

Desinfestação de substratos para produção de mudas, utilizando vapor de água.

João Bosco C. Silva; Ivani T. Oliveira-Napoleão; Loeni L. Falcão

Embrapa Hortaliças, C. postal 218, 70.359-970, Brasília – DF e-mail: jbosco@cnph.embrapa.br

RESUMO

O tratamento sanitário de substratos é uma operação importante no processo de produção de mudas e no cultivo de plantas em vasos ou outros contentores. Tradicionalmente tem-se utilizado o gás brometo de metila como agente desinfetante. Entretanto, a produção deste gás deverá ser abolida até o ano 2010, forçando-se a busca de novas opções. Desenvolveu-se na Embrapa Hortaliças um equipamento que utiliza o vapor de água à baixa pressão, produzido por uma caldeira industrial, com capacidade para evaporar 30 L/h de água, para aquecer o substrato contido em uma caixa metálica cilíndrica com capacidade de 2000 L. O vapor é aplicado no fundo da caixa que contém uma camada de brita coberta com uma tela metálica de malha de 2 mm, que favorece a distribuição uniforme do vapor por toda a massa de substrato. O tempo de aquecimento é de aproximadamente 3 horas e o calor armazenado durante este período mantém a massa de substrato aquecida a temperaturas pasteurizantes, por até 4 horas após a aplicação do vapor. Para testar a eficácia do sistema avaliou-se a sobrevivência dos patógenos *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Aplicou-se vapor por uma hora, não considerando o período de aquecimento, e coletaram-se as amostras após uma, duas, três ou quatro horas o início da aplicação de vapor. O tratamento por uma hora, em adição ao período de aquecimento, resultou na eliminação dos patógenos.

Palavras-chave: termoterapia, esterilização.

ABSTRACT

Disinfesting substrate for transplants production employing hot water steam.

The disinfection of substrate is an important process for transplanting production and for plant cultivation in pots or boxes. Traditionally, methyl bromide gas has been employed to eliminate microorganisms. However the production of bromide gas in Brazil will be interrupted by the year 2010 and it is necessary to search for new options. We have devised an equipment that utilizes hot steam water at low pressure produced into a boiler machine with the capacity of evaporating 30L/h of water, and heating 2,000 L of substrate contained into a cylindrical metallic box. The steam is applied under the box having a 10 cm layer of gravel covered by a metallic screen with a 2 mm grid allowing the uniform distribution of steam through the substrate. The time necessary to heat the substrate is approximately 3 hours. The heat stored during this period maintains the substrate heated at a temperature sufficient for the microorganisms control during 4 hours after steam application. To test the efficacy of this treatment, we evaluated the survival of *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. Steam was applied during one hour after the warming period and samples were collected at one, two and three hours after steam application. The heat treatment comprising one hour of steam application was enough to eliminate these microorganisms.

Keywords: thermotherapy, sterilization.

(Aceito para publicação em 04 de abril de 2001)

O tratamento sanitário de substratos é uma operação importante no processo de produção de mudas e no cultivo de plantas em vasos ou outros recipientes. O processo visa eliminar organismos causadores de doenças que podem provocar a morte das mudas e/ou servir como fonte de inóculo para disseminação de patógenos durante o transplante. Tradicionalmente no Brasil, tem-se utilizado o gás brometo de metila para o tratamento de substrato. Todavia, este gás é também um dos agentes destruidores da camada de ozônio e por isso, o seu uso deverá ser reduzido em 50% até o ano 2005 e suspenso até 2010. Assim, há necessidade de se buscar opções para o tratamento de solo e substratos (Müller, 1998).

Outros processos tais como a compostagem e a solarização do solo ou do substrato têm como principal vantagem a economia de energia. Entretanto, tem como desvantagens o tempo relativamente longo para sua execução, a desuniformidade do tratamento e a pouca garantia da eficácia dos processos. Há também equipamentos que utilizam microondas, radiação gama, ultra-violeta, ozônio e ultra-filtração, desenvolvidos para desinfestação de solo e solução nutritiva.

