



# A INOCULAÇÃO DE LEGUMINOSAS

AUMENTO DA PRODUTIVIDADE COM A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos aparentes paradoxos da natureza. Ao mesmo tempo que é um dos elementos mais abundantes na Terra, pois 81% do ar atmosférico são compostos de nitrogênio, é um dos mais escassos nos solos e dos mais caros, seja para a nutrição vegetal, humana ou animal, nestes dois últimos sob a forma de proteínas. Este aparente descompasso, paradoxal para nossos padrões de raciocínio, deve-se ao fato de que, na atmosfera, o nitrogênio encontra-se sob a forma de  $N_2$ , uma molécula formada por dois átomos de nitrogênio unidos por uma tríplice ligação extremamente estável e que requer uma elevada energia de ativação para que venha a reagir com outros elementos. Assim, de forma natural, o nitrogênio atmosférico só é rompido durante tempestades, onde a energia das descargas elétricas fornece as condições necessárias para a quebra da molécula e a combinação do nitrogênio com o oxigênio, formando óxidos solúveis em água e que vão formar nitratos, absorvíveis pelas plantas. Em laboratório ou em indústria, para romper a molécula e combinar seus átomos com hidrogênio, formando amônia e daí partindo para outros produtos, como uréia, sulfato de amônia etc., é necessário submeter o processo a temperaturas de 5000C e a 250atm de pressão. É, portanto, um sistema altamente consumidor de energia, o que torna os derivados de nitrogênio produtos relativamente caros. Freire, J.R.J. Fixação do Nitrogênio pela Simbiose Rhizóbio/Leguminosa. In: Cardoso, E.J.B.N, Tsai, SM Neves, M.P.C (eds). Microbiologia do Solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

Desta forma, plantas e animais, embora imersos em um ambiente de nitrogênio, têm que ser nutridos com derivados deste elemento, de alto preço nos sistemas agrícolas ou pecuários. Na natureza, entretanto, existe um sistema

natural para transformar o nitrogênio atmosférico, molecular, em formas acessíveis para as plantas e, a partir daí, para os animais. Um número restrito de microrganismos, isoladamente ou em simbiose, forma uma enzima chamada



Foto 1 - Nódulos em raiz de soja.  
Foto: Coleção FEPAGRO/MIRCEN

nitrogenase, que é capaz de realizar a clivagem da molécula de nitrogênio e a combinação de seus átomos com o hidrogênio, formando amônia, nas condições ambientes de pressão e temperatura. Alguns destes microrganismos vivem de forma livre nos solos (Azotobacter, Beijerinckia, Derxia, Clostridium), outros vivem na superfície das raízes (Azospirillum), outros, ainda, no caule e folhas de algumas plantas (Herbaspirillum, Frankia) E um outro grupo, no qual vamos nos deter mais aqui, embora possa viver de forma livre nos solos, só fixa nitrogênio quando em simbiose com plantas da família das leguminosas (Rhizobium e Bradyrhizobium). Estes microrganismos constituem o grupo mais bem estudado, dentro do qual se desenvolveu uma tecnologia agrícola denominada inoculação de leguminosas e um produto denominado inoculante, que é um dos modernos insumos utilizados para se obter altas produções com retorno

financeiro. As bactérias dos gêneros Rhizobium e Bradyrhizobium não possuem a enzima nitrogenase. Vivendo nos solos, "procuram" as raízes das leguminosas afins e, através dos pêlos radiculares, penetram nos tecidos da raiz, provocando uma estrutura celular diferenciada, que dá origem a um nódulo. No interior deste nódulo, a bactéria vai se multiplicar e mudar de morfologia, formando os bacteróides. Formam-se, também, duas substâncias não-existentes nem na leguminosa e nem na bactéria, isoladamente: a leghemoglobina e a nitrogenase. A primeira é a responsável pelo transporte de oxigênio no interior do nódulo, tendo uma estrutura química semelhante à hemoglobina do sangue, inclusive com uma cor avermelhada, que se nota ao se cortar um nódulo ao meio. Já a nitrogenase é a responsável, como dissemos acima, pela clivagem da molécula

de nitrogênio e sua combinação com o hidrogênio. A amônia formada no interior dos nódulos sofre algumas reações intermediárias, sendo estas substâncias transportadas para toda a planta pela seiva, entrando no pool de aminoácidos. Este sistema é tipicamente simbiótico, pois a bactéria passa a fornecer o nitrogênio do qual a planta necessita e recebe desta os carboidratos para sua sobrevivência e serve de fonte de energia para reduzir o  $N_2$  do ar a  $NH_3$ .

## As bactérias simbióticas

As bactérias dos gêneros Rhizobium e Bradyrhizobium são específicas para determinados grupos de plantas. Assim, Bradyrhizobium japonicum e elkani nodulam a soja. Rhizobium tropici e Rhizobium leguminosarum bv phaseoli nodulam o feijoeiro, Rhizobium leguminosarum bv trifolii nodula os trevos. Entretanto, além desta divisão em espécie, cada espécie se subdivide em

estirpes, que se diferenciam entre si por diversas características, entre elas a de fixar mais ou menos nitrogênio. Assim, existem estirpes que fixam todo o nitrogênio necessário para a produção normal da planta e outras que não fixam praticamente nada. Um dos mais importantes trabalhos dos pesquisadores da área é o de selecionar estirpes de elevada eficiência, levando em conta, também, outras características, como competitividade frente às estirpes existentes no solo, bom crescimento em meios industriais, eficiência em uma ampla gama de cultivares etc. Esta seleção é realizada, inicialmente, em condições de laboratório, onde é feita uma primeira triagem em um grande número de isolados. Após esta primeira triagem, as de melhor desempenho são testadas em vasos com solo, em casa de vegetação. Novamente as melhores são levadas para testes de campo, para a seleção final. Estes testes, nas leguminosas mais cultivadas, estão sendo feitos em rede, com várias instituições, em locais diversos do país, realizando os experimentos, sempre em comparação com as estirpes tomadas como padrão. Finalmente, as estirpes de melhor desempenho passam a ser recomendadas ao Ministério da Agricultura para serem distribuídas às empresas produtoras de inoculante. Estas estirpes são armazenadas em um Banco de Estirpes, que é a instituição depositária deste material e a única autorizada a distribuí-lo para as empresas. No Brasil, o Banco de Estirpes se encontra na FEPAGRO/MIRCEN, da Secretaria de Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A recomendação de estirpes, baseada nos dados experimentais, é feita pela Rede de Laboratórios Recomendadores de Estirpes de Rhizobium (RELARE), que se reúne com a presença dos principais pesquisadores do país e com as empresas produtoras de inoculantes.

### A produção de inoculantes

Inoculante é definido em lei "como todo o produto à base de microrganismo, capaz de favorecer o desenvolvimento de plantas". Assim, os produtos à base de Rhizobium e Bradyrhizobium são chamados de inoculantes para leguminosas. A produção industrial de inoculantes teve início no Brasil em 1956, com uma empresa do Rio Grande do Sul, que contou com a assistência técnica do Dr. J.R. Jardim Freire, da Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul. Mas foi a partir da década de 70, com a expansão da cultura da soja no sul do Brasil e, posteriormente, com seu cultivo estendido para o Brasil Central,

que a produção de inoculantes teve sua maior expansão, com o surgimento de novas empresas. O gráfico 1 mostra a produção deste insumo nos últimos dez anos. Vê-se que há oscilações, com anos de acentuada queda na produção. Isto ocorre nos anos em que a cultura da soja



Foto 2 - Nódulos em raiz de alfafa.  
Foto: Coleção FEPAGRO/MIRCEN

sofre redução de área ou o preço do produto final é desanimador, não estimulando o produtor rural a investir na sua lavoura. Atualmente, além das empresas nacionais, diversas marcas estrangeiras passaram a disputar o mercado brasileiro, especialmente as oriundas da área do Mercosul. A tecnologia usada na produção de inoculantes teve origem, inicialmente, na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul, baseando-se em pequenos fermentadores de vidro, com capacidade para 20 litros. No final da década de 60 e início da de 70, o Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná (IBPT) desenvolveu uma tecnologia, inclusive com o desenho de equipamentos em maior escala, para 250 e 400 litros, que perdurou durante anos nas empresas brasileiras. Mas foram as próprias empresas que



Foto 3 - Fermentadores utilizados na produção massal de *Rhizobium/ Bradyrhizobium*, visando a produção de inoculantes.  
Foto: Carlos Mantovani

passaram a desenvolver sua tecnologia, desenhando fermentadores e pesquisando os parâmetros de fermentação. Em 1984, foram implantados os primeiros fermentadores de maior porte, para 1.500 litros, acoplados a um jogo de fermentadores menores, que servem como inóculos sucessivos. Esta é a

tecnologia hoje usada por, praticamente, todas as empresas brasileiras. Após o cultivo, a bactéria tem que ser veiculada em um substrato adequado para propiciar sua sobrevivência, em altas concentrações, até o momento do uso pelo agricultor. Este substrato, usado de longa data, é a turfa, que é um solo com elevado teor de matéria orgânica. A turfa para a produção de inoculantes deve possuir algumas características: alto teor de matéria orgânica (acima de 80%), baixíssimos teores de cloretos e ausência de areia, pois esta, além de prejudicar a sobrevivência do Rhizobium, irá causar desgaste nas máquinas semeadeiras. A turfa, entretanto, como todo o solo, possui um grande número de microrganismos nativos, que poderão competir ou mesmo ser antagonísticos ao Rhizobium. Daí a necessidade de se esterilizar a turfa antes de sua mistura com a bactéria. Esta esterilização é feita com radiação gama, que deve ser aplicada na dosagem mínima de 5Kgray, embora esta dosagem possa variar em função da composição microbiológica da turfa. Atualmente, a esterilização da turfa passará a ser uma exigência da legislação, visando garantir um produto de elevada qualidade. Novos substratos vêm sendo testados para a produção de inoculantes. Existem no comércio inoculantes líquidos e em forma de pó molhável. Embora promissores, principalmente por facilitarem o uso por parte do agricultor, os resultados de campo destes produtos ainda têm sido inferiores aos inoculantes turfosos. Daí haver uma recomendação clara dos órgãos de pesquisa para o uso dos inoculantes à base de turfa. Recomendações Técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil, 1996/97.

### Legislação de inoculantes

A produção de inoculantes é regida por legislação específica, de âmbito federal. O Ministério da Agricultura e do Abastecimento é o órgão encarregado de registrar os estabelecimentos produtores e os produtos. Atualmente, a legislação exige uma concentração mínima de 108 células de Rhizobium viáveis por grama de produto no momento da fabricação e de 107 células no momento do vencimento da validade do produto. Esta legislação está sendo alterada por resolução do Mercosul e a concentração mínima deverá ser de 108 células em qualquer momento até o prazo de validade.

### Resultados com o uso de inoculantes

Pode-se dizer que a cultura da soja no Brasil é economicamente viável gra-

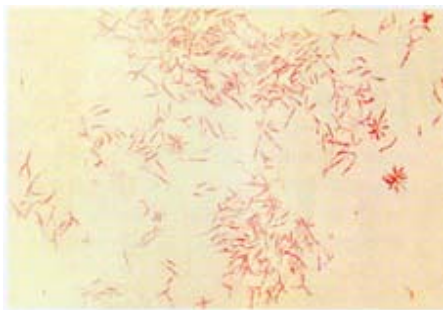


Foto 4 - Células de *Bradyrhizobium* vistas ao microscópio (aumento 1.000x, coloração com fucsina).

ças à fixação biológica do nitrogênio. Sendo uma cultura produtora de proteínas, necessita de grandes quantidades de nitrogênio para alcançar elevadas produtividades. Estima-se que uma lavoura de soja, para produzir em torno de 3.000kg de grãos por hectare, necessite de cerca de 250kg de nitrogênio, ou seja, mais de 500kg de uréia. Isto tornaria inviável o cultivo econômico desta leguminosa. Assim, a fixação biológica, tirando do ar e incorporando ao sistema solo/planta o equivalente a 200kg de N/ha, contribui, somente no caso da soja, para o aporte de 200kg X 12.000.000ha = 2 bilhões e 400 milhões de quilos de N por ano (ou 2 milhões e 400 mil toneladas). Ao preço de R\$ 760,00 a tonelada de nitrogênio, teremos uma economia de 1 bilhão e oitocentos milhões de reais. Ao se fazer este cálculo, deve-se levar em conta, também, a enorme economia de petróleo que o processo traz, pois a produção de derivados de N por processos industriais é altamente consumidora de petróleo. Em termos de produtividade, a fixação biológica do nitrogênio, no caso de algumas leguminosas, já é capaz de proporcionar todo o nitrogênio do qual a planta necessita para expressar sua capacidade genética de produção. Hoje pode-se obter produtividades, em soja, da ordem de 4.000kg por hectare sem usar nada de nitrogênio químico, somente utilizando-se a inoculação. Os aumentos de produtividade devidos ao uso de inoculante variam conforme algumas condições: na cultura da soja, em primeiro ano de cultivo da leguminosa, o inoculante é decisivo para que se obtenha bom nível de produção. Sem inoculação, muitas vezes nem se chega a colher, de tão baixa que é a produção. Em anos de plantios subseqüentes, as diferenças entre áreas inoculadas e não-inoculadas vai diminuindo, mas, assim mesmo, ainda há ganhos de produtividade que podem variar de 4 a 12%, segundo trabalhos de órgãos de pesquisa. Em feijoeiro, até pouco tempo, os níveis de fixação

eram muito baixos. Mas a pesquisa se intensificou nos últimos anos e foram selecionadas novas estirpes que hoje já contribuem eficazmente para bons ganhos de nitrogênio na cultura-base da alimentação brasileira.

### Como usar o inoculante

A inoculação consiste em colocar cerca de 80.000 células de *Rhizobium* sobre cada semente. Logicamente que isto tem que ser efetuado de uma forma prática e rápida, para facilitar o trabalho do agricultor. Isto é feito pela mistura do inoculante com as sementes umedecidas. Esta mistura pode ser feita de diversas maneiras, seja manualmente para pequenas quantidades, seja através de betoneiras ou de tambores com eixo excêntrico para quantidades maiores. Atualmente, existem máquinas desenvolvidas especialmente para o tratamento de sementes, que aplicam primeiro os fungicidas e, a seguir, o inoculante. O importante é que haja uma distribuição uniforme do inoculante sobre as sementes, fazendo com que todas fiquem recobertas com o produto, assegurando uma uniformidade na nodulação. Atualmente, é recomendado o uso de açúcar na água com a qual se vai umedecer as sementes, para aumentar a aderência do produto.

### Futuro da inoculação

A tendência moderna no cultivo de leguminosas é o uso cada mais intenso do inoculante, por ser um produto natural, de alta eficiência e com uma relação custo/benefício muito favorável para o



Foto 5 - Repique de cultura de *Bradyrhizobium*.

lado do benefício. Nas linhas de pesquisa procuram-se estirpes cada vez melhores, para propiciar altas taxas de fixação, acompanhando o melhoramento genético das plantas, que visam produtividades cada vez maiores. No campo de seleção de estirpes, já se procura introduzir melhoramento genético nos microrganismos, para que se aumente cada vez mais o nível de fixação e outras características favoráveis das bactérias. O melhoramento genético das plantas leguminosas já leva em conta a capacidade de se associar com as bactérias e de fixar altas quantidades de nitrogênio como uma das características a serem introduzidas no melhoramento e na criação de novas cultivares. No campo da fixação em outras plantas que não as leguminosas, uma das metas mais perseguidas pelos pesquisadores de todo o mundo é incrementar a fixação de nitrogênio em plantas de expressão econômica, mormente as gramíneas, podendo vir a dispensar ou pelo menos reduzir sensivelmente as quantidades de nitrogênio químico que hoje são utilizadas nestas culturas. Neste campo o Brasil é um dos países líderes na pesquisa, pois a equipe da EMBRAPA liderada pela Dra. Johanna Döbereiner tem resultados notáveis na pesquisa com *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*. Mas como este assunto já foi objeto de artigo da própria Dra. Johanna no primeiro número desta revista, deixaremos de comentá-lo aqui. Döbereiner J. - A importância da Fixação Biológica do Nitrogênio para a Agricultura Sustentável. Brasília, Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, nº 1, maio/1997 (Encarte especial, p. 2-3).

