



# FERTBIO 2016

"Rumo aos novos desafios"

16 a 20 de Outubro  
Centro de Convenções de Goiânia -  
GO

## Histórico, elaboração e conteúdo da proposta de instrução normativa para inoculantes micorrízicos

Orivaldo José Saggin Júnior  
Embrapa Agrobiologia,  
Seropédica, RJ  
[orivaldo.saggin@embrapa.br](mailto:orivaldo.saggin@embrapa.br)



# Introdução

BIOTROFIA

Vários tipos  
de micorrizas

Artigo 1º do anexo 1 da IN 13

Como pesquisar?

Decreto 4954

Pureza

Como fiscalizar?

Microrganismos  
endógenos no  
esporo



Havia necessidade da  
legislação viabilizar  
registro de inoculantes  
micorrízicos

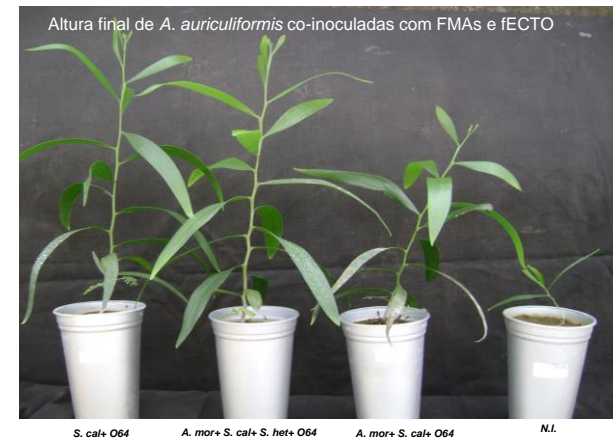
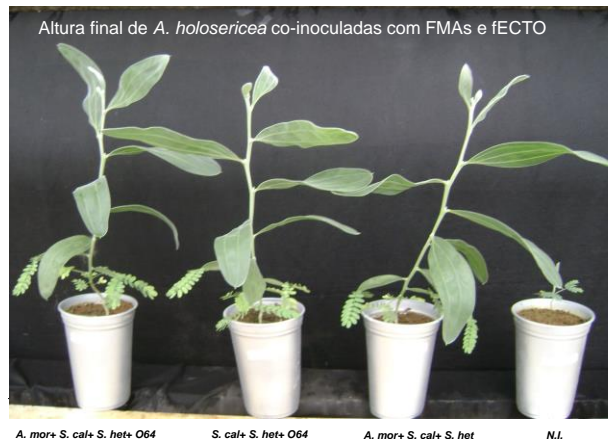
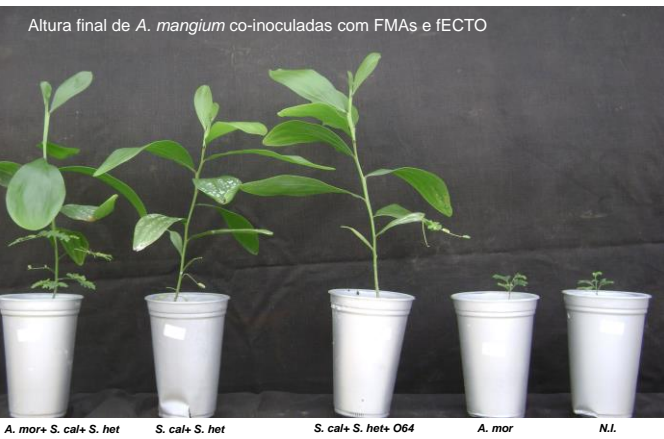
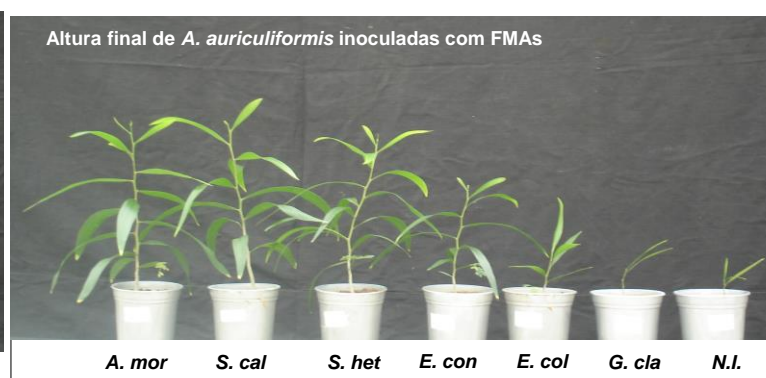
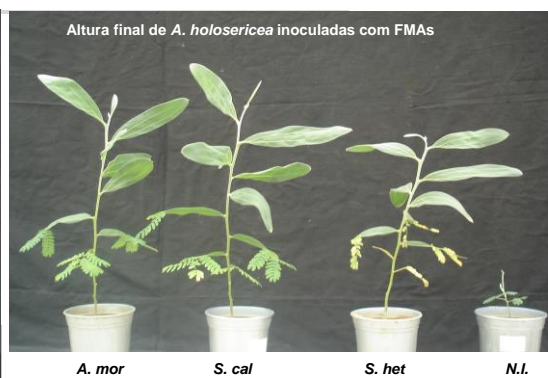
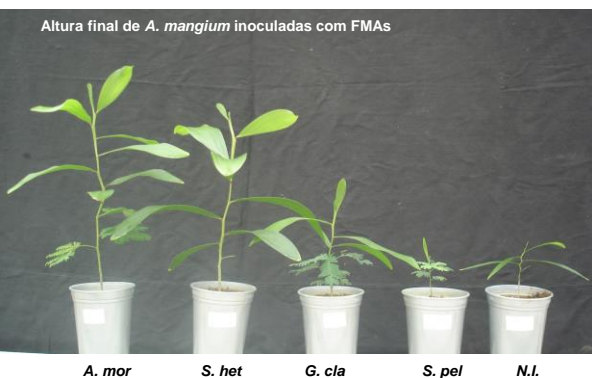
Pesquisadores não  
tinham claro como  
modificar/atender a  
legislação