Uma alternativa para a substituição do gás brometo de metila é a aplicação de vapor de água ao substrato, uma vez que a combinação de umidade e temperatura alta favorece a eliminação de microrganismos e sementes de plantas invasoras.

A aplicação de vapor de água para desinfestação de solos e substratos é uma opção ambientalmente correta e tem sido utilizada em vários países. É também utilizado em praticamente todas as indústrias de processamento de alimentos e também nos processos laboratoriais, existindo inúmeros equipamentos para pasteurização ou esterilização tanto de matérias primas quanto de produtos processados.

Os equipamentos mais conhecidos que utilizam vapor de água são as autoclaves e as panelas de pressão. Embora sejam utilizados para esterilização de substrato para o cultivo de plantas, estes equipamentos não possuem mecanismos que forcem a circulação do vapor através das camadas internas da

massa de substrato, ocorrendo um gradiente de temperatura entre a superfície que fica em contato direto com o vapor e as camadas internas da massa de substrato, exigindo-se um longo tempo de tratamento para que ocorra a uniformidade de temperatura. Esse inconveniente ocorre porque a massa úmida de substrato forma uma barreira à circulação do vapor e também porque o substrato possui alta proporção de material orgânico, que age como isolante térmico, dificultando a difusão do calor para as camadas internas. Além dessas desvantagens, nas autoclaves o vapor é aplicado a alta pressão, apresentando riscos de acidente por falhas no sistema de segurança ou por manuseio inadequado do equipamento.

Alguns autores consideram que o tratamento térmico a 82°C por 30 min esteriliza o solo, pois os principais organismos fitopatogênicos são inativados pelo calor à temperatura próxima de 70°C, por aproximadamente 30 minutos (Jarvis, 1993). Entretanto, alguns patógenos como vírus do mosaico do fumo e vírus do mosaico do pepino, são dificilmente inativados em temperaturas abaixo de 100°C. Algumas espécies de *Pythium* e alguns isolados de *Fusarium oxysporum* são termotolerantes (Bollen, 1969).

A completa esterilização do substrato cria um "vácuo biológico" que pode ser preenchido tanto por organismos saprófitas quanto por patógenos que podem colonizar rapidamente o substrato, pela ausência de organismos supressores com potencial controle biológico, podendo ocorrer casos em que a severidade da doença é maior em solos tratados (Rowe *et al.*, 1977). Outra ocorrência importante é a eliminação de bactérias que transformam nitrogênio amoniacal em nitratos. Na ausência desse processo pode ocorrer a formação de nitritos que juntamente com quantidades elevadas de amônia, podem atingir teores fitotóxicos (Sonneveld, 1979).

O tratamento com vapor a temperaturas superiores a 80°C causa a liberação de íons de manganês fixados no solo, podendo atingir níveis tóxicos quando os teores forem superiores a 12 mg/kg de manganês solúvel no solo. O excesso de manganês contribui também

para ocorrência de deficiência de ferro (Jarvis, 1993). A ocorrência tanto de níveis tóxicos de manganês quanto da deficiência de ferro depende da composição do substrato.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um equipamento desenvolvido na Embrapa Hortaliças para tratamento térmico de substratos para cultivo de plantas, utilizando-se vapor de água aplicado à baixa pressão, conforme descrito por Silva *et al.*, 1998.

MATERIAL E MÉTODOS

O vapor é fornecido por uma caldeira com capacidade de evaporação de 30 kg/h de água, consumindo cerca de 3 kg/h de gás GLP. Embora o equipamento forneça vapor à pressão de até 7 kgf/cm² (100 libras), durante a aplicação a pressão de vapor é de 1,5 kgf/cm², que é a força necessária para vencer a resistência da massa de substrato à passagem do vapor.

