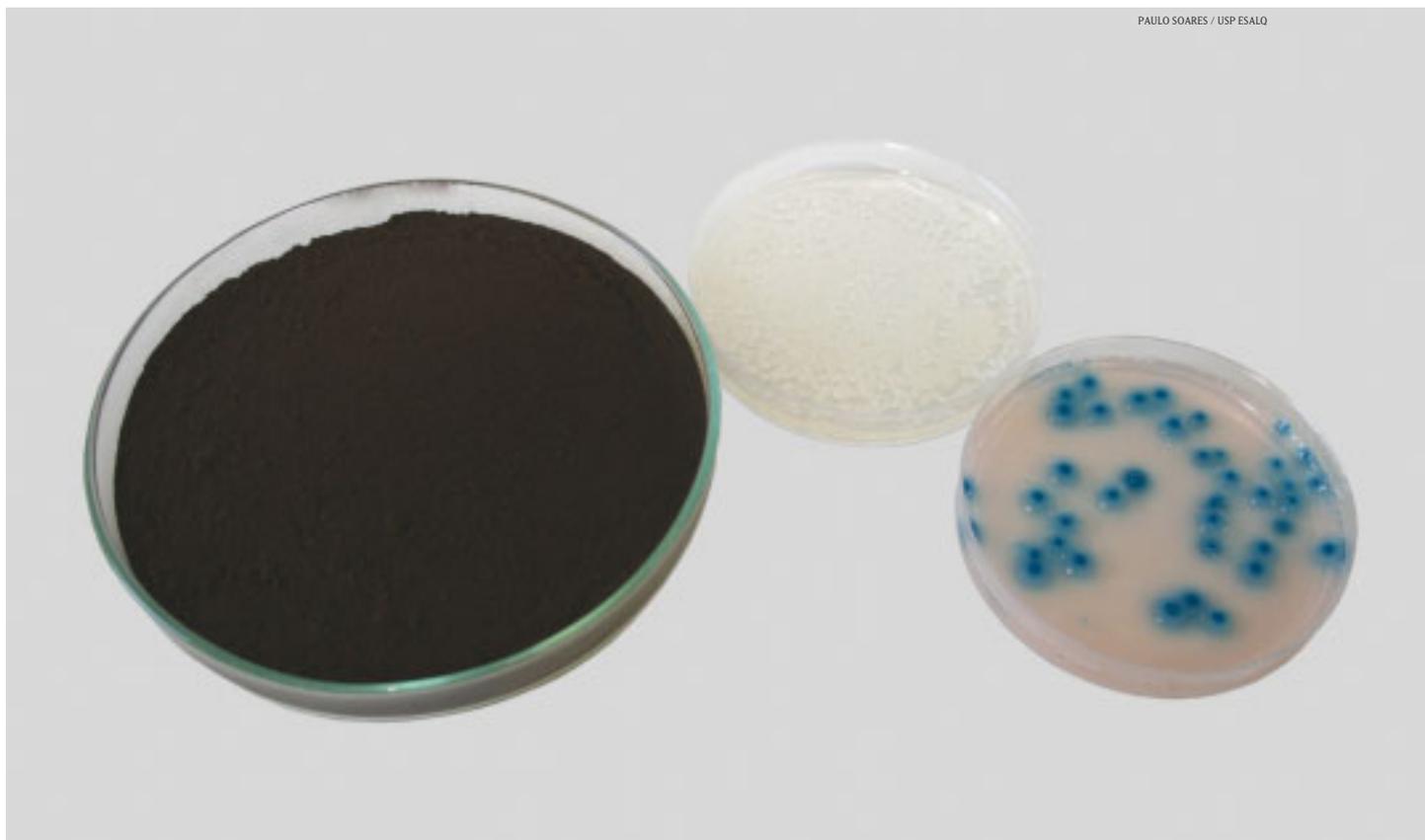


Simbiose

Inoculantes promovem economia na produção de soja

Siu Mui Tsai, Wladecir Salles de Oliveira, David Tsai, Paulo Roberto Rela e Maria Helena de Oliveira Sampa

PAULO SOARES / USP ESALQ



Turfa usada como veículo de inoculante e colônias de *Bradyrhizobium elkanii*

A indústria de inoculantes para leguminosas contribui de forma significativa para a economia de adubos, em todo o mundo. Isso porque a maioria dos autores observa que o aumento de células viáveis de *Bradyrhizobium/Rhizobium* aplicadas em sementes de leguminosas normalmente aumenta a nodulação e fixação de nitrogênio,

especialmente quando não se fornece fertilizante nitrogenado à planta, como no caso da soja. O objetivo básico da inoculação é promover o aumento de uma bactéria adequada na rizosfera, no momento da formação do nódulo. O aumento do número de *Bradyrhizobium/Rhizobium* na semente favorece a sobrevivência da bactéria no momento do plantio, pois aumenta a probabilidade de recebimento de estímulos, pela ação da rizosfera, multiplicando-se e formando uma nodulação precoce. No caso da soja, a contribuição pode chegar ao redor de 120 kg de nitrogênio por hectare, durante o ciclo de cultura, quando condições adequadas são fornecidas.

Para facilitar a introdução de um alto número de células bacterianas e aumentar a sobrevivência destas no solo, diversas alternativas são adotadas pelas tecnologias da inoculação. A forma mais simples é o uso de suspensões líquidas contendo as bactérias vivas. Métodos alternativos, como preparações liofilizadas de bactérias ou adições de carboximetilcelulose também são usadas, mas muitas bactérias não sobrevivem bem em formulações secas. Os substratos mais comuns são os compostos naturais, como turfas – um dos mais tradicionais – ou outros materiais de origem vegetal, cuja escolha deve basear-se principalmente nos teores de carbono, que devem ser elevados.

Verifica-se atualmente uma tendência crescente de uso de inoculantes líquidos, que facilitam o processo em campo. Essa tecnologia, desenvolvida recentemente por empresas fabricantes de inoculantes, requer o uso de aditivos e agentes termoprotetores, tendo sido alvo de pesquisas sobre os aspectos operacional e de custos de produção. Porém, em caso de áreas novas ou mesmo quando a semeadura ocorre em ambientes estressados, o uso de substratos turfosos pode atuar na sobrevivência do

inóculo, por meio do fornecimento de um ambiente mais favorável e protetor contra as condições normalmente mais desfavoráveis do solo, como casos de acidez e altas temperaturas. Segundo Van Veen et al. (1997), existem diversas razões para que o ambiente/solo seja desfavorável à bactéria inoculante: a) deficiência nutricional para manutenção e multiplicação das células introduzidas; b) condições ambientais subótimas em potencial matricial de solo, pH, concentração osmótica e temperatura; c) presença de predadores e outros microrganismos estabelecidos, adaptados e antagonistas à bactéria.

Para que haja sucesso no estabelecimento da bactéria introduzida, o substrato usado como veículo pode ser fundamental na sobrevivência do inóculo, durante o armazenamento e após sua introdução na semente e no solo. Outras características desse veículo são a fácil manipulação e a aplicação da formulação no local, a custos acessíveis para a obtenção e produção do inoculante, nos padrões requeridos e com baixa toxicidade, após sua manipulação na indústria. Como ponto-chave, já se considera, desde o início dos anos 80, a necessidade de um sistema efetivo de controle de qualidade, isto é, há necessidade de que seja feita uma série de checagens durante e após a produção do inoculante, garantindo-se uma elevada população de rizóbios, para que haja nodulação abundante.

Dentre esses fatores, a esterilização dos substratos produz inoculantes de qualidade superior. No caso de substratos como turfas, usados como veículos de bactérias fixadoras de nitrogênio (inoculantes), a esterilização por radiação gama é recomendada há mais de três décadas, considerando-se pelo menos três preocupações relevantes para a produção comercial de inoculantes (Stephens; Rask, 2000): a) qualidade e processamento do veículo ou substrato;

b) pureza e eficiência na nodulação e fixação do nitrogênio (N_2) pela bactéria selecionada; c) eficiência no processamento industrial da cultura para a obtenção de um alto número de células, tanto na fábrica, quanto no produto acabado.

Diversos métodos para esterilização são adotados no acondicionamento desses substratos. Na maior parte dos países que requerem a esterilização do substrato (p. ex. turfa), o mais comum é a radiação gama, por uma fonte de cobalto 60 (^{60}Co), para uma taxa de radiação média de 50 kGy. Dependendo da turfa, essas doses não são suficientes para a eliminação completa de microrganismos, especialmente aqueles que apresentam resistência ou outras formas de reprodução mais resistentes à radiação (p. ex. esporos de actinobactérias e *Bacillus*). Assim, o número de bactérias inoculadas decresce rapidamente ao longo do armazenamento, em função da presença desses microrganismos, muitas vezes produtores de compostos inibidores (p. ex. antibióticos). No Brasil, a esterilização via radiação gama substituiu, no final dos anos 80, a autoclavagem da turfa e é o método recomendado pelos órgãos federais, pois eleva a sobrevivência das bactérias e melhora a qualidade dos inoculantes turfosos. Porém, se doses subótimas forem aplicadas (p. ex. 10 kGy), pode ocorrer o aparecimento de microrganismos indesejáveis e produtores de metabólitos antagonistas à sobrevivência dos rizóbios inoculados no substrato (p. ex. actinomicetos).

A aceleração de elétrons é a mais recente tecnologia para a esterilização de substratos, na produção de inoculantes. Trata-se de um processo não-nuclear que depende principalmente da exploração de uma série de cavidades de aceleração, resultando em um feixe de elétrons com energia de 10×10^6 eV, com a qual a turfa é irradiada e, desse modo,

FIGURA 1 | CONTAGEM DE COLÔNIAS DE *R. TROPICI* CM-01 GUS+A, AOS 210 DIAS, NA DILUIÇÃO 10^7 EM AMBAS, AS PLACAS CONTENDO MEIO YMA, COM INDICADOR VERMELHO CONGO: A) TURFA QUE RECEBEU DOSE DE 40 kGy DE RADIAÇÃO GAMA ^{60}Co ; COLÔNIAS BRANCAS, ATINOBACTÉRIAS E COLÔNIAS RÓSEAS, *R. TROPICI*; B) TURFA QUE RECEBEU DOSE DE 40 kGy, POR MEIO DE FEIXE DE ELÉTRONS

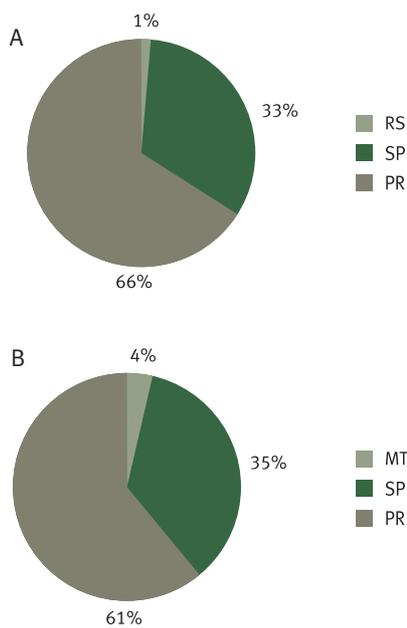


esterilizada (Stephens; Rask, 2000). Um dos maiores benefícios da esterilização por feixes de elétrons é o tempo de resolução mais curto, pois a turfa pré-embalada fica exposta ao processo de esterilização somente por alguns segundos, contra horas gastas no processo por irradiação gama. No Uruguai, existe uma legislação para controle rigoroso da qualidade de inoculantes, mas não existem grandes depósitos de turfas nem facilidades para que haja uma rotina de esterilização das mesmas. A solução encontrada pelos uruguaios para o problema foi importar turfas pré-esterilizadas do Canadá, para serem inoculadas no Uruguai. A legislação brasileira requer que os substratos turfosos sejam pré-esterilizados por meio de radiação gama (^{60}Co), sendo recomendada a dose de 50 kGy, para uma efetiva eliminação de patógenos e sa-

prófitas que podem competir com a bactéria introduzida.

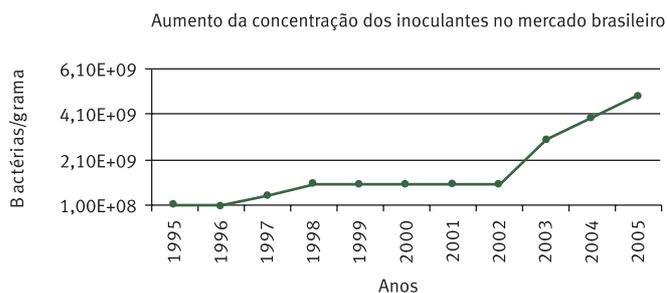
O Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen) de São Paulo iniciou o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para o tratamento de lodo de esgoto. Submetendo o material à esterilização por feixes de elétrons, é possível obter-se a remoção e a degradação eficiente dos poluentes orgânicos refratários e tóxicos, além da desinfestação de agentes patogênicos. Essa tecnologia está sendo testada para a esterilização de turfas, na produção de inoculantes comerciais (Tsai et al., 2005). A utilização de feixes de elétrons foi considerada uma nova alternativa de radiação para pré-esterilização da turfa, com vantagens sobre a primeira técnica, por ser ecologicamente mais segura e mais rápida. Há, porém, a desvantagem de haver menor profundidade de penetração da radiação, em relação ao

FIGURA 2 | PRODUÇÃO (A) E IMPORTAÇÃO (B) DE INOCULANTES NO BRASIL, 2004



Fonte: Queiroz (2005)

FIGURA 3 | MELHORA DA QUALIDADE DO INOCULANTE NO BRASIL, NOS ÚLTIMOS ANOS



Fonte: Araújo (2005)

⁶⁰Co. Testes feitos pelo Ipen indicaram um elevado número de células da bactéria *Rhizobium tropici* CM-01 Gus⁺ inoculada em substratos turfosos submetidos a dois processos de esterilização, sendo que ambos atendem aos padrões mínimos requeridos pelas normas brasileiras e internacionais de qualidade de inoculantes, pelo prazo de validade de 180 dias – acima de 1×10^7 UFC/g de substrato, após realizados os devidos testes de sobrevivência com a bactéria inoculante.

Pelos dados apresentados nesse trabalho, conclui-se que a esterilização por radiação por feixes de elétrons apresenta-se como uma alternativa efetiva para a produção de inoculantes de alta qualidade, controlando melhor os agentes antagonistas da bactéria (Figura 1). A fiscalização é realizada pela Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), de Brasília, DF, e tem como um de seus objetivos a melhoria dos níveis de conformidade e qualidade dos inoculantes, da produção até a comercialização. As atividades básicas de fiscalização incluem o registro dos estabelecimentos produtores e importadores

dos produtos e a fiscalização das indústrias e pontos de ingresso. Os estabelecimentos produtores se concentram em São Paulo (3), Paraná (3), Rio Grande do Sul (2) e Goiás (1). Um resumo da produção e importação de inoculantes por Estado é apresentado na Figura 2. A Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (Relare) foi criada em maio de 1985, para revisão da metodologia oficial e conta com o Laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio da Fepagro, RS, para as análises fiscais.

A Resolução Mercosul n. 28/1998 – Análise de Qualidade, que especifica determinações sobre a concentração, pureza e identidade das bactérias usadas em inoculantes, tem contribuído para um maior controle de qualidade nos países do Mercosul e no Brasil. A legislação específica para inoculantes é orientada pela Lei n. 6.894/80, pelo Decreto n. 4.954/2004 e pela Instrução Normativa n. 10/2004 (I.N. 05 Inoculantes). O índice de conformidade de 87%, observado pela fiscalização do Mapa, analisando 2,7 milhões de doses no primeiro semestre

de 2005 (um dos melhores valores obtidos nos últimos anos, em relação às análises fiscais – Queiroz, 2005), são comprovados também pela análise de inoculantes para soja no Brasil, apresentados na Figura 3 (Araújo, 2005).⁶¹

* **Siu Mui Tsai** é pesquisadora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Cena) da USP (tsai@cena.usp.br); **Wladecir Salles de Oliveira** é pesquisador da Monsanto do Brasil Ltda. (wladecir.s.oliveira@monsanto.com); **David Tsai** é professor da Faculdade de Tecnologia de São Paulo (FATEC). (david.tsai@terra.com.br); **Paulo Roberto Relá** (prela@ipen.br) e **Maria Helena de Oliveira Sampa** (mhosampa@ipen.br) são pesquisadores do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO S. C. Influência da qualidade no uso de inoculantes para soja no Brasil. In: REUNIÃO IBERO-AMERICANA DE BIOFERTILIZANTES – BIOFAG, 2., Salvador, BA, out, 2005.
- QUEIROZ M. de A. Fiscalização e registro de inoculantes no Brasil. In: REUNIÃO IBERO-AMERICANA DE BIOFERTILIZANTES – BIOFAG, 2., Salvador, BA, out, 2005.
- STEPHENS J. H. G.; RASK H. M. Inoculant production and formulation. *Field Crops Res.*, n. 65, p. 249-258, 2000.
- TSAI, D.; RELÁ P. R., TSAI S. M.; SAMPA M. H. de O. Radiação por feixes de elétrons e sua aplicação como agente esterilizante de microrganismos em substrato turfoso. In: INTERNATIONAL NUCLEAR ATLANTIC CONFERENCE – INAC, Santos, SP, 20 ago./2 set. 2005, 6 p.
- VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK L. S.; VAN ELSAS J. D. Fate and activity of microorganisms introduced to soil. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, n. 61, p. 121-135, 1997.