X

Técnicos do MAPA  
desconheciam as  
características da  
multiplicação de FMAs

# Histórico

Tudo começou com ótimos dados de pesquisa....



promotores de crescimento, sugiro indeferir o pedido de inclusão dos micro-organismos no anexo III da Instrução Normativa 13/2011. Ressalta-se que em decorrência desse fato considerou-se desnecessária análise técnica mais aprofundada do relatório.

Este é o Parecer, S.M.J., que apresentamos para considerações superiores.

Brasília (DF), 03 de junho de 2013.



## Uso de microrganismos na agricultura será tema de workshop no Rio de Janeiro



Foto: Agência de Notícias - Embrapa



Uso de microrganismos na agricultura será tema de workshop no Rio de Janeiro

Será realizado de 2 a 4 de julho de 2013, o workshop Microrganismos na agricultura: potencial, aplicação e regulamentações, promovido pela Rede Dimiagri – projeto iberoamericano que.....verificamos que há uma heterogeneidade na legislação – e o Brasil é um dos países mais rígidos em termos de comercialização de microrganismos", cita Kátia Regina Teixeira, pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.



# Grupo Micorrizas

---

- Adriana Mayumi Yano-Melo - Universidade Federal do Vale do São Francisco;
- Arnaldo Colozzi Filho - Instituto Agronômico do Paraná;
- Camila Maistro Patreze - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro;
- Eliane Maria Ribeiro da Silva - Embrapa Agrobiologia;
- Leonor Costa Maia - Universidade Federal de Pernambuco;
- Marco Aurélio Carbone Carneiro - Universidade Federal de Lavras;
- Maria Catarina Megumi Kasuya - Universidade Federal de Viçosa;
- Orivaldo Jose Saggin Junior, coordenador - Embrapa Agrobiologia;
- Sidney Luiz Stürmer - Universidade Regional de Blumenau e
- Vera Lucia Divan Baldani - Embrapa Agrobiologia

**O grupo é aberto a qualquer  
micorrizólogo que tenha disposição  
de tempo e vontade de colaborar**



# Enfoque 2013-2014: modificar a IN 30

---

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 30, DE, 12 DE NOVEMBRO DE 2010

Art. 1º Estabelecer os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza na forma desta Instrução Normativa.





- Propor uma Instrução Normativa Nova específica para método de análise de inoculantes de Glomeromycota
- Incluir nesta instrução método de identificação morfológica de FMAs e os **inoculantes baseados em solo-inóculo => Biofertilizantes**
- Convidar para o grupo mais alguns micorrizólogos
- Modificar a Instrução Normativa 13 de 2011 para atender inoculantes de fungos micorrízicos

## IN de métodos biológicos para Inoculantes e biofertilizantes

- Complexa
- Análise de **pureza para inoculantes** (fungos e bactérias)
- Análises de **ervas espontâneas, fungos, nematóides e ácaros** (fitopatogênicos, fitófagos ou de importância quarentenária) nos biofertilizantes
- Análise de **coliformes, ovos de helmintos e *Salmonella***
- Além das metodologias de quantificação de propágulos, colonização e identificação taxonômica de FMAs



Proposta enviada ao  
MAPA em 08 de  
janeiro de 2016







Reunião em conjunto  
do Grupo Micorrizas  
com os Técnicos do  
MAPA

Foi possível compartilhar conhecimentos e entendimentos entre os micorrizólogos e técnicos do MAPA