O vapor de água é aplicado no centro do fundo de uma caixa cilíndrica com capacidade de 2000 L, contendo no fundo, uma camada de 10 cm de brita grossa, coberta por uma tela de arame galvanizado com malha de aproximadamente 2 mm, formando um fundo falso, por onde flui o vapor, que se distribui uniformemente através do substrato colocado dentro da caixa. Para economia de energia, a caixa é revestida externamente por isolante térmico e tampada com filme plástico que suporte a temperatura de pelo menos 100°C. Mais detalhes da construção e do funcionamento do equipamento pode ser obtido em Silva *et al.*, 1998.

Para avaliar a evolução da temperatura durante o aquecimento e até quatro horas após a aplicação do vapor, fez-se medições com termômetro de mercúrio colocado nas posições central, próximo à janela e na lateral da caixa, às profundidades de 10 e 20 cm da superfície. Aplicou-se vapor até ocorrer a sua liberação em toda a superfície do substrato, o que demorou cerca de 3 horas, e considerou-se este momento como início do tratamento térmico. Prosseguiu-se com a aplicação do vapor por mais uma hora e mediu-se a temperatura de hora em hora.

Utilizou-se substrato composto basicamente por três partes de terra (reti-

rada de uma camada de até 20 cm de um solo franco-argiloso), uma parte de esterco de bovinos e duas partes de casca de arroz carbonizada.

Para avaliar a eficácia do sistema quanto à capacidade de desinfestação, foram realizados quatro testes, enterrando-se amostras de material contaminado com diferentes patógenos, nas posições centro, próximo à janela e na lateral da caixa, às profundidades de 10 e 20 cm da superfície da massa de substrato. Aplicou-se vapor por uma hora (não considerando o período de aquecimento), e os contentores com as amostras foram retirados uma, duas, três e quatro horas após o início da aplicação do vapor. Cada patógeno foi testado em uma partida diferente. Foram utilizados os seguintes patógenos: *Ralstonia solanacearum*, bactéria causadora da murcha bacteriana, escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e esporos do fungo *Fusarium oxysporum*, adotando-se os procedimentos:

1 – Tubos de ensaio contendo 10 ml da suspensão de 10⁷ unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro, utilizando-se o isolado CNPH 13 de *R. solanacearum*, foram colocados no interior da massa do substrato durante o processo de desinfestação. Após o tratamento térmico, duas alíquotas da suspensão de cada tubo foram riscadas em placa de Petri com meio de Kelman (Kelman, 1954), sem tetrazólio. As placas foram colocadas em incubadora à temperatura de 26°C, por 48 horas, para posterior observação das colônias.

2 – Vinte litros de substrato não tratado foram infestados com 1 L de suspensão contendo 10⁷ ufc/ml de *R. solanacearum* e outra porção de substrato foi contaminada com 1 L de suspensão contendo 10⁷ ufc/ml de esporos de *F. oxysporum*. Ambas porções foram incubadas por sete dias à sombra, mantendo-se a umidade. De cada substrato artificialmente infestado tomaram-se 24 amostras de 500 g, que foram colocadas em sacos de tecido de algodão de 15 x 25 cm e submetidas ao tratamento térmico, enterrando-se quatro saquinhos em cada posição na massa de substrato. A cada hora de termoterapia retirou-se um saquinho de cada posição.

