

Colágeno hidrolisado como aditivo para inoculação de *Bradyrhizobium* em sementes de soja

PINTO, D.B.B.¹; FERREIRA, E.²; HUNGRIA, M.³ NOGUEIRA, M.A.³

¹Centro Universitário Filadélfia de Londrina - Unifil, Londrina, PR, deborabbp@hotmail.com;

²Laboratório de Biotecnologia do Solo, Embrapa Soja; ³Pesquisador, Embrapa Soja.

Introdução

A soja é uma das principais culturas no agronegócio brasileiro e uma das oleaginosas mais cultivadas no mundo. Devido seu alto teor de óleo e proteína é bastante empregada na alimentação humana e na produção de ração animal, além de aplicações em indústrias cosméticas, farmacêutica, veterinária, etc.

A cultura da soja tem elevada demanda por nitrogênio (N) devido ao alto teor de proteínas nos grãos. Para produzir 1000 kg de grãos, são necessários 15 kg de N para o desenvolvimento estrutural da planta e mais 65 kg para os grãos, resultando em uma demanda de aproximadamente 80 kg de N (Hungria et al., 1997). Essa demanda tornaria inviável a produção de soja se o suprimento de N fosse realizado por meio de fertilizantes químicos, frente ao seu elevado custo de produção. Porém, essa demanda pode ser suprida por meio de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* ao realizarem o processo de fixação biológica do N (FBN).

Os *Bradyrhizobium* presentes no solo geralmente levam mais tempo para estabelecer a simbiose com a planta hospedeira, sendo que, pelo uso de inoculantes, é possível aumentar o número de bactérias ativas viáveis aplicadas via sementes, o que aumenta a velocidade de estabelecimento da simbiose e também a ocupação nodular por bactérias mais eficientes em realizar a FBN. A inoculação de sementes de soja em áreas sem população estabelecida de *Bradyrhizobium* é essencial para a cultura, mas mesmo em áreas com alta no solo, a inoculação tem levado a um ganho médio de produtividade de 8% (Hungria et al., 2017).

Muitos setores da indústria utilizam couro para fabricação de produtos, como fábricas de sapatos, roupas, indústria automobilística, artefatos, com geração cada vez maior de resíduos, o que demanda estudos sobre seu reaproveitamento e redução dos impactos ambientais. Para produzir 200 kg de couro para comercialização, cerca de uma tonelada de pele precisa ser beneficiada, o que produz cerca de 250 kg de resíduos sólidos de couro não curtido e 200 kg de resíduos curtidos, além de 50 mil kg de águas residuárias (Erdem; Ozverdi, 2008). Entretanto, esses resíduos podem ser reaproveitados no sistema de produção ou na geração de subprodutos, como o uso de águas residuárias como fonte de nutrientes na agricultura ou a extração de colágeno para aplicação agroindustrial a partir dos resíduos de couro, respectivamente.

As células de *Bradyrhizobium* aplicadas sobre sementes de soja podem perder sua viabilidade rapidamente por meio de ressecamento, altas temperaturas ou estresse osmótico produzido por substâncias aplicadas concomitantemente às sementes, como micronutrientes e produtos fitossanitários. Entretanto, várias substâncias, geralmente polímeros, têm sido testadas como aditivos para inoculantes, visando aumentar a sobrevivência das células inoculadas e conseqüentemente manter seu potencial de inóculo por mais tempo. Nesse aspecto, o colágeno tem potencial para uso como protetor celular para inoculação de sementes de soja.

O objetivo desse trabalho foi empregar o colágeno proveniente da indústria curtumeira como aditivo para a inoculação de *Bradyrhizobium* em sementes de soja e avaliar seu efeito na sobrevivência das bactérias aplicadas às sementes.

Material e Métodos

Os testes foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, em Londrina, PR. Empregaram-se nos testes sementes de soja da cultivar BRS1010, que foram inoculadas com inoculante comercial contendo as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, em combinações com a adição do colágeno hidrolisado, cujo pH era 7,8.

Primeiramente realizou-se teste para determinar qual seria a melhor concentração de colágeno para se trabalhar, que não interferisse na distribuição das

sementes. Testaram-se as concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% do colágeno, cuja concentração final foi obtida pela diluição em água deionizada, em alíquotas de 10 mL. As misturas foram aplicadas sobre as sementes da dose de 6 mL/kg de sementes e homogeneamente distribuídas. Após a homogeneização as sementes foram deixadas a secar por XX min em condição ambiente, observando-se quanto à ocorrência de adesão entre as sementes tratadas. Observou-se que a aplicação de 6 mL/kg de sementes da concentração 50% foi a maior concentração em que não havia adesão entre as sementes.

Definida a melhor concentração para se trabalhar, testou-se a compatibilidade com *Bradyrhizobium* proveniente de um inoculante comercial contendo protetor celular. Duas alíquotas de 500 g de sementes foram tratadas, sendo a primeira recebendo 1 mL de inoculante líquido mais 2 mL de colágeno 50%, enquanto a segunda recebeu apenas 1 mL do inoculante. O inoculante empregado é um produto comercial que apresenta protetor celular. Após duas horas de tratamento, foram coletadas três alíquotas de 100 sementes de cada tratamento, suspensas em solução fisiológica 0,85%, diluídas em série e plaqueadas em triplicata em meio YMA para a recuperação das células de *Bradyrhizobium*. O ensaio de recuperação de células foi realizado de acordo com as metodologias e especificações das Instruções Normativas n. 30, de 12 de dezembro de 2010 e n. 13, de 24 de março de 2001 (Brasil, 2010, 2011).

Com base no desempenho da recuperação de células de *Bradyrhizobium* com o uso do colágeno como aditivo, foram realizados testes de sobrevivência em sementes em diferentes tempos de armazenamento. Utilizaram-se três alíquotas de 500 g de sementes, sendo uma tratada com 1 mL de inoculante sem protetor celular e 2 mL de colágeno na diluição de 50%; a segunda alíquota foi tratada com 1 mL de inoculante com protetor celular; a terceira com 1 mL de inoculante sem protetor, que foram avaliados nos tempos de: 2 h, 1 dia, 2 dias, 6 dias, 12 dias, 19 dias após a inoculação. As sementes foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em temperatura ambiente ao longo do período do teste. Para o primeiro teste com 2 h, três alíquotas de 100 sementes de cada tratamento foram suspensas em solução salina, diluídas em série e plaqueadas em triplicata em meio YMA para a recuperação das células de *Bradyrhizobium*, e assim sucessivamente para cada período

de recuperação de células. O ensaio foi realizado de acordo com as metodologias e especificações das Instruções Normativas n. 30, de 12 de dezembro de 2010 e n. 13, de 24 de março de 2011 (Brasil, 2010, 2011).

Resultados e Discussão

A concentração de 50% colágeno foi a escolhida para os testes seguintes porque após sua aplicação às sementes resultou em cobertura homogênea, formando uma fina película sobre o grão, sem que ocorresse aderência entre as sementes, fato que ocorreu nas concentrações de 75 e 100% colágeno. A aderência das sementes causaria implicações no mecanismo de distribuição de sementes, o que prejudicaria o processo de semeadura. Todos os tratamentos respeitaram o volume máximo de calda, que não deve ultrapassar 600 mL/100 kg de sementes (Henning, 2004), já que volumes maiores de solução aquosa podem causar danos à semente, prejudicando a germinação (Tecnologias..., 2013).

Com o intuito de saber qual o comportamento das bactérias de *Bradyrhizobium* com o colágeno, realizou-se o teste de sobrevivência de células. As sementes que receberam o colágeno mais inoculante tiveram uma recuperação de células três vezes maior em relação às sementes tratadas somente com inoculante (Figura 1).

Constatado que o colágeno não prejudica a recuperação de células de *Bradyrhizobium*, avaliou-se a sobrevivência das bactérias ao longo de 19 dias de armazenamento. Tal qual o teste anterior, as sementes tratadas com colágeno apresentaram maior recuperação de células quando comparadas às sementes que receberam somente inoculante sem protetor celular e inoculante com protetor (Figura 2). Na recuperação de células no dia do tratamento das sementes, todas estiveram acima do limite mínimo, uma vez que devem ser recuperadas de 80-100 mil células no momento da semeadura, sendo este número considerado o ideal para ocorrer uma boa nodulação na soja (Hungria et al., 2017). Após um dia de armazenamento, somente as sementes que receberam o colágeno ainda estavam dentro do aceitável como uma boa recuperação de células; já no sexto dia de armazenamento, nenhum tratamento apresentava recuperação de células adequada para uma boa nodulação, com uma taxa de sobrevivência próxima a 10.000 células nos

tratamentos com inoculante comum + colágeno ou inoculante comercial com protetor celular, enquanto o inoculante comum praticamente não resultou em recuperação de células.

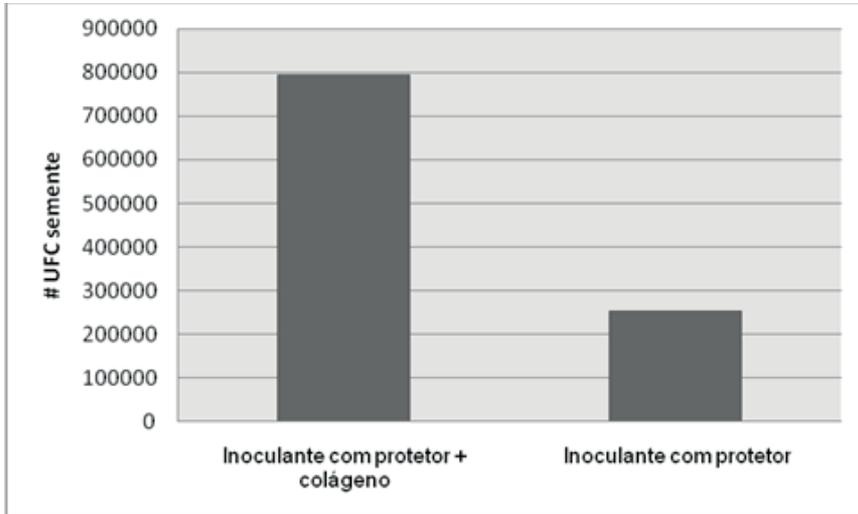


Figura 1. Número de células de *Bradyrhizobium* (UFC semente⁻¹) recuperadas de sementes de soja que recebeu inoculante com protetor celular, na presença ou ausência de colágeno.



Figura 2. Número de células de *Bradyrhizobium* (UFC semente⁻¹) recuperadas de sementes de soja inoculadas com inoculante comum, inoculante comum + colágeno, e inoculante com protetor celular, em função do tempo de armazenamento.

Conclusão

O uso de colágeno como aditivo para inoculação de *Bradyrhizobium* pode ser promissor para aumentar a sobrevivência de células inoculadas sobre as sementes de soja, beneficiando a fixação biológica do nitrogênio na cultura.

Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 13, de 24 de março de 2011. Aprovar as normas sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura, bem como as relações dos micro-organismos autorizados e recomendados para produção de inoculantes no Brasil. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 58, p.1-24, 25 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelecer os métodos oficiais para análise de inoculantes, sua contagem, identificação e análise de pureza na forma desta Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 219, p. 4-10, 17 nov. 2010.

ERDEM, M.; OZVERDI, A. Leaching behavior of chromium in chrome shaving generated in tanning process and its stabilization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 56, p. 51-55, 2008.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p. (Embrapa Soja. Documentos, 235).

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; SILVA JUNIOR, E. B.; ZILLI, J. E. Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. **Agronomy Journal**, v. 109, n. 3, p. 1-7, 2017.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J.; GALERANI, P. R. **Adubação nitrogenada na soja?**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997. 4p. (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 57).

TECNOLOGIAS de produção de soja - Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).