Foi esclarecido que todas as IN devem ser baseadas nas definições da Lei nº 6.894, DE 16/12/1980 e do Decreto nº 4.954, de 14/01/2004

De forma que os produtos baseados em solo-inóculo não poderiam ser designados de **“biofertilizantes”**

# Lei nº 6.894, DE 16/12/1980

## Decreto nº 4.954, de 14/01/2004

Lei 6894 => divide os produtos em seis grupos

- Fertilizantes
- Corretivos
- Inoculantes
- biofertilizantes ou estimulantes
- Remineralizadores
- Substratos para plantas

(redação dada pela Lei nº 12890, de 2013)

**Inoculantes:** substância que contenha **microrganismos** com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal

**Biofertilizante:** produto que contenha **princípio ativo** apto a melhorar o desenvolvimento das plantas

# Conteúdo da proposta de IN para inoculantes micorrízicos

Estabelece métodos oficiais para:

- análise quanto à presença de organismos não especificados;
- quantificação dos propágulos de FMAs;
- mensuração da colonização micorrízica e
- identificação taxonômica dos FMAs

# Lei nº 6.894, DE 16/12/1980

## Decreto nº 4.954, de 14/01/2004

Decreto 4954 => Define tipos de produtos  
(redação dada pelo Decreto nº 8.384, de 2014)

- 14 tipos de fertilizantes
- 04 tipos de corretivos, entre eles **condicionador de solo**
- Inoculantes (não define tipos) mas define que devem ter “ausência de qualquer tipo de microrganismos que não sejam os especificados”
- Define biofertilizante como possuidor de **princípio ativo ou agente orgânico** capaz de atuar elevando a produtividade das plantas, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante;

“**agente orgânico**” não interpretado como um “agente biológico” e sim como um “agente de natureza química”



- Mudar o decreto 4954 é um processo moroso e inviável no momento
- Como meio mais rápido para a viabilizar produtos com FMAs:
  - ✓ Enxugar a **IN proposta para atender apenas os inoculantes de FMAs axênicos** (Cuja pureza atenda ao Decreto 4954);
  - ✓ Propor modificações na IN nº 13 de 24/03/2011 para atender inoculantes de FMAs
  - ✓ Propor modificações na IN nº 35 de 04/07/2006, a qual já está sendo modificada pelo MAPA, **incorporando os produtos a base de solo-inóculo como condicionador de solo**

---

**Definição de condicionador de solo no Decreto 4954:**  
produto que promove a melhoria das propriedades físicas, físico-químicas ou atividade biológica do solo



Reunião com os  
Técnicos do MAPA na  
Embrapa Agrobiologia

Diretor do DFIA/SDA  
André Felipe  
Carrapatoso Peralta  
da Silva e com o  
Coordenador da  
CFIC/DFIA/SDA  
Hideraldo José Coelho



Entrega formal da IN de inoculantes de FMAs e  
das sugestões de modificações da IN 13



- Existe possibilidade de alteração do Decreto Nº 4.954 diante da postura desburocratizante do novo Ministro da Agricultura
- O caminho para isso seria que as modificações necessárias fossem encaminhadas para o Ministro por Associações ou Sociedades (ANPII - Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes; RELARE; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Sociedade Brasileira de Microbiologia; e outras)
- As sociedades e associações aprovariam um documento único pedindo ao Ministro da Agricultura a modificação desse Decreto.

- Apesar da possibilidade de modificação do Decreto Nº 4.954 devemos continuar avaliando e propor modificações da IN 35 de condicionador de solo para atender os produtos a base de solo-inóculo;
- Sugerir as modificações do Decreto Nº 4.954 DE 14/01/2004 e buscar o apoio das Sociedades para seu encaminhamento para o MAPA.

V - inoculante: produto que contém microorganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas, sendo: ~~entendendo-se como:~~

- ~~a) suporte: material excipiente e esterilizado, livre de contaminantes segundo os limites estabelecidos, que acompanha os microorganismos e tem a função de suportar ou nutrir, ou ambas as funções, o crescimento e a sobrevivência destes microorganismos, facilitando a sua aplicação; e~~
- ~~b) pureza do inoculante: ausência de qualquer tipo de microorganismos que não sejam os especificados;~~

Inoculante de Bactérias fixadoras de Nitrogênio

Inoculante de Microrganismos promotores de crescimento vegetal

Inoculante de Microrganismos solubilizadores de fosfato

Inoculante de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Inoculante de Outros Fungos Micorrízicos

Inoculantes mistos



# Conteúdo da proposta de IN

## Capítulo I – ORGANISMOS NÃO ESPECIFICADOS NO RÓTULO DO INOCULANTE (PUREZA DO INOCULANTE):

método de espalhamento em placas de uma diluição seriada

- ↗ Meio para Bactéria => AN
- ↘ Meio para fungos => BDA

## Capítulo III – QUANTIFICAÇÃO DOS PROPÁGULOS DE FMAs:

- I – contagem de esporos no biofertilizante ou inoculante e
- II – bioensaio de número mais provável (NMP) de propágulos infectivos