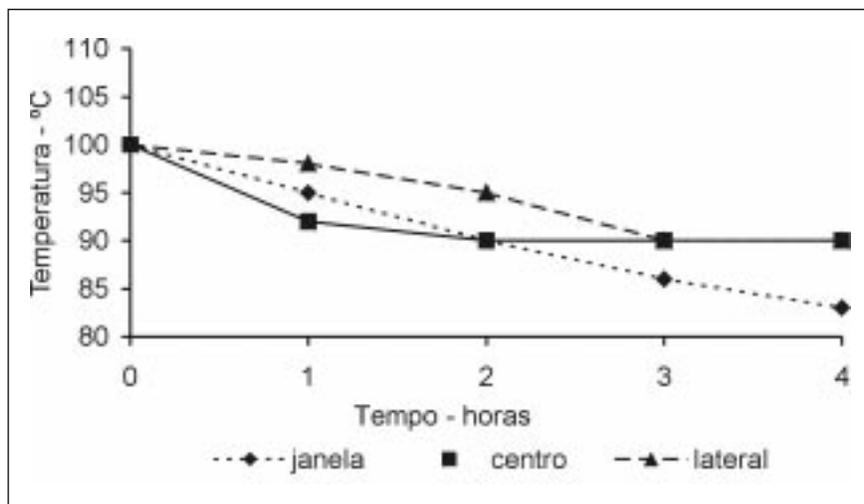


Figura 1. Variação da temperatura da massa de substrato a 10 cm da superfície, em três posições do esterilizador, após a aplicação de vapor de água por uma hora. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2000.

Após a termoterapia uma amostra de 10 g do substrato contido em cada saco foi colocada em 100 ml de água destilada. Posteriormente, foi vigorosamente agitada e, da suspensão obtida fizeram-se diluições nas proporções de 1:100, 1:500, 1:1.000 e 1:10.000. De cada diluição retiraram-se 100 ml da suspensão que foi colocado em meio de Kelman, sem tetrazólio (Kelman, 1954), para os testes com *R. solanacearum*, e meio BDA mais antibiótico cloranfenicol (100 mg/L) para os testes com *F. oxysporum*. Todas as placas foram colocadas em incubadoras a 26°C, durante 48 horas para *R. solanacearum* e por cinco dias para *F. oxysporum* para observação e contagem de colônias.

3 – As frações restantes dos substratos inicialmente contaminados e submetidos à termoterapia foram transferidas para vasos com capacidade de 0,5 L. Dez outros vasos receberam o substrato contaminado e não submetido à termoterapia (testemunha). Cada vaso que continha substrato anteriormente infestado com *R. solanacearum* recebeu duas mudas de tomate do genótipo L 398, da coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças, e os vasos que haviam sido infestados com *F. oxysporum* receberam quatro sementes de tomate da cultivar Ponderosa, por serem estes genótipos padrões de suscetibilidade para os patógenos referidos.

4 – Escleródios de *S. sclerotiorum* acondicionados em saquinhos de tecido

(10 unidades por saquinho) foram submetidos ao tratamento térmico e tiveram a superfície desinfestada por imersão em álcool a 70% por um minuto, em hipoclorito de sódio a 0,2% por dois minutos, lavados em água destilada e então colocados em placa de Petri, contendo meio neon, BDA (batata, dextrose e agar) com cloranfenicol e azul-de-bromofenol (Peres *et al.*, 1996). Fez-se a contagem de escleródios que germinaram após a incubação a 20°C, por sete dias.

5 – Durante dois anos de uso do equipamento, produzindo-se cerca de 25 mil litros de substrato por mês não se verificou a ocorrência de doenças que pudessem ser devidas à contaminação do substrato. Para constatar esta eficácia instalaram-se dois outros testes biológicos, adotando-se o critério de aplicar uma hora de vapor após o período de aquecimento.

Durante três procedimentos de esterilização de substrato foram colocadas três bolsas de tela, contendo cerca de 15 L de substrato contaminado com a bactéria *R. solanacearum*, anteriormente utilizado em oito contentores contendo cada um, cinco plantas de tomate que apresentavam os sintomas da doença. Uma bolsa foi colocada na parte mediana do depósito, outra a 20 cm da superfície e outra sobre a camada superficial. Após o tratamento térmico, o substrato foi transferido para vasos com capacidade de um litro, onde foi transplantada

uma muda de tomate produzida em substrato esterilizado. Dez outros vasos foram utilizados como testemunha.

