



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCOS VINICIOS CONCEIÇÃO GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES PARA
COINOCULANTES PARA A CULTURA DA SOJA
CONTENDO *Azospirillum brasilense* E
Bradyrhizobium spp.**

Londrina
2019

MARCOS VINICIOS CONCEIÇÃO GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE
COINOCULANTES PARA A CULTURA DA SOJA
CONTENDO *Azospirillum brasilense* E
Bradyrhizobium spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria.
Coorientador: Dr. Marco Antonio Nogueira.

Londrina
2019

MARCOS VINICIOS CONCEIÇÃO GARCIA

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE
COINOCULANTES PARA A CULTURA DA SOJA
CONTENDO *Azospirillum brasilense* E
Bradyrhizobium spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA Soja

Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA Soja

Dr. Ricardo Silva Araujo
Total Biotecnologia

Londrina, 29 de março de 2020.

Agradecimentos

Sou muito grato a diversas pessoas que ao longo do mestrado puderam me proporcionar conhecimento, força, risadas, acolhimento e reconhecimento.

Dentre tantas boas almas quero destacar a Dra. Mariangela Hungria, minha super orientadora de coração enorme e paciência tremenda, chefe, conselheira e que em 2018, tornou-se também minha madrinha de casamento, com muito apreço.

Ao Dr. Marco Antonio Nogueira por todo tempo dedicado às várias perguntas respondidas, bem como em vários momentos pode me direcionar as possibilidades deste trabalho.

Quero agradecer à empresa Total Biotecnologia, que através da autorização para desenvolver esse mestrado, me proporcionou crescer como profissional científico e humano, demonstrando a grande importância que dá a seus funcionários.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, através dos docentes que, por meio de disciplinas de alta qualidade acadêmica contribuíram para minha formação e desenvolvimento do presente trabalho.

À minha amada esposa Carla Russi, que esteve comigo em todos os momentos de dúvidas, ansiedades, medos e merecidamente compartilhará comigo todos momentos de felicidades e conquistas.

Aos meus grandes colegas de trabalho Rinaldo Conceição, Eduara Ferreira, Lígia Chueire, Jakeline Delamuta, Renan Ribeiro, Artur Rondina, Leandro Túlio, Mariana Sanches e com carinho a queria Maria Rosa Jacobino, ou mais conhecida como Dona Rosa, que coloca esse laboratório em ordem com muito zelo. Também às várias pessoas que passaram por esse laboratório, e de alguma forma me ajudaram e me apoiaram mesmo em conversas na hora do café.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disponibilidade em avaliar e colaborar para com a melhoria do nosso trabalho.

À minha querida família, Regina, José Antônio e Fernando Henrique, por estarem sempre do meu lado e proporcionar a todo o momento as melhores condições para que pudesse ter estabilidade para seguir em frente.

Somos todos parte dessa conquista e mais uma vez, **MUITO OBRIGADO!**

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)

GARCIA, M. V. C. **Desenvolvimento de formulações de coinoculantes para a cultura da soja contendo *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* spp.** 2019. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A geração de novas tecnologias na agricultura e sua pronta adoção pelos agricultores fez com que o Brasil se tornasse um dos líderes mundiais na produção de alimentos. Dentre as tecnologias que contribuem fortemente para essa liderança, o uso de inoculantes que contêm bactérias que promovem a fixação biológica do nitrogênio (FBN) com leguminosas, em adição a bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) torna-se cada vez mais importante. Com mais de 36 milhões de hectares de soja cultivados no Brasil e a grande necessidade de N demandada por essa cultura, o uso de inoculantes microbianos em substituição aos fertilizantes nitrogenados é crítico para a viabilidade econômica da cultura. Contudo, o mercado ainda carece de inoculantes mistos, contendo microrganismos atuando em diferentes processos microbianos, indicando a possibilidade de inovação no desenvolvimento de coinoculantes que contenham as tecnologias de FBN e BPCP. O objetivo deste estudo foi o de desenvolvimento de uma formulação de coinoculante para a cultura da soja contendo *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium* spp., comercialmente viável e contendo células com concentração e qualidade fisiológica adequadas. Para isso, o crescimento dos microrganismos com diferentes fontes de carbono, nitrogênio e protetores celulares foi verificado. Dentre as fontes de carbono avaliadas, os ácidos orgânicos foram melhor metabolizados por *A. brasilense*, enquanto *Bradyrhizobium* spp. obteve melhores resultados com manitol e glicerol. As melhores formulações foram submetidas a análises de manutenção celular verificando-se que, para *A. brasilense*, o glicerol proporcionou melhor manutenção, enquanto que, para *Bradyrhizobium* spp., isso ocorreu com a mistura de amido de milho e carboximetil celulose. O controle do pH do meio com solução tampão fosfato foi crítico para a manutenção das células de ambas bactérias. Em cinco ensaios conduzidos a campo, a melhor formulação desenvolvida no estudo resultou em nodulação e rendimento de grãos comparáveis ao inoculante comercial contendo *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* separadamente, indicando a viabilidade da tecnologia.

Palavras-chave: FBN; coinoculante; cocultivo; inoculante; nodulação; BPCP.

GARCIA, M. V. C. **Development of coinoculant formulations for the soybean crop containing *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp.** 2019. 109 p. Dissertation (Masters in Biotechnology) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

The generation of new technologies in agriculture and their prompt adoption by farmers has made Brazil one of the world leaders in food production. Among the technologies that strongly contribute to this leadership, the use of inoculants that contain bacteria that promote biological nitrogen fixation (FBN) with legumes, in addition to plant growth-promoting bacteria (BPCP) is becoming increasingly important. With more than 36 million hectares of soybean cultivated in Brazil and the great need for N demanded by this crop, the use of microbial inoculants to replace nitrogen fertilizers is critical to the economic viability of the crop. However, the market still lacks mixed inoculants, containing microorganisms acting in different microbial processes, indicating the possibility of innovation in the development of coinoculants that contain FBN and BPCP technologies. The objective of this study was to develop a coinoculant formulation for the soybean crop containing *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp., commercially viable and containing cells with adequate concentration and physiological quality. For this, the growth of microorganisms with different sources of carbon, nitrogen and cell protectors was verified. Among the carbon sources evaluated, organic acids were better metabolized by *A. brasilense*, while *Bradyrhizobium* spp. obtained better results with mannitol and glycerol. The best formulations were subjected to cell maintenance analyzes, verifying that, for *A. brasilense*, glycerol provided better maintenance, whereas for *Bradyrhizobium* spp. this occurred with the mixture of corn starch and carboxymethyl cellulose. The control of the pH of the medium with phosphate buffer solution was critical for the maintenance of the cells of both bacteria. In five field trials, the best formulation developed in the study resulted in nodulation and grain yield comparable to the commercial inoculant containing *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* separately, indicating the viability of the technology.

Keywords: BNF; coinoculant; cocultivation; inoculant; nodulation; PGPB.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 –** Concentração celular (UFC/mL) ao fim do cocultivo (0D), aos sete dias (7D) e aos 30 dias (30D) de armazenamento das formulações de coinoculante contendo *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 sem protetor celular. As letras comparam as médias entre as formulações, dentro de cada tempo, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 69
- Figura 2 –** Valores de pH ao fim do cocultivo (0D), aos sete dias (7D) e aos 30 dias (30D) de armazenamento das formulação de coinoculante contendo *A.brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, *Bradyrhizobium* spp.SEMIA 5079 e SEMIA 5080 sem protetor celular..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos tratamentos para análise de uso de diferentes fontes de carbono.....	43
Tabela 2 – Composição das formulações de coinoculante avaliadas	44
Tabela 3 – Composição química da solução de micronutrientes	44
Tabela 4 – Protetores celulares empregados nos meios de cocultivo de <i>Bradyrhizobium</i> spp. e <i>A. brasilense</i>	46
Tabela 5 – Coordenadas geográficas, altitude, classificação climática, textura e classificação dos solos nos locais onde os ensaios foram conduzidos na safra 2017/18	48
Tabela 6 – Informações agronômicas sobre os experimentos realizados a campo na safra 2017/18.....	48
Tabela 7 – Caracterização química do solo nas camadas de 0-20 e 20-40 cm das áreas experimentais antes da semeadura dos ensaios da safra de 2017/2018	49
Tabela 8 – Caracterização química, granulometria nas camadas de 0-20 e 20-40 cm e população de rizóbios microssimbiontes da soja (0-20 cm) e população de bactérias diazotróficas (0-20 cm) do solo dos locais experimentais antes do plantio dos ensaios da safra de 2017/2018	50
Tabela 9 – Concentração celular (UFC/mL) de <i>Azospirillum brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com diferentes fontes de carbono durante 39 dias de cultivo em agitador orbital a 120 rpm e 29 °C	57
Tabela 10 – Valores de pH nos meios de cultivo de <i>A. brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com diferentes fontes de carbono durante 39 dias em agitador orbital a 120 rpm e 29 °C	59
Tabela 11 – Concentração celular (UFC/mL) de <i>Bradyrhizobium</i> spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com diferentes fontes de carbono durante 60 dias de cultivo em agitador orbital a 120 rpm e 29 °C	63
Tabela 12 – Valores de pH nos meios de cultivo de <i>Bradyrhizobium</i> spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com diferentes fontes de carbono durante 60 dia sem agitador orbital a 120 rpm e 29 °C	65