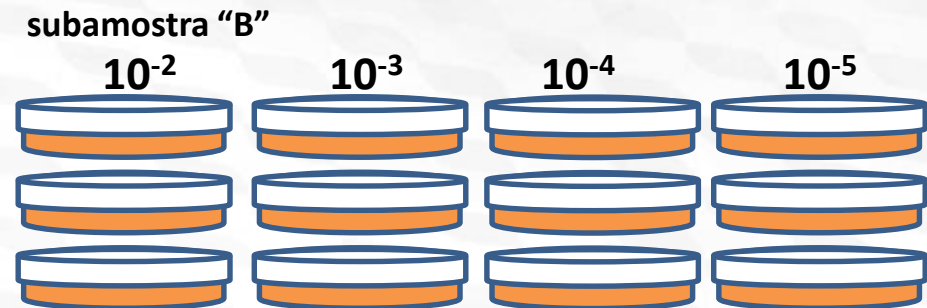
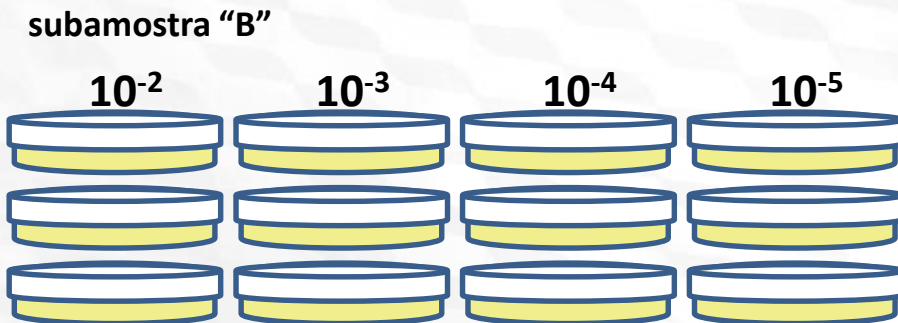
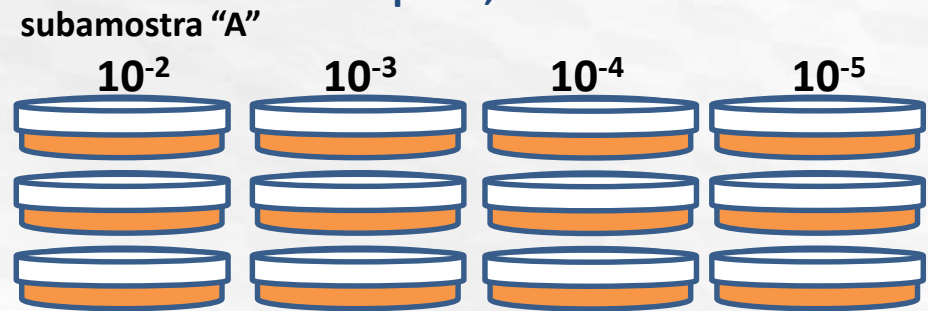
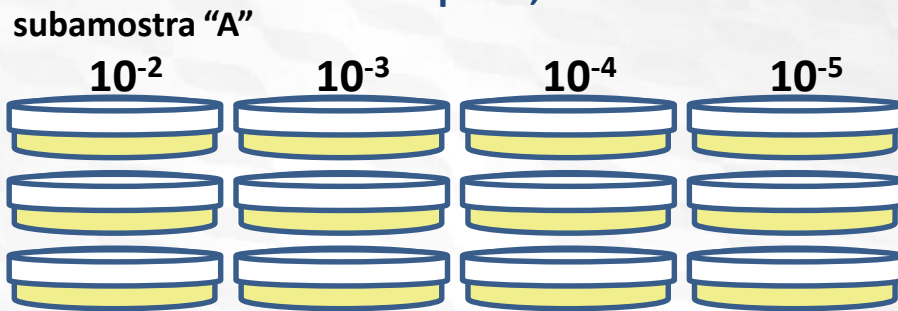
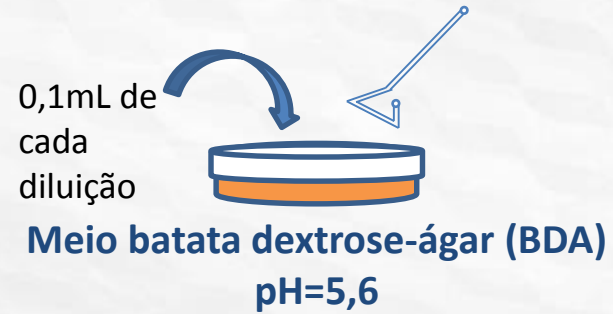
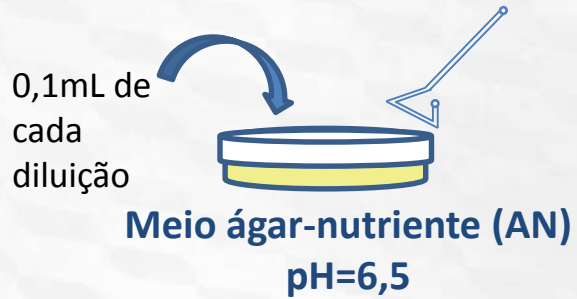
## Capítulo III – MENSURAÇÃO DA COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA

- I – bioensaio de infectividade micorrízica (Avalia a colonização micorrízica primária promovida exclusivamente pelos propágulos iniciais do inoculante)

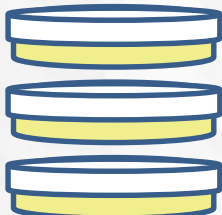
## Capítulo IV – IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FMAs

- I – Técnicas de biologia molecular
- II – Pela morfologia dos esporos

# Pureza do inoculante por espalhamento em placas de diluição seriada decimal de duas subamostras



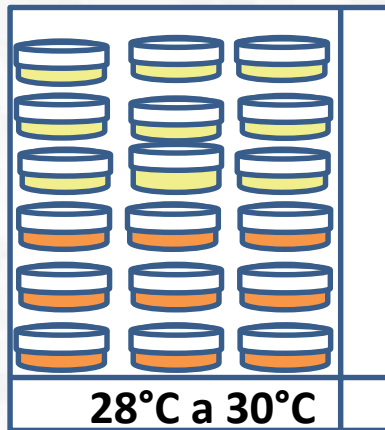
Placas testemunhas  
(0,1mL de solução de NaCl a 0,85%)



Placas testemunhas  
(0,1mL de solução de NaCl a 0,85%)



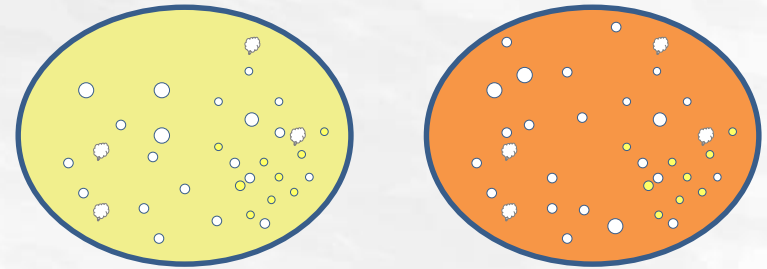
## Incubação das placas



48h (2° dia)    3° dia    4° dia    5° dia    ... até    10° dia



Contar o número de colônias na diluição que apresentar 30 a 300 colônias por placa



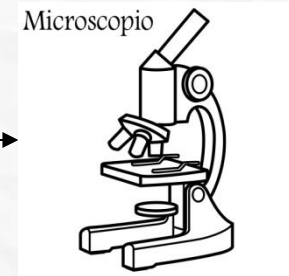
$$\text{UFC/mL ou g de inoculante} = \frac{\text{Número médio de colônias nas placas} \times 10}{\text{diluição escolhida para contagem (no formato } 10^{-2} \text{ a } 10^{-5})}$$

Resultado: média das subamostras “A” e “B” para cada meio (AN e BDA)

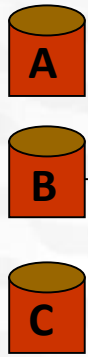
Limite de contaminação: o inoculante não deverá apresentar desenvolvimento de microrganismos não especificados na diluição  $10^{-5}$ , conforme **IN 13**

# Contagem de esporos

Três alíquotas de 5% da capacidade da embalagem. Não extrapolando a faixa de 1-100 mL ou gramas

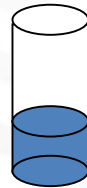
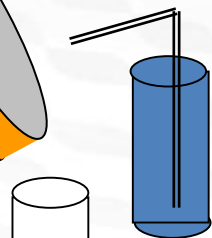
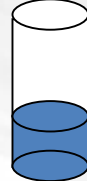
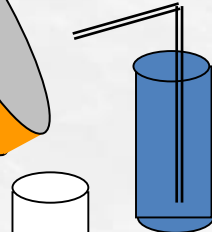
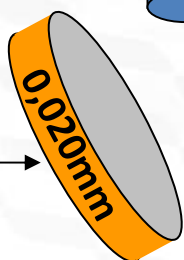
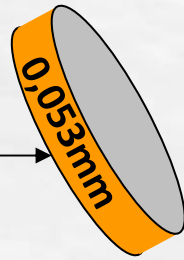
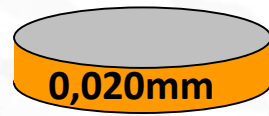
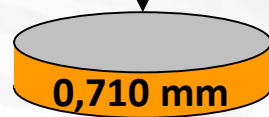