O segundo teste foi realizado com substrato contaminado com fungo *Rhizoctonia solani* a partir da cultura do fungo em grãos de sorgo, aplicando-se 2 g de sorgo contaminado para 10 L de substrato. Foram utilizados 60 L de substrato acondicionados em seis caixas de plástico, onde foram distribuídas sementes de beterraba e ervilha, para confirmar a incidência de doença causada pelo fungo. À semelhança do que foi realizado para *R. solanacearum*, o substrato infestado foi acondicionado em bolsas teladas e tratado com vapor em três posições no depósito de esterilização. Após o tratamento térmico o substrato foi transferido para caixas de plástico, onde foram distribuídas sementes de beterraba e ervilha, com 100 sementes de cada espécie por caixa, avaliado-se a porcentagem de plântulas atacadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protótipo desenvolvido tem capacidade para tratar partidas de 2.000 L de substrato, gastando em média, três horas de vapor para aquecer todo o volume. Este é o tempo entre a abertura do registro de pressão da caldeira e o início da liberação visualmente uniforme do vapor na superfície do substrato.

O calor armazenado no substrato durante o tratamento com vapor manteve a massa do mesmo com temperatura elevada, por um tempo prolongado. Durante a aplicação do vapor (não considerando o período de aquecimento), a temperatura foi de 100°C em todos os pontos de amostragem e se reduziu lentamente, com pequena diferença entre as três posições (Figuras 1 e 2). Nas medições feitas de hora em hora até quatro horas após o início da aplicação do vapor, verificou-se que a temperatura da camada de substrato a 10 cm de profundidade, variou entre 83 e 100°C enquanto que, a 20 cm de profundidade, manteve valores superiores a 90°C. A temperatura do substrato observada durante o tratamento, inclusive durante a fase de resfriamento pode ser considerada como desinfestante, pois superou a temperatura de inativação dos prin-

cipais patógenos (Jarvis, 1993).

Conforme descrito em material e métodos, a caldeira fornece vapor à pressão de até 8 kgf/cm² (100 libras), o que corresponde à produção de vapor à temperatura de 170°C, mas durante a aplicação, a pressão de vapor cai para 1,5 kgf/cm² (cerca de 112°C), justificando a ocorrência de temperatura superior a 100°C em camadas não superficiais (Figura 2).

Dos tubos de ensaio contendo a suspensão de bactérias não se recuperou o patógeno, inclusive naqueles tubos submetidos a apenas uma hora de tratamento térmico.

Nenhum escleródio de *S. solanacearum* submetido à termoterapia germinou, sendo que os escleródios testemunha apresentaram 88% de germinação.

Nos testes de recuperação de inóculos observou-se o desenvolvimento de diversas colônias nas placas, nas diversas diluições do filtrado do substrato, mas sem a presença de colônias típicas dos patógenos inicialmente adicionados. Nas placas testemunhas, observaram-se colônias típicas de *R. solanacearum* e *F. oxysporum* para todas as diluições testadas. Fez-se o isolamento de algumas colônias típicas da bactéria *R. solanacearum* contidas nas placas testemunha, obtendo-se confirmação positiva.

O crescimento de inúmeras colônias de microrganismos nas placas que continham o filtrado obtido de substrato tratado indica que o tratamento não é esterilizante, mas foi suficiente para a eliminação dos patógenos testados. Assim sendo, não ocorreu o “vácuo biológico” que acontece quando se faz a completa esterilização.

Nas plantas de tomate cultivadas em substrato tratado não se observou ocorrência de “tombamento”, sintomas de murcha bacteriana ou de murcha-defusário, enquanto que nos dez vasos contendo substrato não tratado, em apenas um não houve desenvolvimento de

