Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

GABINETE DO MINISTRO

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 40, DE 30 DE SETEMBRO DE 2009

O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe confere o art. 87, parágrafo único, inciso II, da Constituição, tendo em vista o disposto no art. 28, da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, nos arts. 78, 79, 82 e 108, do Decreto nº 5.153, de 23 de julho de 2004, e o que consta do Processo nº 21000.007110/2009-19, resolve:

Art. 1º Oficializar as Regras para Análise de Sementes compostas por três volumes: Regras para Análise de Sementes (ISBN 978-85-99851-70-8), Manual de Análise Sanitária de Sementes (anexo ao Capítulo 9 - Teste de Sanidade de Sementes) (ISBN 978-85-99851-64-7) e o Glossário Ilustrado de Morfologia (ISBN 978-85-99851-74-6), que constituem os anexos I, II e III, aprovados pela Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial e cuja adoção é obrigatória pelos Laboratórios de Análise de Sementes credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

§ 1º Os três volumes referidos no caput deste artigo estarão disponíveis no sítio eletrônico do MAPA, na rede mundial de computadores no endereço <http://www.agricultura.gov.br>.

§ 2º Os métodos oficializados terão validade para análise das amostras de sementes a partir do ano de 2010.

Art. 2º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 3º Ficam revogadas a Portaria nº 77, de 3 de março de 1993, a Portaria nº 145, de 30 de junho de 1994, a Instrução Normativa nº 19, de 18 de outubro de 2005, e a Instrução Normativa nº 47, de 3 de setembro de 2008.

REINHOLD STEPHANES

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

PORTARIA Nº 340, DE 28 DE SETEMBRO DE 2009

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso das atribuições que lhe confere o art. 103, inciso IV, do Anexo da Portaria nº 45, de 22 de março de 2007, tendo em vista o disposto no art. 31, da Lei nº 9.784, de 29 de janeiro de 1999, no art. 1º, inciso VI, da Portaria nº 215, de 27 de abril de 2001, e o que consta do Processo nº 21000.004661/2009-21, resolve:

Art. 1º Submeter à consulta pública pelo prazo de 90 (noventa) dias, anteprojeto de Instrução Normativa que estabelece os MÉTODOS OFICIAIS PARA ANÁLISE DE INOCULANTES, na forma dos Anexos a esta Portaria.

Parágrafo único. Os Anexos do anteprojeto previsto no caput estarão disponíveis na rede mundial de computadores, na página eletrônica do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no sitio: www.agricultura.gov.br, Legislação, Sislegis, Portarias em Consulta Pública.

Art. 2º As sugestões ao anteprojeto de que trata o art. 1º, uma vez tecnicamente fundamentadas, deverão ser encaminhadas, por escrito, para a Coordenação Geral de Apoio Laboratorial da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (CGAL/SDA/MAPA), situada na Esplanada dos Ministérios, Bloco D, Anexo B, Sala 433-B, CEP 70.043-900, Brasília-DF, ou para o endereço eletrônico cgal@agricultura.gov.br.

Art. 3º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação.

INÁCIO AFONSO KROETZ

ANEXO

ANTEPROJETO DE INSTRUÇÃO NORMATIVA
INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº , DE DE DE 2009

O SECRETÁRIO DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, no uso da atribuição que lhe conferem os arts. 9º e 42, do Anexo I, do Decreto nº 5.351, de 21 de janeiro de 2005, e tendo em vista o disposto na Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, no Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, na Instrução Normativa SARC nº05 de 06 de agosto de 2004, e o que consta do Processo nº 21000.004661/2009-21, resolve:

Art. 1º Aprovar os MÉTODOS OFICIAIS PARA ANÁLISE DE INOCULANTES, na forma desta Instrução Normativa.

Art. 2º As dúvidas suscitadas na aplicação desta Instrução Normativa serão resolvidas pela Secretária de Defesa Agropecuária.

Art. 3º Esta Instrução Normativa entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 4º Fica revogado o anexo IV da Portaria SDA nº 31, de 08 de junho de 1982.

INÁCIO AFONSO KROETZ

ANEXO I

MÉTODOS OFICIAIS PARA CONTAGEM, IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE PUREZA DE INOCULANTES

Art. 1º Este anexo estabelece os métodos oficiais para contagem, identificação e análise de pureza de inoculantes.

Art. 2º A amostra deverá ser preparada observando os seguintes parâmetros:

I - A abertura das embalagens (pacotes, sachês, bolsas, bexigas ou frascos) contendo os microrganismos deverá ser realizada em capela de fluxo laminar, a fim de evitar contaminações.

II - Antes da abertura, as embalagens deverão ser desinfetadas, externamente, com algodão ou papel toalha, embebido em álcool 70%.

Parágrafo único. Todos os materiais utilizados nas análises deverão ser previamente esterilizados.

Art. 3º A diluição seriada decimal deverá ser preparada observando os seguintes procedimentos:

I - A diluição seriada decimal é o primeiro passo a realização das análises de concentração e de pureza de inoculantes.

II - A diluição seriada decimal deve ser preparada em capela de fluxo laminar utilizando tubos de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85%) esterilizada e a primeira diluição (10^{-1}) será obtida de acordo com o suporte do inoculante a ser analisado.

III- Para inoculantes turfosos, pesar na capela de fluxo laminar 10,0 g do inoculante em frasco de 250-300 mL e adicionar 90,0 mL de solução fisiológica a fim de formar a diluição 10^{-1}. Este frasco deverá ser homogeneizado em agitador orbital por um período de 20 minutos para depois ser coletada, com pipeta ou micropipeta, uma alíquota de 1,0 mL que será transferida para um tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica, formando a diluição 10^{-2}. Do tubo com a diluição 10^{-2}, retirar 1,0 mL com uma nova pipeta ou ponteira e transferir para outro tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica para formar a diluição 10^{-3} e assim, sucessivamente, até formar a diluição que permita a contagem de 30 a 300 colônias por placa e contemple a concentração garantida no produto. Em cada procedimento de transferência da alíquota de 1,0 mL, descartar a pipeta ou ponteira utilizada e agitar o tubo em vórtex por vinte segundos.

IV - Para inoculantes líquidos, homogeneizar vigorosamente a embalagem e coletar assepticamente a alíquota de 1,0 mL transferindo-a para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução fisiológica a fim de formar a diluição 10^{-1}. Continuar procedendo da mesma forma que para o inoculante turfoso, até formar a diluição que permita a contagem de 30 a 300 colônias por placa e que contemple a concentração garantida no produto.

§1º - Todos os cuidados normais de assepsia devem ser observados durante o procedimento.

§2º - A mesma série de diluições é suficiente para a análise de pureza e para contagem com a utilização de placas de Petri com meios sólidos, frascos com meios semi-sólidos ou a infecção em plantas.

§3º - Todos de cada amostra de inoculante deverão ser preparadas duas séries de diluição, denominadas A e B. O resultado final de cada análise será obtido pela media dos resultados das duas alíquotas.

Art. 4º Para os Métodos para avaliação da concentração de inoculantes devem ser observados:.

§ 1º Dependendo do objetivo, após a diluição seriada deverão ser observados os três métodos a seguir, para a contagem das bactérias em inoculantes:

I - Espalhamento e contagem em placas de Petri com meio sólido, para rizóbios e bactérias diazotróficas associativas;

II - Infecção em plantas, também conhecido como método do número mais provável em plantas (NMPP), para rizóbios;

III - Contagem em meios semi-sólidos, também conhecido como método do número mais provável (NMP) para bactérias diazotróficas associativas;

§ 2º Os meios a serem utilizados encontram-se descritos no item 7 e a indicação de seu uso sumarizada na Tabela 1, que também descreve a faixa de dias para avaliação dos resultados por contagem.

Tabela 1. Indicação de meios de culturas e faixas de dias para contagem na análise de concentração de inoculante por contagem em placa com meio sólido e por número mais provável.

Microrganismo	Meio de Cultura para contagem em placa	Faixa de dias para contagem em placa	Meio de Cultura para NMP	Faixa de dias para contagem em NMPP[a]/NMP[b]
Azorhizobium	79 + VC*	5 a 7	NA**	25 a 30[a]
Azospirillum	Batata e NFb	5 a 7	NFb, LGI e FAM	5 a 7[b]
Azotobacter	LG	3 a 5	NA	NA
Burkholderia	79 + VC	3 a 5	NA	25 a 30
Bradyrhizobium	79 + VC	5 a 12	NA	25 a 30[a]
Burkholderia (associativa)	JMV	5 a 7	JMV	5 a 7[b]
Burkholderia (simbiótica)	79 + VC	2 a 4	NA	25 a 30[a]
Ensifer (Sinorhizobium)	79 + VC	2 a 4	NA	25 a 30[a]
Gluconacetobacter	Batata-P	7 a 10	LGI-P	7 a 10[b]
Herbaspirillum	Batata	5 a 7	JNFb	5 a 7[b]
Mesorhizobium	79 + VC	2 a 5	NA	25 a 30[a]
Rhizobium	79 + VC	2 a 3	NA	20 a 30[a]
Sphingomonas	Batata	7 a 12	NFb	8 a 12[b]

* Meio 79 + Vermelho Congo

** Não se aplica

Art. 5º Para rizóbios e bactérias diazotróficas associativas, será utilizado o método Contagem em placas de Petri.

Art. 6º Para a Técnica do espalhamento devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - Com este método os resultados são obtidos em períodos variáveis dependendo do gênero, da espécie e do meio que se está utilizando.

II - Alíquotas de 0,1 mL das diluições sucessivas A e B, iniciando em 10^{-5}, são inoculadas na superfície dos meios de cultura nas placas de Petri. Em seqüência essas alíquotas devem ser uniformemente distribuídas na superfície do meio, usando-se para isso um bastão de vidro com uma extremidade em triângulo (alça de Drigalski). Para cada diluição deverão ser feitas três repetições das alíquotas A e B.

III - A incubação deve ser feita a 28ºC e a primeira observação, para acompanhar o desenvolvimento das colônias deverá ser efetuada, diariamente a partir do 2º dia da incubação e a contagem das colônias realizada conforme Tabela 1.

Parágrafo único. Esse método pode apresentar inconvenientes quando empregado para inoculantes que apresentam contaminação. O inconveniente do método prende-se ao fato de que geralmente os meios de cultivo não são seletivos, possibilitando o desenvolvimento dos contaminantes. Alternativamente, no caso da avaliação de produtos inoculantes formulados com Bradyrhizobium spp., que contenham um número elevado de contaminantes, a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pode ser feita em meio 79 acrescido de 100 mg L^{-1} solução estoque de actidione/ciclohexamida (item 7), que permite o crescimento de Bradyrhizobium spp. e inibe o crescimento de contaminantes.

Art. 7º Para a Contagem das Colônias e Cálculo do Número de Bactérias devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - Para rizóbios e bactérias diazotróficas associativas, será utilizado o método Contagem em placas de Petri.

II - Marcar e contar as unidades formadoras de colônias e registrar o número contado. No caso de inoculantes com presença de contaminantes, recorrer a contagens sob lupa para facilitar o reconhecimento das colônias da(s) estirpe(s) utilizada(s) no inoculante.

III - Deve ser considerada a diluição cuja média de contagem das três placas estiver na faixa entre 30 e 300 UFC. Se nenhuma das duas diluições sucessivas apresentarem média das placas entre 30 e 300 calcular a média das duas diluições mais próximas da faixa de contagem. Caso uma das repetições apresente discrepância acima de 50% esta não deve ser considerada no cálculo da média.

IV- O número de bactérias é dado pela fórmula:

Nº de célula/grama ou mililitro de inoculante = f x N

onde:

f = fator de diluição e

N = número médio de colônias das três placas na diluição selecionada.

V - O fator de diluição é dado pela recíproca da diluição na placa multiplicada por dez, no caso de inoculação de 0,1 mL.

VI - Como exemplo, considerando-se a inoculação de 0,1 mL das diluições 10^{-5},10^{-6} e 10^{-7}, o cálculo pode ser efetuado empregando-se os seguintes fatores:

Diluição	Fator (f)	N.º de células/g ou mL de inoculante
10^{-5}	10^{6}	N x 10^{6}
10^{-6}	10^{7}	N x 10^{7}
10^{-7}	10^{8}	N x 10^{8}

Art. 8º Para o Método do número mais provável (NMPP) - Infecção em plantas devem ser observados os seguintes procedimentos:

I - O método do número mais provável em planta é um processo indireto de contagem que envolve a inoculação de diluições seriadas das amostras do produto inoculante em plantas testes específicas, cultivadas em condições assépticas. Este método pressupõe que a infectividade e a formação de nódulos conferem caráter positivo ao teste, enquanto que a ausência de nodulação confere caráter negativo ao mesmo. Para eficácia do teste a última diluição tem que apresentar todas as repetições negativas, evitando a subestimação do NMPP.

Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico http://www.in.gov.br/autenticidade.html, pelo código 00012009100100004

Documento assinado digitalmente conforme MP nº 2.200-2 de 24/08/2001, que institui a Infraestrutura de Chaves Públicas Brasileira - ICP-Brasil.