Verificar ausência de esporos ou esporocarpos



Agita com 500 mL de água em liquidificador

Passa-se a mistura em jogo de peneiras



Transfere para tubo de centrifugação seguidas de duas centrifugações Uma em água outra em sacarose 45%

Repete por 3 vezes



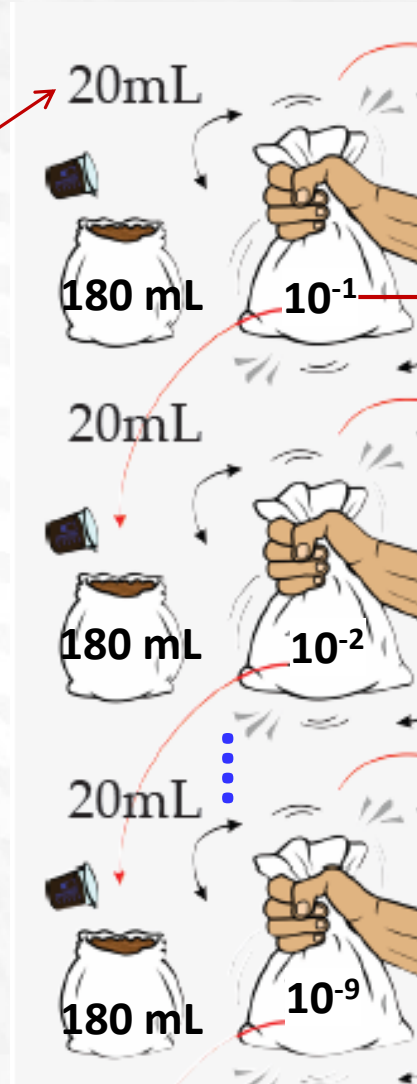
# Bioensaio de número mais provável (NMP) de propágulos infectivos

## Diluição seriada decimal (base 10 ou dez vezes) da amostra

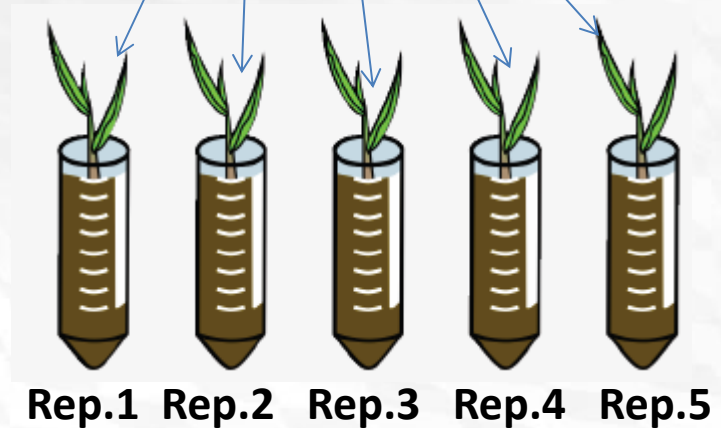


5 repetições de 1 mL

Diluição 10<sup>0</sup>



5 repetições de 1 mL



Planta teste: *Brachiaria decumbens*

Nº de esporos e NMP tem de ser igual ou superior aos garantidos ou declarados no registro do produto

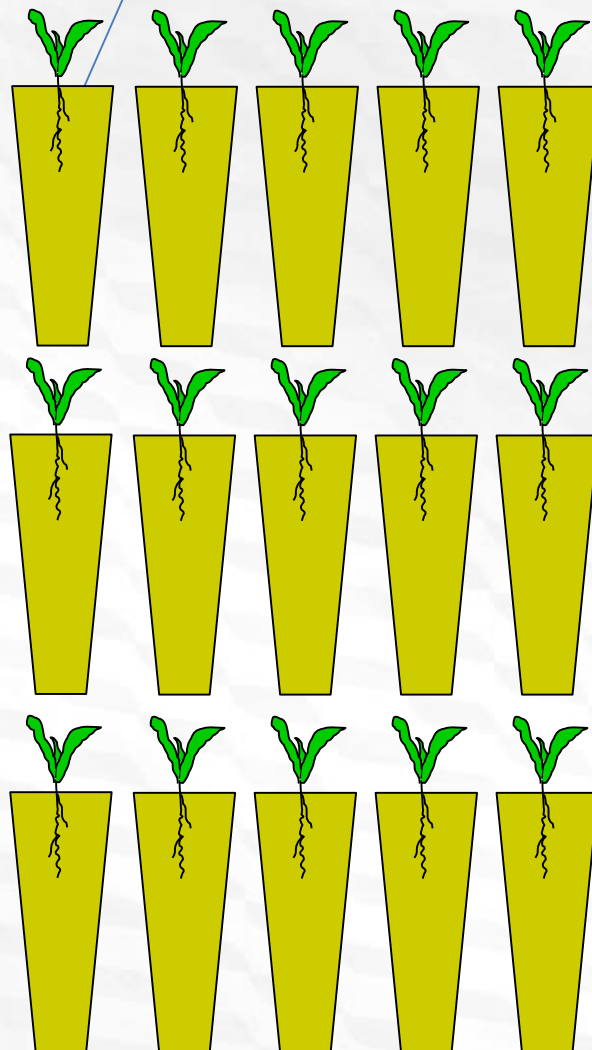
# Bioensaio de infectividade micorrízica