- Tabela 13** – Valores de densidade óptica (D.O.) no cultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com diferentes fontes de carbono durante 60 dias sem agitador orbital a 120 rpm e 29 °C..... 66
- Tabela 14** – Concentração celular no cocultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 para diferentes dias de inoculação em F3..... 73
- Tabela 15** – Concentração celular no cocultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 para diferentes dias de inoculação em F4..... 73
- Tabela 16** – Concentrações celulares de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (UFC/mL) obtidas no cocultivo com *Bradyrhizobium* spp. nas formulações F1, F2, F3, F4 e F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), no dia do armazenamento..... 76
- Tabela 17** – Concentrações celulares de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (UFC/ mL) obtidas no cocultivo com *Bradyrhizobium* spp. nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 7 dias de armazenamento..... 77
- Tabela 18** – Concentrações celulares de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (UFC/mL) obtidas no cocultivo com *Bradyrhizobium* spp. nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 30 dias de armazenamento..... 78
- Tabela 19** – Concentrações celulares (UFC/ mL) de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 obtidas no cocultivo com *Azospirillum brasilense* nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e

	F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), no dia do armazenamento	80
Tabela 20	– Concentrações celulares (UFC/ mL) de <i>Bradyrhizobium</i> spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 obtidas no cocultivo com <i>Azospirillum brasilense</i> nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 7 dias de armazenamento.....	81
Tabela 21	– Concentrações celulares (UFC/ mL) de <i>Bradyrhizobium</i> spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 obtidas no cocultivo com <i>Azospirillum brasilense</i> nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 30 dias de armazenamento.....	82
Tabela 22	– Variação de pH do cocultivo de <i>Bradyrhizobium</i> spp. e <i>Azospirillum brasilense</i> nas formulações F1 a F6 com adição de protetores celulares durante o armazenamento. pH ₀ : final do cocultivo; pH ₇ : após 7 dias de armazenamento; pH ₃₀ : após 30 dias de armazenamento.....	85
Tabela 23	– Eficiência agronômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Lutécia-SP em relação a diferentes inoculantes contendo <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 5079 e 5080 e <i>Azospirillum</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18	88
Tabela 24	– Eficiência agronômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Paranavaí-PR em relação a diferentes inoculantes contendo <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 5079 e 5080 e <i>Azospirillum</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.....	89
Tabela 25	– Eficiência agronômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Florestópolis-PR em relação a diferentes	

	inoculantes contendo <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 5079 e 5080 e <i>Azospirillum</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.....	93
Tabela 26	– Eficiência agronômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Ponta Grossa-PR em relação a diferentes inoculantes contendo <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 5079 e 5080 e <i>Azospirillum</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.....	94
Tabela 27	– Eficiência agronômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Londrina-PR em relação a diferentes inoculantes contendo <i>Bradyrhizobium</i> SEMIA 5079 e 5080 e <i>Azospirillum</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.....	95
Tabela 28	– Composição da solução salina 0,85%.....	112
Tabela 29	– Composição do meio de cultivo YM (Yeast Mannitol)	112
Tabela 30	– Composição do meio de <i>Agar Rojo Congo</i> (RC).....	112
Tabela 31	– Composição da solução de vermelho Congo 0,25%.....	113

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	10
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 CULTURA DA SOJA.....	19
3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	21
3.2.1 Infecção e Nodulação nas Raízes da Soja.....	22
3.2.2 Metabolismo da FBN.....	24
3.2.3 Fatores que Interferem na FBN.....	26
3.3. BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>BRADYRHIZOBIUM</i>	28
3.4 BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>AZOSPIRILLUM</i>	29
3.5 Inoculantes.....	31
3.5.1 Inoculantes Turfosos.....	33
3.5.2 Inoculantes Líquidos	34
3.5.3 Outros Tipos de Veículos para Inoculantes.....	35
3.6 TECNOLOGIA DE COINOCULAÇÃO	36
4 METODOLOGIA	39
4.1. MICRORGANISMOS.....	39

4.2.	DESENVOLVIMENTOS DAS FORMULAÇÕES LÍQUIDAS DE INOCULANTES CONTENDO <i>A. BRASILENSE</i> ESTIRPES AB-V5E AB-V6 E <i>BRADYRHIZOBIUM</i> SPP. SEMIA 5079 E SEMIA 5080.....	40
4.2.1.	Preparo do Pré-inóculo de <i>Bradyrhizobium</i> spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080	40
4.2.2.	Preparo do Pré-inóculo de <i>A. brasilense</i> Estirpes Ab-V5 e Ab- V6.....	40
4.2.3.	Diluição Seriada	41
4.2.4.	Estimativa do Número de Células Viáveis.....	41
4.2.5.	Avaliação de pH e Densidade Ótica (D.O.)	42
4.2.6.	Análise do uso de Diferentes Fontes de Carbono.....	42
4.2.7.	Desenvolvimento de Formulações	43
4.2.8	Análise dos Tempos de Incubação	45
4.2.9	Análise do Tempo de Viabilidade Celular Promovido pela Adição de Protetores Celular às Formulações	46
4.2.10	Escolha das Estirpes para Composição do Inoculante Comercial na Melhor Formulação	45
4.3	ENSAIOS DE EFICIÊNCIA AGRONÔMICA A CAMPO.....	47
4.3.1	Estabelecimento e Condução dos Ensaios	46
4.3.2	Coleta e Avaliação dos Experimentos a Campo	51
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	CULTIVO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	55
5.1.1	Cultivo de <i>A. brasilense</i> estirpes Ab-V5 e Ab-V6	55
5.1.2	Cultivo de <i>Bradyrhizobium</i> spp. SEMIA 5079 e 5080.....	60
5.2	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES.....	69
5.2.1	Crescimento Celular das Formulações de Cocultivo sem a Adição de Protetores.....	69
5.2.2	Ensaio de Crescimento Celular em Relação ao Momento de Inoculação de <i>A. brasilense</i>	72
5.2.3	Avaliação do Tempo de Viabilidade Celular Proporcionado pela Adição de Protetores Celulares.....	75
5.3.	AValiação de Eficiência Agronômica a Campo.....	87

6.	CONCLUSÕES	98
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8.	ANEXO 1 – MEIOS DE CULTIVO E SOLUÇÕES	113

1. Introdução

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é a principal oleaginosa cultivada no mundo, o que torna a espécie de grande interesse para a pesquisa de novas tecnologias que promovam maiores rendimentos e menores custos. O Brasil, em 2018, se destacou como o maior exportador dessa leguminosa (CONAB, 2018; FIESP, 2019). No segundo levantamento de grãos da Companhia Nacional de Abastecimento Agrícola (CONAB) realizado em Jan/2019, o desempenho da cultura nas diversas regiões produtoras do país aponta para uma expectativa de produção, na safra 2018/19, de 120.066,4 mil toneladas, com incremento de 1,7% na área cultivada em relação à anterior (CONAB, 2019). A soja, porém, demanda grandes quantidades nitrogênio (N), sendo necessários cerca de 80 kg de N para produzir 1.000 kg de grãos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). Dessa forma, a cultura da soja seria inviabilizada economicamente se os produtores tivessem de aplicar, na forma de adubo nitrogenado, todo o N necessário para suprir a demanda da planta. A inoculação das sementes com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, porém, pode fornecer praticamente todo o N que a planta necessita (TAIZ; ZEIGER, 2017).

Embora 80% dos gases atmosféricos sejam compostos por nitrogênio molecular (N_2), plantas e animais são incapazes de utilizar essa forma de N, pois não conseguem romper a tripla ligação entre os átomos de N. Por isso, a principal fonte de N para cultura da soja é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo realizado por algumas espécies de bactérias. Essas bactérias possuem uma enzima denominada dinitrogenase, que confere capacidade de fixar o N_2 por meio da quebra da tripla ligação do N_2 e posterior redução à amônia (NH_3). No caso da soja, as bactérias de maior relevância econômica pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, e se associam simbioticamente às plantas formando estruturas especializadas nas raízes, denominadas nódulos, onde ocorre o processo de FBN (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001; HUNGRIA; MENDES, 2015). Não obstante, fatores como agroquímicos incompatíveis com as bactérias, mudanças climáticas globais, com implicações como altas temperaturas e períodos longos de estiagem, podem ameaçar a contribuição da FBN à cultura.

Outro grupo de bactérias, do gênero *Azospirillum*, mais especificamente da espécie *Azospirillum brasilense*, também pode trazer grande contribuição à cultura da soja, principalmente pela produção de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, que proporcionam maior crescimento radicular, resultando em maior absorção de nutrientes e água, aumentando a tolerância à seca e a agentes patogênicos de plantas, sendo consideradas como bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) (HUNGRIA, 2011; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013).

Para o uso na agricultura, as bactérias são comercializadas em produtos denominados, na legislação brasileira, como inoculantes, termo que faz referência aos microrganismos vivos, capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, por de diferentes mecanismos; em alguns países esses produtos também são denominados como biofertilizantes (REIS et al., 2006). A formulação e a produção comercial de qualquer inoculante requerem a combinação dos parâmetros biológicos que conduzem à sobrevivência das bactérias. Para isso, todo o processamento de matérias-primas e as necessidades bacteriológicas devem ser abordadas, além do desenvolvimento de produtos de qualidade dentro de custos orçamentários restritos. Portanto, somente com a compreensão das necessidades e limitações das características físicas, químicas e orçamentais se pode atestar a viabilidade de um inoculante para a produção em escala comercial (STEPHENS; RASK 2000).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os inoculantes, para serem comercializados no Brasil, devem ser preparados em suporte estéril e não podem apresentar microrganismos não especificados na diluição de $1,0 \times 10^{-5}$. Os inoculantes contendo rizóbios devem conter uma concentração mínima de $1,0 \times 10^9$ unidades formadoras de colônias (UFC) por g ou mL do produto até a data de vencimento, que deve ser igual ou superior a seis meses (MAPA, 2011a). Para inoculantes à base de *Azospirillum*, a concentração será informada no processo de registro do produto, mas deve ser de, no mínimo, $1,0 \times 10^8$ UFC/g ou mL do produto até a data de vencimento. Desse modo, pesquisas de inovações tecnológicas sobre os melhores parâmetros e uso de polímeros que auxiliem a sobrevivência das bactérias durante longos períodos de tempo de armazenamento e garantam melhor sobrevivência frente às limitações

crecientes causadas por estresses abióticos e bióticos no momento da semeadura tornam-se cruciais para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de qualidade.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver formulações líquidas de coinoculantes contendo *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* que permitam maior concentração de células, tempo de viabilidade celular e desempenho a campo igual ou superior aos inoculantes comerciais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento bacteriano em diferentes fontes de carbono;
- Testar diferentes formulações líquidas e avaliar o tempo de viabilidade celular proporcionado em cada uma;
- Testar diferentes protetores celulares e estabilizantes a cada formulação desenvolvida.
- Avaliar a eficiência agrônômica da formulação de coinoculante mais promissor.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Cultura da soja

Originária da China, onde é conhecida desde aproximadamente 2000 a.C., a soja chegou ao continente americano no final do século XVIII, com o primeiro registro no Brasil datado de 1882, no estado da Bahia. Sua expansão no país ocorreu a partir de 1970, devido à ampliação das indústrias de óleo e à demanda internacional pelo grão (Embrapa, 2004). Em virtude dos altos teores de proteína e óleo no grão, que podem passar de 40% e 20%, respectivamente, a soja faz-se importante matéria prima para a alimentação humana, animal e na indústria de biocombustíveis, tornando-se uma *commodity* (LOPES et al., 2002).

No Brasil, a combinação do melhoramento genético à resistência de condições adversas, incluindo a adaptação ao fotoperíodo para o cultivo em baixas latitudes, a expansão para os cerrados com topografia plana favorável à mecanização, o baixo valor das terras e os subsídios para sua compra contribuíram para a expansão da sojicultura no Brasil central e nas regiões de cerrado (DALL'AGNOL E VIDOR, 2002; SEDIYAMA, 2009). Seu ciclo total pode ser dividido em duas fases: a vegetativa, que compreende o período da emergência da plântula até a abertura das primeiras flores e a reprodutiva, que compreende o período desde o início da floração até a maturidade fisiológica (ARAÚJO, 2009).

Atualmente a soja está entre as dez culturas de maior importância econômica mundial, sendo a principal oleaginosa cultivada e consumida no mundo. É a principal cultura cultivada no Brasil, correspondendo a 49% da área cultivada com grãos, sendo de grande impacto social e econômico para o país. A área estimada para o cultivo da soja em 2018/19 foi estimada em 36,112 milhões de hectares (ha), superior aos 35,241 milhões ha da safra 2017/18. Na safra de 2017/18 o Brasil produziu aproximadamente de 120 milhões toneladas de soja e a expectativa para a safra seguinte era de 120 milhões toneladas novamente, fato esse que poderia colocar o Brasil como maior produtor mundial, porém, devido a fatores climáticos desfavoráveis, a produtividade brasileira da oleaginosa recuou 3,6% fechando a produção em 115,343 mil toneladas, mantendo o país no segundo

lugar, atrás dos Estados Unidos da América (EUA) (CONAB, 2019). Em relação ao consumo da *commodity*, a China ocupa o primeiro lugar, com a marca de 106,3 milhões t na safra 2017/18, seguida pelos EUA e Argentina, enquanto o Brasil está em quarto lugar, consumindo 45,9 milhões de t na safra 2017/18. Na exportação do grão, o Brasil manteve o primeiro lugar, com 44,68% das exportações mundiais, à frente dos EUA, com 38,51% e da Argentina, com 4,94%. Os três maiores exportadores, portanto, são responsáveis por 88,13% de todas as exportações mundiais (CONAB, 2018).

A principal forma de uso da soja ocorre por meio do consumo de óleo e derivados. O farelo residual da indústria do óleo é utilizado para a alimentação animal. Atualmente, a soja pode ser encontrada em muitos alimentos, além daqueles mais tradicionais, como shoyo, tofu e cereais. O grão tem sido utilizado como ingrediente de biscoitos, chocolates, margarina e temperos e o interesse por produtos como leite de soja e suco de frutas enriquecidas com soja tem aumentado. A melhoria dos produtos à base de soja não se refletiu apenas nas embalagens, mas no próprio sabor, tornando-os mais palatáveis fazendo com que os valores nutricionais do grão fossem cada vez mais conhecidos (ALMEIDA, 1997). A soja é uma excelente fonte de minerais como ferro, potássio, fósforo, cálcio e vitaminas do complexo B. Também é rica em proteínas, possui isoflavonas e ácidos graxos insaturados que têm ação na prevenção de doenças crônico-degenerativas, como a osteoporose (RICKARD et al, 2003).

Além dos produtos comestíveis, a soja também é muito utilizada pela indústria, estando presente em desinfetantes, inseticidas, tecidos e tintas para impressão, produtos farmacêuticos e medicinais, revestimentos, plastificadores, massa para vidraceiro, sabão e cimento à prova d'água e até pneus. A lecitina, um dos derivados da soja, é usada na fabricação de álcool, tintas, cosméticos, pigmentos, produtos químicos e até como agente antiderrapante (ALMEIDA, 1997).

Há grande diversidade no ciclo de produção da soja, mas, de forma geral, as cultivares de soja produzidas no Brasil têm ciclo de 100 a 160 dias e, para cada região, podem ser classificadas em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio. O calendário de semeadura e colheita da safra 2018/19 da soja é diferente de acordo com a região. Na região norte o plantio é

iniciado em janeiro a junho, com colheita iniciada em junho podendo chegar a outubro. No Nordeste, a semeadura ocorre de outubro a fevereiro, com colheita de março a julho. A semeadura da soja nas regiões centro-oeste, sudeste e sul se dá entre setembro de dezembro, com colheita entre janeiro a maio para o centro-oeste e fevereiro a maio no sudeste e sul (CONAB, 2019).

3.2 Fixação biológica de nitrogênio

Devido à grande concentração de proteína no grão, a soja demanda grande necessidade de absorção de nitrogênio (N), cerca de 80 kg de N para cada 1.000 kg de grãos produzidos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001). O ar atmosférico contém 78% de N molecular (N₂) que poderia se utilizada não fosse a incapacidade das plantas de romper a tripla ligação super estável desta molécula.

Uma das formas de fornecer à planta o N é a adubação nitrogenada. Porém, se a demanda de N pela soja fosse suprida pela adubação nitrogenada, cuja eficiência de aproveitamento pelas plantas nas condições brasileiras está em torno de 50%, seriam necessários 480 kg de N para a produtividade de 3.000 kg/ha (ZILLI; CAMPO; HUNGRIA, 2010; MERCANTE, 2006). Essa quantidade de N seria equivalente a 1.067 kg de ureia, o que, devido ao seu alto custo, inviabilizaria o cultivo da soja no Brasil (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001).

Contudo, a soja é capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio, principalmente do gênero *Bradyrhizobium* (TAIZ; ZIEGER, 2004; PEIX et al., 2015), que podem suprir a demanda de N requerida pela planta, mesmo para altas produtividades. Atualmente, as estirpes de bactérias autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes comerciais para a cultivada soja no Brasil são: SEMIA 5079, da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, SEMIA 5080, da espécie *Bradyrhizobium diazoefficiense* SEMIA 587 e 5019, da espécie *Bradyrhizobium elkanii*, podendo ser utilizadas individualmente ou em todas as combinações possíveis, a critério do fabricante. A seleção de estirpes e a identificação de genes ou produtos gênicos são de grande relevância para maximizar a FBN (BATISTA et al., 2007). Além da eficiência em FBN, essas estirpes

devem apresentar outras características, tais como: capacidade de competir por sítios de infecção nodular, boa sobrevivência e adaptação às condições edáficas e climáticas (MOREIRA; SIQUEIRA; BRUSSARD; 2016).