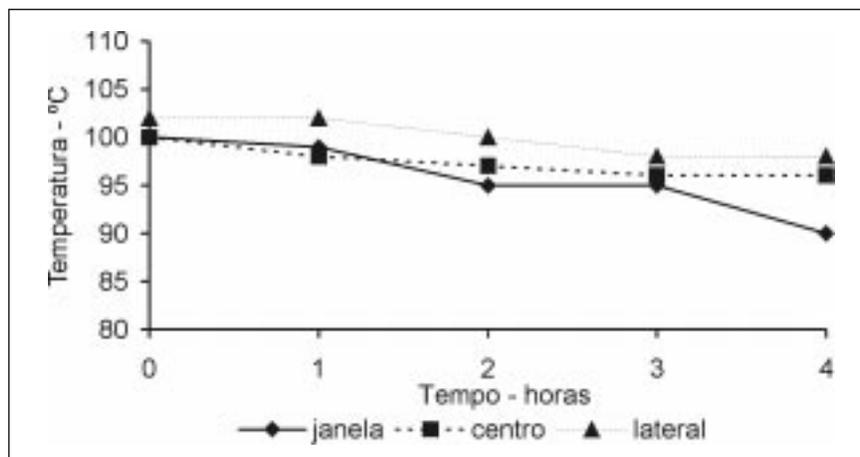


Figura 2. Variação da temperatura da massa de substrato a 20 cm da superfície, em três posições do esterilizador, após a aplicação de vapor de água por uma hora. Brasília, Embrapa Hortaliças, 2000.

sintomas de murcha e nos vasos contendo substrato contaminado com *F. oxysporum*, houve falhas na germinação e ocorrência de “tombamento”.

Nos testes realizados, após dois anos de utilização do equipamento, nenhuma das 90 plantas cultivadas com substrato desinfestado apresentou sintomas de murcha. No teste com *R. solani* 100% das sementes de beterraba e 98% das sementes de ervilha germinaram e as plântulas não apresentaram sintomas de doenças até 20 dias após a semeadura, quando as plantas foram eliminadas, enquanto que nas caixas testemunhas, ocorreu apenas 5% de emergência das plântulas que posteriormente desenvolveram os sintomas da doença e morreram antes de 10 dias após a semeadura.

Para estes experimentos não foi necessário realizar análise estatística pois ao se comparar parcelas com resultado zero (esterilização) com parcelas sabidamente contaminadas, sempre se obtém valores com diferenças significativas.

Concluiu-se que houve eficácia do tratamento em todas as posições para todos os tempos avaliados; durante quatro horas após a aplicação do vapor a temperatura do substrato se manteve suficientemente elevada para eliminar os principais patógenos; a aplicação de vapor deve ser feita por uma hora, para

que ocorra total uniformidade na distribuição do calor na massa de substrato.

LITERATURA CITADA

- BOLLEN, G.J. The selective effect of heat treatment on the microflora of a greenhouse soil. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, v. 75, n. 1/2, p. 157-163, 1969. *Review of Applied Mycology*, v. 48, n. 6, 1969. Abstract 1542.
- JARVIS, W.R. *Managing diseases in greenhouse crops*. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1993. 288 p.
- KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, v. 44, p. 693-695, 1954.
- MÜLLER, J. Alternativas ao uso de brometo de metila. *Circuito Agrícola*, v. 6, n. 54, p. 20, 1998.
- PERES, A.P.; NASSER, L.C.; MACHADO, J.C. Utilização de meio seletivo para detecção de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão e soja. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 21, p. 364, 1996. Resumo
- ROWE, R.C.; FARLEY, J.D.; COPLIN, D.L. Airborn spore dispersal and recolonization of steamed soil by *Fusarium oxysporum* in tomato greenhouse. *Phytopathology*, v. 67, p. 1513-1517, 1977.
- SILVA, J.B.C.; FALCÃO, L.L.; OLIVEIRA-NAPOLÉÃO, I.T. *Sistema para desinfestar substrato para produção de mudas, utilizando-se vapor de água*. Brasília, Embrapa Hortaliças, 1998. 5 p. (Comunicado técnico da Embrapa Hortaliças 7)
- SONNEVELD, L.E. Changes in chemical properties of soil caused by steam sterilization. In: MULDER, D., ed. *Soil disinfection*. Amsterdam: Elsevier, 1979. p. 39-50.