Diluição da amostra na dosagem recomendada do produto

Tubetes de 250 mL

Condução por 28-35 dias



Controle positivo  
*Rhizophagus clarus*

Controle negativo

Planta: *Brachiaria decumbens*

5 repetições

Microscopio



# O bioensaio de infectividade micorrízica

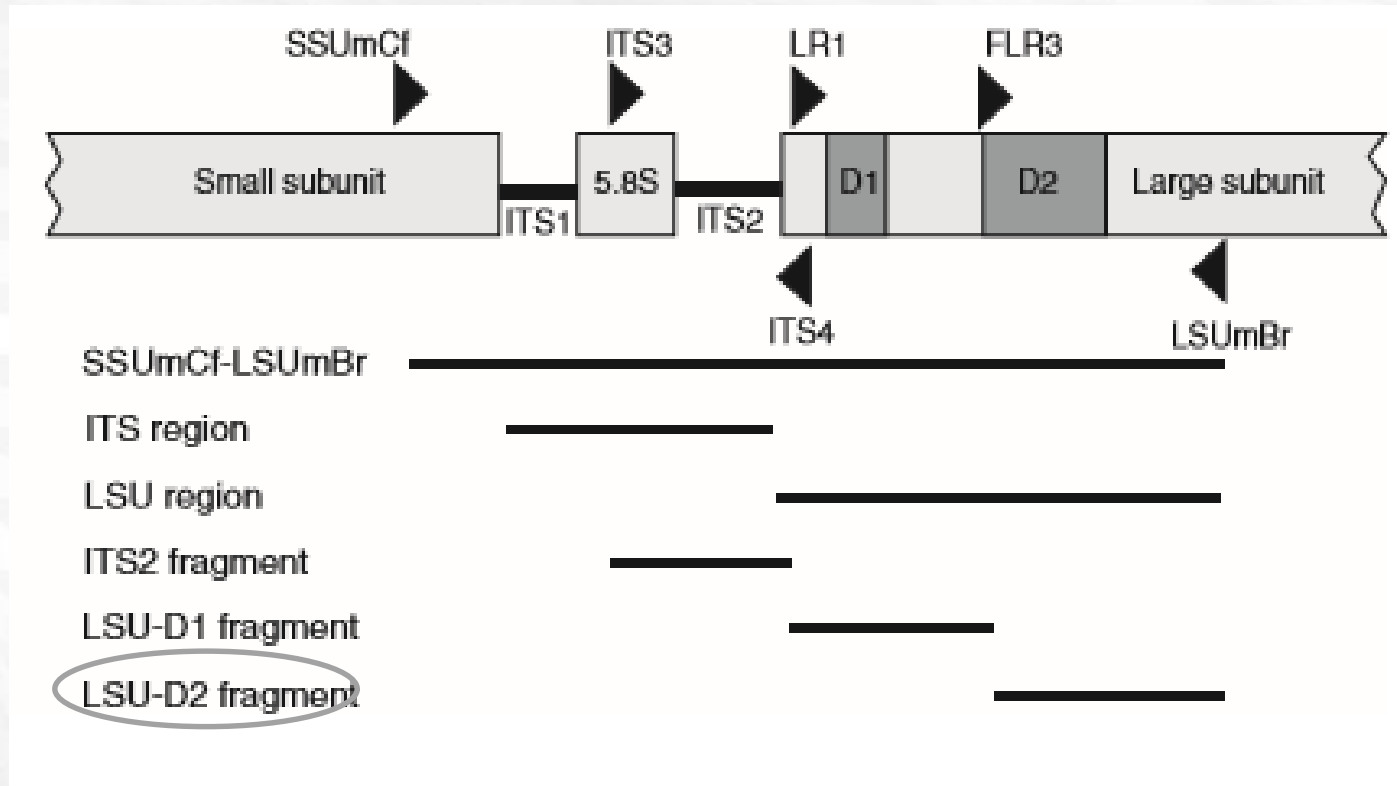
Sobre o resultado da análise:

§ único. O inoculante será classificado pelo resultado nas categorias:

- a) **mais que 30% de colonização micorrízica** – inoculante comercializável como “Promotor de Micorrizas Arbusculares – Classe A”;
- b) **entre 15 e 30 % de colonização micorrízica** – inoculante comercializável como “Promotor de Micorrizas Arbusculares – Classe B”;
- c) **menor ou igual a 14% colonização micorrízica** – inoculante não comercializável como “Promotor de Micorrizas Arbusculares”

# Identificação por biologia molecular

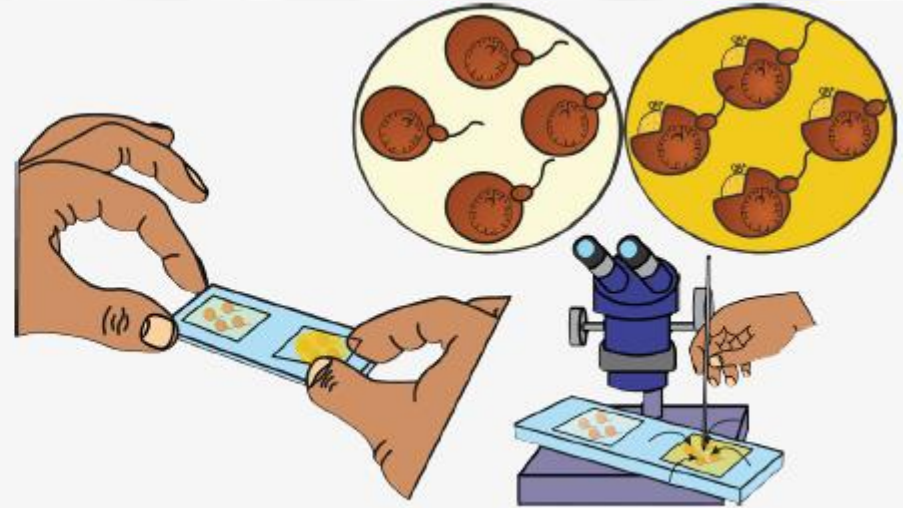
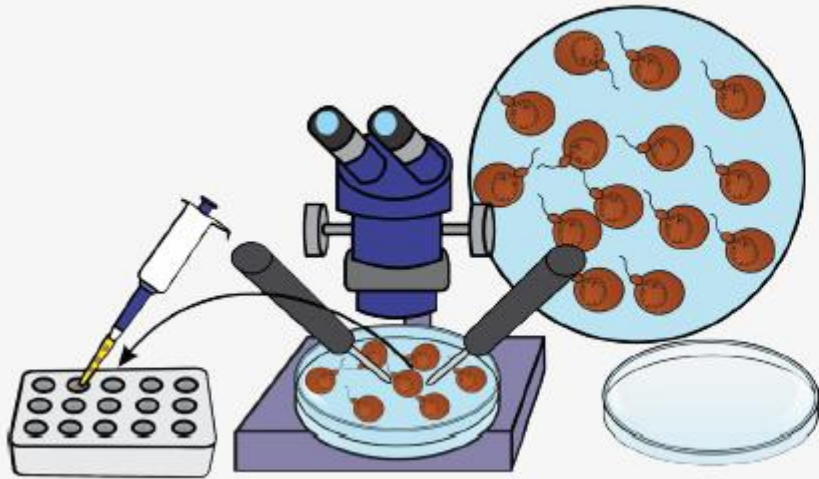
Uso do fragmento de DNA identificador (“DNA Barcode”) de 1500 pb amplificado pelos “primers” SSUmCf e LSUmBr



Herbert Stockinger, Manuela Krüger & Arthur Schüßler, DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi, *New Phytologist*, v.187, n.2, p.461-474, 2010



# Identificação dos FMAs por morfologia dos esporos



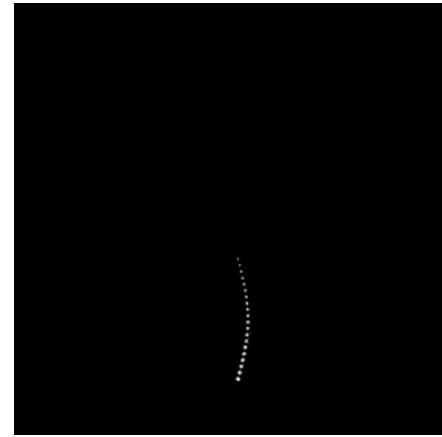
*Gigaspora margarita*



*Acaulospora scrobiculata*



Obrigado



---

[orivaldo.saggin@embrapa.br](mailto:orivaldo.saggin@embrapa.br)



MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO

