de oxigênio. Baseado neste processo de redução, as bactérias que estão respirando acumulam intracelularmente INT-Formazan, tornando-se um método eficiente para analisar a viabilidade de células em diferentes condições (Zimmermann, 1978; Maurice *et al.*, 2001). Após consolidado este

processo, dosagens das taxas de acúmulo de INT-Formazan podem ser realizadas através de espectrofotometria e também através de microscopia para verificação dos “spots” intracelulares de INT-Formazan

Uma vez que o ensaio de redução da cadeia respiratória marca as células que estão respirando, estas acumularam intracelularmente o INT-Formazan que depois foi extraído para obtenção deste extrato. Conforme se observou, o inoculante de 27 meses foi o que apresentou maior índice respiratório (Tabela 1 e figura 1).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Análises das características dos inoculantes nos permitem aferir que o processo de estocagem em até 27 meses não afetou o número de células nos inoculantes, sendo que este número permaneceu dentro dos padrões recomendados pelas entidades fiscalizadoras. Contudo, quando o produto é estocado por um prolongado período de tempo (48 meses) ocorre um decréscimo acentuado no número de células e também na atividade da cadeia respiratória que foi demonstrado através da redução de INT a INT-Formazan. Fato este que pode ser atribuído ao esgotamento dos nutrientes contidos na formulação refletindo no número de células. Um aumento da densidade óptica dos inoculantes foi observado, podendo estar relacionado à produção de compostos como EPS, sendo este produzido em maior quantidade com o aumento da idade desses produtos. Independente da idade e qualidade, todos os inoculantes testados em simbiose com plantas de soja mostraram-se capazes de induzir a formação de nódulos característicos (dados não mostrados) apesar de não se ter avaliado a capacidade desses nódulos em fixar nitrogênio ou a produtividade da planta inoculada.

REFERÊNCIAS

- BERINGER, J.E., 1974. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*, 84:188-198.
- CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 01 out 2012.
- FISCHER, H.M., VELASCO, L., DELGADO, M.J., BEDMAR, E.J., SCHÄREN, S., ZINGG, D., GÖTTFERT , M.; HENNECKE, H.G., 2001. One of Two *hemN* Genes in *Bradyrhizobium japonicum* Is Functional during Anaerobic Growth and in Symbiosis. *J Bacteriol*, 184: 1300-1311.
- HUNGRIA, M., CAMPO, R.J., MENDES, I.C., 2007. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto Brasileiro. EMBRAPA Soja, Documento 238, 80p. Londrina, Brasil.
- HUSSAIN, K., ISLAM, M., SIDDIQUE, M.D., HAYAT, R., MOHSAN, S., 2011. Soybean Growth and Nitrogen Fixation as Affected by Sulfur Fertilization and Inoculation under Rainfed Conditions in Pakistan. *Int J Agri Biol*, 13: 951-955.
- KUMAGA, F.K., OFORI, K., 2004. Response of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) to Bradyrhizobia Inoculation and Phosphorus Application. *Int J Agri Biol*, 6:324-327.

MAHROUS, S.R., 2007. Chemical Properties of *Aspergillus flavus*-Infected Soybean Seeds Exposed to γ -Irradiation during Storage. *Int J Agri Biol*, 9:231-238.

MARTINS, L.M.V., XAVIER, G.R., NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G., 1997. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”. *Comunicado Técnico – EMBRAPA*. 19:1-14.

MAURICE, S., BEAUCLAIR, P., GIRAUD, J.J., SOMMER G., HARTMANN, A., CATROUX, G., 2001. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merril) liquid inoculants after long-term storage. *World J Microbiol Biotechnol*, 17: 635-643.

PANIZZI, M.C. , MANDARINO, J.M.G., 1994. Soybean for human consuption: nutritional quality, processing and utilization,. In: *Tropical Soybean: improvement and production*. p.p.241-254 FAO press, Roma Itália.

PRELL, J., POOLE, P., 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol*, 14:161–168.

RODRIGUEZ, G. G., PHIPPS, D., ISHIGURO K., RIDGWAY, H. F., 1992. Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria *Appl Environ Microbiol*, 58: 1801-1808.

STOUGAARD, J., 2000. Regulators and Regulation of Legume Root Nodule Development *Plant Physiol*, 124:531–540.

TREVORS, J. T., 1984. Electron transport system activity in soil, sediment, and pure cultures. *Crit Rev Microbiol*, 11:83-100.

USDA (United States Department of Agriculture) Disponível em: <http://www.usda.gov/>. Acesso em: 09 set 2012.

Vincent, J.M., 1970. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific.

ZIMMERMAN, R., ITURRIAGA, R., BECKER-BIRK, J., 1978. Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl Environ Microbiol*. 36: 926-935.

ZILLI, J.D., CAMPO, R.J., RIBEIRO, K. G., GIANLUPPI, V., SMIDERLER, O.J., HUNGRIA, M., 2005. Utilização de Inoculantes de *Bradyrhizobium* no Cultivo de Soja nos Cerrados de Roraima. *Circular Técnica*, 2:1-9.