Estimativas em diversos trabalhos conduzidos no Brasil indicam que a contribuição da FBN com a cultura da soja pode chegar a 94% do N total acumulado pela cultura, sendo o remanescente, em geral, fornecido pelo solo (HUNGRIA; MENDES, 2015). Além de ser importante no que se refere às práticas ecológicas, a inoculação com estirpes elite de *Bradyrhizobium* auxilia a planta, por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN), a reduzir o custo com fertilizantes nitrogenados, resultando em uma economia anual, para o Brasil, estimada em 20 bilhões de dólares (MERCANTE, 2018).

3.2.1 Infecção e nodulação nas raízes da soja

A FBN ocorre no interior de estruturas denominadas nódulos. A formação dos nódulos é um processo complexo, que envolve etapas múltiplas, iniciando, aproximadamente, 2 h após o contato da bactéria com as raízes. Na maioria das leguminosas, incluindo a soja, os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pelos radiculares, consideradas como regiões preferenciais para a infecção da bactéria fixadora (BHUVANESWARI; TURGEON; BAUER, et al., 1980). Desde a infecção, passando pela redução do N_2 atmosférico e sua transformação em amônio (NH_4^+), pelo transporte (no caso da soja, principalmente na forma de ureídos) e pela assimilação do N pela planta via GS/GOGAT, ocorre uma sucessão de processos (FAGAN et al. 2007; CÂMARA, 2014).

Segundo Timmers; Aurac; Truchet (1999), a bactéria migra em direção às raízes em função de uma resposta quimiotática decorrente da atração pelos metabólitos secundários, em geral, isoflavonoides e aminoácidos betaínas secretadas pelas raízes. Esses compostos ativam a transcrição de genes de nodulação na bactéria, passando a ocorrer a síntese de moléculas sinalizadoras de oligossacarídeos de lipoquitina, ou fatores de nodulação (fatores Nod). A planta hospedeira apresenta receptores especiais, descritos como lecitinas, produzidas nos

pelos radiculares. Em seguida, ocorre o encurvamento da parede celular dos pelos absorventes colonizados pelas bactérias. No próximo passo, as células bacterianas adentram as células epidérmicas da raiz por invaginação em uma estrutura denominada cordão de infecção. As bactérias continuam sua multiplicação no interior dos cordões de infecção, que vão, gradativamente, infeccionando células radiculares, atravessando as primeiras camadas do parênquima cortical, podendo atingir até a endoderme, ou camadas mais profundas, como o periciclo da raiz. No parênquima cortical, devido à presença dos cordões de infecção, células tetraploides multiplicam-se, originando os primórdios do nódulo. A ação de reguladores de crescimento do grupo das auxinas e das citocitinas transformam as células tetraploides em meristemáticas, aumentando a capacidade de multiplicação celular. Em consequência, formam-se os nódulos radiculares, cujo interior das células é ocupado por células bacterianas, com forma diferente da original, motivo pelo qual são chamadas de bacteroides (TIMMERS; AURIAC; TRUCHET, 1999). Durante o crescimento do nódulo, as bactérias internalizadas são liberadas para produzir infecções no citoplasma, elas começam a se dividir e se transformar em bacteróides endossimbióticos fixadoras de nitrogênio. A membrana que envolve os bacteroides, denominada peribacteroide, aumenta a superfície para acomodar o crescimento pela fusão com vesículas menores e facilita a troca de N fixado pelos bacteroides por fotoassimilados disponibilizados pela planta por um sistema com características semelhante ao sistema vascular das plantas (TIMMERS; AURIAC; TRUCHET, 1999).

A infecção rizobiana pode ocorrer, também, pela entrada das bactérias via fissuras ocasionadas pela emergência de raízes laterais (ALLEN E ALLEN, 1940; OLDROYD; DOWNIE, 2008). Esse modelo de infecção foi descrito em *Vigna unguiculata* inoculada com *Bradyrhizobium* (Sprent, 2001), em algumas espécies do gênero *Mimosa* com *Rhizobium* (FARIA; HAY; SPRENT, 1988), e entre *Sinorhizobium* e *Sesbania rostrata* (Goormachtig et al., 2004), esse último podendo formar nódulos no caule. A colonização das bactérias nesse modelo de infecção ocorre diretamente no córtex da raiz subepidérmica e induz à morte celular local, criando bolsas de infecção intercelular. Após tornarem-se bacteroides, em processos semelhantes ao mecanismo anterior, e em um ambiente com baixo teor de oxigênio

nos simbiossomas funcionais, iniciam a expressão de enzimas do complexo nitrogenase e, portanto, começam a fixar nitrogênio (JONES et al., 2007).

De acordo com Anollés (1997) e Fei e Vessey (2004), os níveis de auxinas, citocininas e etileno estão associados à nodulação em leguminosas e possuem efeito regulatório pronunciado na divisão e expansão celular. Fei e Vessey (2004) ainda sugerem os efeitos hormonais onde níveis elevados de citocininas estão associados ao aumento na nodulação, e os níveis de auxinas diminuí após o início da nodulação assim como com posterior declínio dos níveis de auxinas e posterior acréscimo. Os autores descrevem também que fatores nutricionais interferem na nodulação, como por exemplo, o aumento de disponibilidade de N no solo diminui a taxa de nodulação.

Nukui et al. (2000) observaram que o etileno sintetizado na região do periciclo da raiz difunde-se para o córtex e bloqueia a divisão celular no lado oposto ao floema da raiz, dificultando a nodulação de algumas espécies de leguminosas. Schmidt et al. (1999) relatam que *Medicago sativa* e *Pisum sativum* têm nodulação inibida pelo etileno. Nukui et al. (2000) observaram que os níveis de etileno na bainha vascular atuam na regulação da nodulação em *Lotus japonicus* e *Macroptilium atropurpureum*. A habilidade da bactéria em produzir um inibidor da produção de etileno aumenta a nodulação nas espécies estudadas por Schmidt et al. (1999). Sukanuma; Tamaoki; Kouchi (1995) reportam que o etileno produzido está correlacionado com a produção de nódulos pela soja, e que produção de etileno na leguminosa inoculada aumenta devido à resposta da planta à bactéria.

3.2.2 Metabolismo da FBN

De acordo com estudos realizados por Muller (1981), a síntese de ATP por meio da fosforilação oxidativa fundamenta-se na respiração aeróbia dos bacteroides. Há, portanto, necessidade da entrada de O₂, presente na atmosfera do solo, no interior dos nódulos radiculares. A proteína leghemoglobina, existente apenas no sistema planta-simbiose, tem a função de aportar O₂ ao bacteroide, ao mesmo tempo em que regula a concentração de O₂ no interior do nódulo, evitando o seu excesso, pois a enzima nitrogenase é irreversivelmente inativada pelo O₂. A

leghemoglobina pode ser verificada quanto à atividade ao se partir um nódulo, pois a oxidação do ferro presente na molécula resulta em coloração rósea no seu interior.

Segundo Vargas e Hungria (1997), a redução do N_2 a NH_3 passa por um sistema de ferredoxina antes de chegar à nitrogenase, enzima chave de todo o processo de FBN, constituída por uma molibdato-ferro-proteína e uma ferro-proteína. Juntos, os componentes catalisam a reação de redução do N_2 . A qual é fortemente endergônica, consumindo, portanto, muita energia.

A reação geral da FBN pode ser representada por:



Em soja e outras leguminosas, o número e a massa seca de nódulos têm apresentado correlação positiva com as estimativas das taxas de FBN, razão pela qual suas determinações são imprescindíveis em experimentos agrônômicos de campo onde se deseja avaliar a nutrição nitrogenada da soja (VARGAS; HUNGRIA, 1997).

Estudos realizados por Ryle; Powell; Gordon (1979) indicam elevado custo energético da FBN à planta. O estudo baseou-se no custo respiratório da FBN em soja, feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e trevo branco (*Trifolium* sp.) e revelou o aumento da respiração radicular com o aumento da atividade de FBN, que atingiu o máximo durante o início do florescimento, decaindo posteriormente para todas as espécies. As plantas que fixaram nitrogênio consumiram, em média, de 11% a 13% mais C fixado por dia para a respiração em comparação com as plantas supridas por N mineral. Além disso, o processo de liberação de moléculas do gás de hidrogênio (H_2) ocorre simultaneamente, sendo considerada uma perda de energia, a qual poderia ser utilizada para a produção de amônia.

Além da energia necessária para a redução do N_2 é necessário o fornecimento de esqueletos carbônicos para a bactéria fixadora, representando um gasto extra de energia metabólica para a planta. A sacarose produzida na fotossíntese é transportada até o nódulo radicular e, ao entrar na célula bacteriana, sofre glicólise até a forma de fosfoenolpiruvato (PEP), que é transformado em oxalacetato pela enzima PEP carboxilase. Este composto pode seguir várias rotas metabólicas, sendo uma delas sua transformação em malato, que entra no ciclo de

Krebs formando energia e α -cetoácidos, que são esqueletos carbônicos para formação de aminoácidos através da assimilação do NH_4^+ resultante da FBN; além da formação de aminoácidos, estes esqueletos carbônicos serão utilizados pela nitrogenase para seu metabolismo (BROWN; ADJEI, 1995).

O oxalacetato pode seguir outra rota, onde este se liga ao glutamato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (GDH), formando o aspartato que reage com a glutamina produzida pela assimilação do NH_4^+ , resultando na formação da asparagina, à custa de ATP. De acordo com Brown; Adjei (1995), a entrada e saída de produtos no bacteroide pode se dar via apoplasto, através de células do periciclo adjacente, ou pelo simplasto, através de plasmodesmos.

3.2.3 Fatores que interferem na FBN

A eficiência do processo de FBN, especialmente em regiões tropicais, pode ser afetada por vários fatores, como adubação desbalanceada, pH, temperatura e teor de água do solo, além de práticas de manejo, como o tratamento de sementes com agroquímicos antes da inoculação, entre outros (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; CAMPO; ARAUJO; HUNGRIA, 2009).

A adubação com molibdênio (Mo) e cobalto (Co), também conhecida como adubação CoMo, é outro componente de alta relevância para a FBN. Pessoa et al. (1999) ressaltam que a deficiência destes micronutrientes afeta diretamente a FBN, já que o Mo é um componente da enzima nitrogenase, que é responsável pelo processo de FBN. Além desse papel, o Mo atua na redutase do nitrato, responsável pela redução do NO_3^- a NH_4^+ , para ser assimilado pela planta. Assim, em caso de deficiência de Mo, a produtividade da soja e o teor de proteína nos grãos podem ser seriamente afetados. Como exemplo, Meschede et al. (2004) verificaram que, a partir do momento em que esses micronutrientes foram adicionados à semente, as plantas de soja apresentaram grãos com maiores teores de proteínas. Contudo, deve-se ter cautela na aplicação de Mo via sementes, principalmente na forma de molibdato (MoO), o qual tende a reduzir a sobrevivência da bactéria.

Hungria; Campo; Mendes (2007) destacam que temperaturas elevadas e estresse hídrico são fatores ambientais limitantes à sobrevivência do

Bradyrhizobium e à FBN. O período mais crítico se dá no início do cultivo da soja, durante a etapa de semeadura, quando o solo está descoberto, podendo atingir temperaturas superiores a 40 °C nos primeiros 5 cm. Nessas condições, o cultivo em sistema de plantio direto favorece a FBN por proporcionar temperaturas mais amenas do solo, além de mantê-lo úmido por mais tempo. A semeadura em solos quentes e secos, superiores a 33 °C, diminui a sobrevivência das bactérias inoculadas, prejudicando a formação de nódulos, seu desenvolvimento e a eficiência da FBN, além de retardar ou impedir a germinação das sementes. A faixa de temperatura do solo adequada para a semeadura varia de 20 a 30 °C, sendo 25 °C a temperatura ideal para uma emergência rápida e uniforme (EMBRAPA, 2006).

O pH ideal do solo para cultivo da soja deve ser superior a 5,0 (RUFINI et al., 2011). Algumas espécies de bactérias fixadoras de N₂, como *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium loti* podem apresentar maior tolerância à acidez do solo e se desenvolvem em pH inferior a 5,0; contudo, a maioria dos rizóbios encontra melhor desenvolvimento em pH 5,0 a 7,0. Atingir esses níveis de pH no solo é possível por meio de calagem que, além de corrigir a acidez do solo, elevando o pH, aumenta a disponibilidade de vários nutrientes e diminui a disponibilidade de elementos tóxicos (SCHONINGER et al., 2010).

A disponibilidade de oxigênio (O₂) no nódulo da soja é um fator importante na atividade da enzima nitrogenase. Concentrações de oxigênio no nódulo próximas a 10% afetam a atividade da nitrogenase devido à diminuição da respiração, produção de ATP e, conseqüente, disponibilidade de energia. Contudo, concentrações mais elevadas desnaturam a enzima nitrogenase (KUZMA et al., 1999).

No que se diz respeito aos tratamentos fitossanitários das sementes, Hungria; Campo; Mendes (2007) relataram que a presença de agroquímicos nas sementes resultou na redução de até 98% na população de *Bradyrhizobium*. Campo; Araujo; Hungria (2009) confirmaram a campo, a redução na nodulação superior a 80% e perdas de produtividade de grãos superiores a 20%, dependendo do ingrediente ativo do fungicida utilizado no tratamento desementes, do histórico da área de cultivo e da textura do solo. Em solos com elevado percentual de areia, os

prejuízos são mais severos e os autores salientam que o efeito tóxico dos produtos químicos não é reduzido pelo tratamento prévio e secagem das sementes.

A disponibilidade de água interfere no transporte de fotossintatos via floema e compostos nitrogenados via xilema. O sistema vascular desenvolve turgor positivo, uma vez que a água que traz fotossintatos via floema é absorvida pelo nódulo, seguindo o caminho de volta, carregando os solutos nitrogenados via xilema (WALSH, 1995). VADEZ et al. (2000) ressaltam que o estresse hídrico diminui a concentração de Mn^{++} , o qual é cofator da enzima amido hidrolase, responsável pela degradação de ureídeos nas folhas, principal forma de composto nitrogenado resultante de FBN em diversas espécies de leguminosas tropicais, como a soja. O acúmulo de ureídeos não metabolizados leva à regulação negativa da FBN.

No caso de suprimento de N mineral, deve-se respeitar a recomendação de limite máximo de 20 kg de N/ha, para não inibir a nodulação das raízes pelas bactérias fixadoras de N_2 (CÂMARA, 2014).

3.3. Bactérias do gênero *Bradyrhizobium*

No final do século XIX, foi evidenciado que o nitrogênio atmosférico estava sendo assimilado através dos nódulos radiculares das plantas leguminosas. Em 1888, Beijerinck relatou isolamento de bactérias do nódulo de raiz de ervilha (*Pisum sativum* L.) e estabeleceu que elas eram responsáveis pelo processo de FBN, nomeando-as de *Bacillus radicola* (BEIJERINCK, 1888 *apud* HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). Mais tarde, Frank denominou essas bactérias como *Rhizobium*, originalmente com apenas uma espécie, *R. leguminosarum* (FRANK, 1889 *apud* HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015).

No início dos anos 1960, bacteriologistas iniciaram incessantes testes morfológicos, nutricionais e metabólicos, bem como sorológicos. Em 1965, De Ley e Rassel (1965) demonstraram, em estudos de taxonomia, clara distinção entre dois grupos de bactérias, as *Agrobacterium* e *Rhizobium*. Mais tarde, em 1982, Jordan propôs a separação taxonômica baseada em curvas de crescimento, para diferenciar o *Rhizobium*, de multiplicação rápida, daqueles de multiplicação lenta, os

Bradyrhizobium (JORDAN, 1982). Esse último gênero era composto por apenas uma espécie, *B. japonicum*, isolada a partir de nódulos de raízes de soja.

Hollis; Kloos; Elkan (1981) demonstraram diferenças genéticas na espécie *B. japonicum*, com diversos resultados mostrando diferenças fenotípicas e genotípicas entre os grupos I e II dessa espécie. Em 1992 Kuykendall e colaboradores sugeriram a subdivisão de *B. japonicum* em *B. japonicum*, com estirpes do grupo I (I e Ia) e *B. elkanii*, com estirpes do grupo II (KUYKENDALL et al., 1992). Mais recentemente, as estirpes previamente classificadas como *B. japonicum* Ia foram reclassificadas como *B. diazoefficiens* (DELAMUTA et al., 2013).

Embora o termo rizóbio tenha sido utilizado inicialmente para designar bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium*, mais recentemente ele vem sendo utilizado de modo geral para todas as bactérias capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em associação com leguminosas (WILLEMS, 2006).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* apresentam crescimento lento, com tempo de geração de 7 a 13 h e alcalinização do meio de cultivo tendo manitol como fonte de carbono. São bactérias Gram-negativas e possuem a forma de bastonete, com tamanho variável de 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm , sendo a sua mobilidade dada por um flagelo polar ou subpolar. São predominantemente aeróbias e quimiorganotróficas, não esporulam, e podem ser encontrados grânulos de poli- β -hidroxibutirato no interior das células. A temperatura ótima para o seu crescimento ocorre entre 25 e 30°C e em meio de cultivo contendo extrato de levedura e manitol apresentam colônias brancas, circulares, convexas e opacas, raramente translúcidas, tendendo a ser granulares na textura e seu tamanho não excede a 1 mm de diâmetro para um período de incubação de cinco a sete dias (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994).

3.4 Bactérias do gênero *Azospirillum*

A primeira citação do gênero foi em 1925, em estudos realizados por Beijerinck, sendo na época denominado como *Spirillum lipoferum*. Em 1973, Peña Cabriales e Döbereiner iniciaram estudos sobre a capacidade de FBN dessas bactérias em vida livre, sendo proposta, então, a adição do prefixo “azo” e, portanto,

reclassificação como *Azospirillum*. As duas primeiras espécies descritas foram *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978 *apud* PEÑA-CABRIALES; DÖBEREINER, 1973), sendo a segunda, até hoje, a mais estudada. Em 2019, já havia 20 espécies descritas no gênero (DSMZ, 2019).

O *Azospirillum* é uma Eubacteria (bactérias verdadeiras), classificada na subdivisão α -Proteobacteria, Gram-negativa, de formato vibrio e/ou espirilo. A temperatura ótima de crescimento varia de 28 a 41°C, dependendo da espécie em questão, e apresenta um diâmetro de, aproximadamente, 1 μ m e comprimento de 2,1 – 3,8 μ m (MOREIRA et al., 2010). São bactérias aeróbicas, podendo apresentar características diazotróficas, ou seja, são capazes de crescer utilizando nitrogênio atmosférico. *Azospirillum* pode, também, se associar endofiticamente a algumas plantas, em uma interação considerada íntima, na qual a planta fornece os nutrientes e hábitat, enquanto a bactéria influencia no crescimento e sanidade da planta (DÖBEREINER, 1992; CASTELLEN, 2015; HUERGO et al., 2008). Em geral, porém, são classificadas como associativas, habitando a rizosfera.

Bactérias desse gênero são amplamente encontradas em solos tropicais e subtropicais, em associação com raízes de cereais, gramíneas e outras espécies vegetais. Devido à mobilidade das suas células, aliada à sua quimiotaxia positiva para certos ácidos orgânicos, açúcares e aminoácidos, essas bactérias apresentam vantagem competitiva na rizosfera, devido à afinidade entre o vegetal e a bactéria (ECKERT et al, 2001).

A característica diazotrófica confere ao *Azospirillum* a capacidade de fixar N₂ por meio do complexo dinitrogenase. Todavia, diferente das bactérias simbióticas, essas bactérias excretam apenas parte do N fixado diretamente para a planta associada. A posterior mineralização das células bacterianas pode contribuir com aportes adicionais de N para as plantas, sendo importante salientar que o processo de FBN pelo *Azospirillum* consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011).

Segundo Quadros (2009), a inoculação de *Azospirillum* na presença de pequenas doses de fertilizantes nitrogenados tem mostrado maior eficiência para o sistema planta/bactéria do que quando comparada ao uso isolado da bactéria. A adição de N tem um efeito direto sobre a exsudação radicular, aumentando o

fornecimento de fontes de carbono às bactérias e estimulando, desta forma, a efetivação da colonização rizosférica.

No entanto, a característica mais marcante dessa bactéria é a capacidade de promover crescimento das plantas por uma combinação de mecanismos, sendo, portanto, em geral classificada como uma bactéria promotora do crescimento de plantas (BPCP). As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por meio de diversos processos, tais como a capacidade de FBN, aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas, produção de fitormônios como auxinas, citocininas, giberilinas, etileno e de uma variedade de outras moléculas, capacidade de solubilizar fosfato e por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (HUNGRIA, 2011).

Entre os benefícios atribuídos às BPCP estão o aumento da altura da planta, da área foliar, o número de folhas e matéria seca, o diâmetro do caule, redução do tempo de aclimação, maior sobrevivência das mudas, melhoria em parâmetros fotossintéticos, incluindo o teor de clorofila e condutância estomática, maior teor de prolina na parte aérea e raízes. Por aumentarem o volume radicular, as plantas podem também sobreviver um tempo maior de estresse hídrico e têm menores chances de sofrerem acamamento (HUNGRIA, 2011).

3.5 Inoculantes

O termo inoculante faz referência a um veículo que traz microrganismos vivos aplicados junto a um veículo de interesse agrônômico, capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, através de diferentes mecanismos, também sendo denominados como biofertilizantes em alguns países (REIS et al., 2006; THAKUR et al., 2015). Acredita-se que o processo de inoculação já ocorria antes mesmo do processo de FBN ser desvendado, no início do século XIX, quando o transporte de terra de alfafais já estabelecidos, na Inglaterra, era realizado para as novas áreas onde se desejava introduzir essa leguminosa (HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). O surgimento da indústria de inoculantes para leguminosas ocorreu em 1895, quando Nobbe e Hiltner desenvolveram uma patente para cultura de rizóbio em crescimento laboratorial, que depois passou a ser

comercializada pela empresa Nitragin. A produção em maior escala foi realizada no ano seguinte, em 1896, iniciando-se a comercialização em 1898 (ELMERIC, 2007; HUNGRIA; MENNA; DELAMUTA, 2015). No final da década de 1920 iniciou-se a utilização de um veículo composto de matéria orgânica sólida, denominado turfa, que fornece maior proteção para o microrganismo.

No Brasil, a produção de inoculante em nível industrial teve início na década de 1950, sendo a turfa utilizada, em sua grande maioria, como veículo inoculante. Todavia, trata-se de um recurso natural de longo período geológico de formação e, portanto, de difícil renovação, se tornando em recurso de pouca disponibilidade, ausente em alguns países e com grandes possibilidades de, futuramente, tornar-se escasso (FREIRE, 1968).

Em 1989 foram produzidos cerca de 16 milhões de doses de inoculantes, em 2016 essa produção foi elevada a mais de 50 milhões de doses, sendo mais de 45,8 milhões para a cultura da soja, sendo 35 milhões de doses de inoculante líquido e 10,8 milhões de doses de inoculante turfoso, tornando o Brasil um dos maiores produtores de inoculante do mundo e o maior consumidor também (ANPII, 2019).

O CFIC (Coordenação de Fertilizantes, Inoculantes e Corretivos), órgão do MAPA, é o fiscalizador do comércio e da qualidade dos inoculantes, e se baseia em protocolos inicialmente elaborados pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), e que posteriormente foram transformados em instruções normativas. A determinação é que os inoculantes contendo rizóbios devem apresentar, no mínimo, 1×10^9 células de rizóbio por grama ou mililitro de inoculante, não sendo permitida a presença de contaminantes detectáveis na diluição de 1×10^{-5} (MAPA, 2011a). Para inoculantes à base de *Azospirillum*, a concentração celular mínima foi estabelecida em $1,0 \times 10^8$ células viáveis/g ou mL. Os veículos de inoculação mais comuns podem ser na forma líquida ou sólida (turfoso), mas também há pesquisas de novas tecnologias em veículos para inoculantes, alguns visando maior tempo de prateleira, entre outros benefícios, como os do tipo liofilizado e outros visando baixo custo e biodegradabilidade (PANDEY; MAHESHWARI, 2007).

No entanto, os veículos devem apresentar propriedades constantes, serem de fácil obtenção, manuseio e processamento; necessitam, também, assegurar a nutrição e viabilidade celular durante o período de armazenamento. Os inoculantes devem manter concentração e pureza com garantia igual ou superior a seis meses (MAPA, 2011a); devem, ainda, permitir a aplicação mecânica, ser de fácil transporte e não ser abrasivo a máquinas e equipamentos (FREIRE; VERNETTI, 1999).

3.5.1 Inoculantes turfosos

Antes de 1994, no Brasil, não era utilizada a desinfestação da turfa para a produção de inoculantes comerciais, o que ocasionava o decréscimo rápido no número de células viáveis da bactéria de interesse. Em julho de 1996, na VI RELARE, foi decidido que os inoculantes brasileiros teriam que ser comercializados em turfa desinfestada, o que mantém a viabilidade das células da bactéria de interesse por maior tempo (HUNGRIA et al., 1996).

A turfa utilizada como substrato dos inoculantes turfosos tem origem em solos aluviais orgânicos e ácidos, que após peneirada é corrigida com calcário, visando atingir pH próximo a 7. Para que seja utilizada como veículo para inoculantes, a turfa deve possuir acima de 80% de matéria orgânica, baixo teor de cloretos e baixo teor de areia. Segundo Keyser; Somasegaran; Bohlool (1993), outros fatores que tornam a turfa um suporte adequado são: a alta capacidade em reter água; facilidade de esterilização (que apesar de ser na grande maioria feita por radiação gama, pode ser feita em autoclave); a manutenção da viabilidade das estirpes inoculadas durante o período de armazenamento e a ausência de toxicidade aos seres humanos, animais e plantas. Em geral, a produção ocorre pela injeção de doses de 50 mL para cada 150 ou 200 g de turfa peneirada e previamente esterilizada, seguida por homogeneização e incubação por cerca de 30 dias (CÂMARA, 1998).

No caso de inoculantes turfosos comercializados no Brasil, foi relatada baixa aderência às sementes, sendo recomendado o uso de solução açucarada a 10% (BRANDÃO JUNIOR; HUNGRIA, 2000). Além da sacarose, outros

adesivos também podem ser empregados com sucesso, como a goma arábica, goma preparada à base de polvilho de mandioca, polvilho de araruta ou farinha de trigo, bem como produtos industriais, como metiletilcelulose e metilhidroxipropilcelulose (FARIA; JESUS; FRANCO, 1985).

3.5.2 Inoculantes líquidos

O inoculante líquido é composto por uma solução aquosa de nutrientes e aditivos com o objetivo de aumentar a longevidade das células bacterianas. Por sua natureza líquida, a aplicação no campo torna-se facilitada, não sendo necessário misturar com outros tipos de soluções, como é o caso do tipo turfoso, ao qual precisam ser adicionados adesivos; além disso, a adesão dos microrganismos também pode ser maior com o inoculante líquido. No entanto, a sobrevivência de bactérias no inoculante líquido e nas sementes inoculadas é dificultada porque as bactérias não possuem a proteção proporcionada pela turfa contra possíveis estresses provocados por altas temperaturas, tratamentos químicos, baixa umidade, entre outros (TITTABUTR et al., 2007).

Para aumentar a proteção dos inoculantes líquidos, substratos e aditivos vêm sendo testados, como carvão, alginato, argila, carboximetilcelulose (CMC), goma xantana, goma arábica, glicerol, polivinilalcool (PVA) e polivinilpirrolidona (PVP), sendo que alguns se mostraram promissores no incremento da sobrevivência celular (STEPHENS; RASK, 2000). Dentre os protetores citados, um dos mais utilizados nos inoculantes é o PVP, sendo responsável por formar um filme protetor, impedindo a perda de água; outra característica do PVP reside em sua propriedade de absorver compostos polifenólicos dos exsudados das sementes (BUSHBY; MARSHALL, 1977). Tittabutret al. (2007) ressaltam a importância dos compostos isoflavonóides, sendo esses importantes mensageiros moleculares que levarão à formação dos nódulos; conseqüentemente, ao diminuir a concentração dessas moléculas a eficiência simbiótica pode ser afetada. Zhao et al. (2015), porém, destacam a propriedade carcinogênica dos monômeros do PVP, podendo contaminar rios e lagos próximos às plantações e lençóis freáticos por lixiviação, prejudicando a vida aquática.

3.5.3 Outros tipos de veículos para inoculantes

Veículos inoculantes de baixo custo e com potencial para aplicação no ambiente agrícola têm sido alvo de intensas pesquisas, como por exemplo, bagaço de cana, serragem, turfa derivada de cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão vegetal, fosfato de rocha, pó de carvão, lignina, entre outros. Em campo, porém, ainda existem problemas com relação à viabilidade das células em vários desses veículos e, também, inerentes à tecnologia, pois precisam de ajustes quanto à eficácia no campo, estando diretamente relacionada ao sucesso do estabelecimento das bactérias do inoculante no sistema radicular (PANDEY; MAHESHWARI, 2007).

Rosa; Franco; Cali (2001) descrevem que os sistemas poliméricos biodegradáveis podem ser considerados tecnologias alternativas, pois podem ser degradados pela ação de microrganismos sem causar danos ao meio ambiente, podendo obter o selo de materiais ecologicamente seguros. Não obstante, as aplicações tecnológicas destes materiais normalmente requerem melhorias nas suas propriedades mecânicas.

Exemplos práticos da aplicação de polímeros foram avaliados por Bashan et al. (2002), referindo-se ao uso do alginato e goma xantana, sendo biodegradáveis e de baixo custo, promovendo o encapsulamento das células, com a liberação ocorrendo somente após a degradação do material no ambiente e, assim, prevenindo as células contra estresses ambientais, podendo favorecer a sua multiplicação e a sobrevivência quando aplicadas ao solo.

Segundo Deaker; Roughley; Kennedy (2007), goma arábica, metilcelulose e polivinilpirrolidone (PVP) podem ser usados como adesivos para inoculantes turfosos contendo células de rizóbio, de modo a auxiliar na cobertura das sementes e, assim, proteger as células bacterianas contra a dessecação, conferindo proteção durante a secagem a vácuo e aumentando a sobrevivência celular.

Ortega Filho e Brondi (2006) sugerem que o bagaço da cana-de-açúcar pode servir como matéria prima para a produção do polihidroxibutirato, que é

composto basicamente por carboidratos, sendo um produto biocompatível e ecologicamente viável.

A carboximetilcelulose (CMC) é um polímero aniônico derivado da celulose e solúvel em água. É produzida via reação de Williamson, pelo tratamento de celulose com ácido monocloroacético em presença de excesso de hidróxido de sódio. É um importante produto industrial, geralmente isolado e comercializado como sal de sódio, com múltiplas possibilidades de aplicação industrial e tem sido utilizado em inoculantes para rizóbio (ROHR, 2007).

Pesquisas de Tester; Karkalas; Qi (2004) sugerem o uso do amido de milho como aditivo em veículos de inoculantes. O amido é um carboidrato de estrutura complexa, formado de monômeros de glicose ligados entre si. Os grânulos de amido são compostos por amilose e amilopectina, o que corresponde a 98–99% da massa seca dos grânulos; a razão entre os dois polissacarídeos depende da origem botânica do amido. É um material natural renovável e aplicado em produtos alimentares, em papel, têxteis, adesivos, material farmacêutico e nas indústrias petroquímicas (TESTER; KARKALAS; QI, 2004).

3.6 Tecnologia de coinoculação

A tecnologia de coinoculação, também denominada de inoculação mista com bactérias envolvendo diferentes processos microbianos, tem sido estudada tanto em leguminosas, como em não leguminosas. Consiste em combinações de diferentes microrganismos, os quais produzem efeito sinérgico, em que se superam os resultados obtidos quando utilizados de forma isolada (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO; 2013).

De acordo com Benintende et al. (2010), o cultivo de leguminosas com inoculação conjunta de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* tem sido relatado como uma das tecnologias mais promissoras no que se diz respeito à inoculação, onde se tem observado efeitos positivos na produção de matéria seca, rendimento e teor de N foliar e de grãos quando comparados com leguminosas inoculadas somente com *Bradyrhizobium*.

Chibeba et al. (2015) demonstraram incremento no crescimento de plantas de soja coinoculadas com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* o que atribuído à maior disponibilidade de N devido à FBN e à presença de fitormônios que estimulam o crescimento das plantas. Os autores ainda descrevem o aumento e a precocidade da nodulação, pertinente às alterações causadas por esta BPCP na morfologia das raízes, como o incremento no número de pelos radiculares. Pardinho e Primiere (2015) também relatam aumento da produtividade e no peso de grãos em plantas de soja coinoculadas em relação às plantas inoculadas apenas com *B. japonicum*.

Hungria; Nogueira; Araujo (2013) conduziram experimentos de coinoculação em soja nas regiões de Londrina e Ponta Grossa nas safras 2009/2010 e 2010/2011 e relatam que, nos tratamentos coinoculados na safra 2009/10, houve acréscimo de 11% no rendimento de grãos em Londrina. Na safra seguinte, os aumentos do rendimento de grãos nos tratamentos coinoculados foram de 14% em Londrina e de 16% em Ponta Grossa. Bárbaro-Torneli et al. (2018) demonstraram incrementos de até 11,2% na produtividade das plantas coinoculadas, resultando em valores acima da média nacional.

Cassán et al. (2009) também relataram em soja coinoculada com *B. japonicum* e *A. brasilense* maior número de nódulos e porcentagem de plantas noduladas, o que foi atribuído à produção de metabólicos por *A. brasilense*, como compostos reguladores de crescimento de raízes, como o ácido indol acético (AIA).

Braccini et al (2016), em ensaios desenvolvidos a campo na região de Maringá, avaliaram a coinoculação de sementes de soja com *B. japonicum* e *A. brasilense* em diferentes concentrações, aplicadas na semente e no sulco de semeadura. Nesse trabalho, observaram acréscimos significativos, pela coinoculação, no número e peso seco dos nódulos, N total de grãos e da parte aérea. Entretanto, em tratamentos que utilizavam doses altas de *A. brasilense* os resultados foram inferiores aos tratamentos não inoculados, com adubação nitrogenada e inoculado somente com *B. japonicum*. Essa constatação enfatiza a importância do ajuste da concentração celular pela dose do inoculante a ser empregada, cujo excesso pode ser prejudicial.

Mendanha Santos (2018) verificou os benefícios da coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. aplicados nas sementes e de *A. brasilense* aplicado por

pulverização foliarnos estádios V_3 e V_5 em plantas de soja em dois experimentos na safra 2017/18. No primeiro experimento, em Santa Rita do Novo Destino, os tratamentos com duas doses de *Bradyrhizobium* spp. na semeadura e três doses de *A. brasilense* nos estádios V_3 e duas doses de *Bradyrhizobium* spp. na semeadura e três doses de *A. brasilense* nos estádios V_5 foram significativamente superiores aos demais tratamentos, nos parâmetros de altura de plantas e número de nódulos. O mesmo se repetiu no segundo experimento, em Goianésia, levando a autora a concluir que a coinoculação de *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* spp. promoveu maior disponibilidade de N para desenvolvimento foliar e que tal sinergia demonstrou eficiência para ganhos de produtividade.

De modo geral, pode-se verificar que os benefícios gerados pela sinergia entre processos microbianos têm sido objeto de interesse de pesquisadores e produtores, pela sua evidente repercussão em termos de rendimento, sustentabilidade e economia.

4 Metodologia

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia de Solos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, em Londrina- PR.

Os ensaios de eficiência agrônômica a campo foram realizados em áreas de produção comercial em Florestópolis-PR, Lutécia-SP, Londrina-PR, Ponta Grossa-PR e Paranaíba-PR na safra de soja de 2017/18.

4.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados para o desenvolvimento de formulações líquidas de inoculantes foram:

Azospirillum brasilense estirpes Ab-V5 (=CNPSo 2083) e Ab-V6 (=CNPSo 2084), que constam na lista de estirpes recomendadas pelo MAPA para as culturas do milho e do trigo (MAPA, 2011a) e *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 (=CNPSo7, =CPAC 15) e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 (=CNPSo 6, =CPAC 7), que constam na lista de estirpes autorizadas pelo MAPA para a cultura da soja (MAPA, 2011a). Posteriormente a 2011, as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 também foram recomendadas para a coinoculação de soja e feijoeiro e, em 2016, para a inoculação de braquiárias,

As estirpes foram obtidas da “Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas da Embrapa Soja” (Coleção CNPSo, Coleção WFCC #1213, WDCM #1054).

4.2. Desenvolvimentos das formulações líquidas de inoculantes contendo *A. brasilense* estirpes Ab-V5e Ab-V6 e *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080

4.2.1. Preparo do pré-inóculo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080

Para a obtenção do pré-inóculo as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. foram cultivadas em 40 mL de meio YM (Anexo 1, sem ágar e indicador vermelho Congo), em frasco de 100 mL. As amostras foram incubadas a 29 °C, por três dias, sob agitação a 120 rpm. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspendido em 40 mL de solução salina a 0,85% (Anexo 1) e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante formado na segunda centrifugação foi descartado, ressuspendendo-se o pélete em 40 mL do meio YM em um tubo Falcon previamente esterilizado, com o objetivo de ajustar a concentração em, aproximadamente, 10^9 células/mL. O ajuste da concentração foi feito pela leitura em espectrofotômetro a 600 nm, usando o valor de densidade ótica (D.O.) 0,400 para SEMIA 5080 e D.O.0,600 para SEMIA 5079. Os valores de D.O foram determinados por uma curva de crescimento pré-estabelecida no laboratório, cuja diferença entre as densidades óticas deve-se à maior produção de exopolissacarídeos (EPS) pela SEMIA 5079.

4.2.2. Preparo do pré-inóculo de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6

O pré-inóculo da bactéria *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foi realizado em meio RC (Anexo 1, sem ágar e indicador vermelho Congo). As amostras foram incubadas a 29 °C, por um dia, sob agitação a 120 rpm. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspendido em 50 mL de solução salina a 0,85% e centrifugado nas mesmas condições. O sobrenadante da segunda centrifugação foi descartado, ressuspendendo-se o pélete em 50 mL do meio RC modificado (Anexo 1, sem ágar e indicador vermelho Congo e com concentração de extrato de levedura modificada para 0,3 g/L) em um tubo Falcon previamente

esterilizado, com objetivo de ajustar a concentração em, aproximadamente, 10^8 células/mL. O ajuste da concentração foi feito pela leitura em espectrofotômetro a 600 nm, considerando o valor de D.O. 0,600 para ambas as estirpes, diluindo com meio RC quando necessário.

4.2.3. Diluição seriada

As metodologias utilizadas são regulamentadas pelo MAPA, na Instrução Normativa Nº 30, de 12 de novembro de 2010 (MAPA, 2010).

Após o crescimento celular, foi retirada uma amostra de 1 mL, colocada em tubo de ensaio com 9 mL de solução salina 0,85% estéril, resultando na diluição 10^{-1} . As diluições decimais foram realizadas até 10^{-7} , com transferências sucessivas de alíquotas de 1 mL entre tubos de ensaio contendo solução salina 0,85%. A cada transferência utilizou-se uma nova ponteira para evitar contaminações. Cada série de diluição seriada foi realizada em triplicata. Para proporcionar uma homogeneização eficiente, em cada transferência das alíquotas realizou-se a agitação do tubo de ensaio com o auxílio de um agitador de tubos orbital durante 15 segundos na velocidade máxima. As diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} foram utilizadas para a estimativa do número de células viáveis.

4.2.4. Estimativa do número decélulas viáveis

O método da gota (*drop plate*) consiste na inoculação de um volume conhecido da amostra, geralmente 30 μ L, em meio de cultura sólido, onde a gota é absorvida. Esse método foi utilizado para a estimativa do número de células viáveis de *A. brasilense* estirpe Ab-V5 e Ab-V6 em meio de cultura sólido RC (MAPA, 2018), pela contagem de colônias após três dias de incubação a 28 °C.

Para determinação do número de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp. também foi utilizado o método da gota quando cultivado separadamente de *A. brasilense* e, quando feito o cocultivo com *A. brasilense*, o método utilizado foi o de espalhamento (MAPA, 2010), utilizando os mesmos passos de diluição do método

da gota, diferindo apenas quanto à inoculação na placa, em que 100 µL são espalhados por toda superfície do meio sólido.

A análise foi realizada em triplicata de cada uma das diluições seriadas descritas no item 4.2.3. As placas foram incubadas invertidas, a 28°C, durante 72 h para *A. brasilense* e para *Bradyrhizobium* spp. durante 120 h quando usado o método da gota e 168 h para o método de espalhamento. Após esse período, as colônias foram submetidas à contagem para a estimativa de UFC/mL (Unidades formadoras de colônias/mL), bem como para a verificação e contagem de eventuais contaminantes. A concentração de células para o método da gota é calculada a partir da média das replicatas, pela equação 1 e, para o método de espalhamento, pela equação 2. O valor de multiplicação por 33,33 na equação 1 refere-se à correção do volume pipetado nas placas, para expressar do número de células viáveis por mililitro de formulação.

- (1) $\text{UFC/mL} = \text{Média de UFC} \times \text{Fator de diluição da amostra} \times 33,33$
(2) $\text{UFC/mL} = \text{Média de UFC} \times \text{Fator de diluição da amostra} \times 10$

4.2.5. Avaliação de pH e densidade ótica (D.O.)

Os frascos contendo as amostras foram homogeneizados em vórtex na velocidade máxima durante 15 s e abertos dentro da câmara de fluxo laminar previamente assepsiada, para então serem retiradas alíquotas para análise de concentração de células por mililitro (UFC/mL), pH e D.O. A alíquota de 5 mL destinada à avaliação de pH foi realocada em tubo Falcon de 15 mL. Nesse tubo foi inserido o eletrodo do potenciômetro, então, anotado o resultado. O potenciômetro utilizado era composto por um detector de célula única que possibilitou sua utilização junto ao tubo Falcon. Para a avaliação de D.O. foi utilizada a primeira amostra da diluição seriada descrita em 4.2.4, analisada em espectrofotômetro a 600 nm.

4.2.6. Análise do uso de diferentes fontes de carbono

A fim de determinar a capacidade de metabolizar cada fonte de carbono (Tabela 1), procedeu-se à avaliação do crescimento celular, com contagem

das UFC (4.2.4) e pH (4.2.5) para *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* spp., e D.O. (4.2.5) apenas para as estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Os cultivos dos microrganismos foram feitos separadamente, para *Bradyrhizobium* spp. e para *A. brasilense*, realizados em triplicata e previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos com valores de pH ajustados para 6,8 – 7,0, utilizando NaOH 3 M.

No ensaio para *Bradyrhizobium* spp. foram utilizados 10 mL do pré inoculo (4.2.1) em 100 mL da solução de cultivo em frasco de 500 mL com tampa ajustando a UFC/mL inicial em aproximadamente 1×10^8 , as amostras foram cultivadas em agitador orbital em 120 rpm e 29 °C durante 60 dias. No ensaio para *A. brasilense*. foi utilizado 1 mL do pré inoculo (4.2.2) em 100 mL da solução de cultivo em frasco de 500 mL com tampa ajustando a UFC/mL inicial em aproximadamente 1×10^7 , as amostras foram cultivadas em agitador orbital em 120 rpm e 29 °C durante 39 dias. Periodicamente foram retirados 1 mL de cada amostra para análise de UFC/mL e D.O. e 5 mL para análise de pH.

Tabela 1- Composição dos tratamentos para análise de uso de diferentes fontes de carbono

Reagentes	Tratamentos (g/L)								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
K₂HPO₄	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO₄.7H₂O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Extrato de levedura	0.0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Sacarose	0.0	0.0	5,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Glicerol	0.0	0.0	0.0	5,0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Manitol	0.0	0.0	0.0	0.0	5,0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ácido glutâmico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5,0	0.0	0.0	0.0
Ácido málico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5,0	0.0	0.0
Ácido cítrico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5,0	0.0
Ácido maleico	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5,0

Fonte: O próprio autor. pH inicial ajustado em 6,86.

4.2.7. Desenvolvimento de formulações

Inicialmente, foram desenvolvidas as formulações F2, F3 e F4 (Tabela 2 e 3), com base nos resultados alcançados nas análises 4.2.6. A formulação F1 (Tabela 2 e 3) foi o resultado da mistura entre os meios RC e YM (Anexo 1, sem ágar e vermelho Congo. Essa formulação foi descrita como

formulação controle para comparação das formulações de coinoculante. Com o decorrer das análises, foi desenvolvida a formulação F5 e, posteriormente, a formulação F6 (Tabela 2 e 3). Em adição às informações obtidas na literatura, as cinco formulações e o controle tiveram valores de pH ajustados para 6,8 – 7,0 utilizando NaOH 3 M antes da adição do inóculo e foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos. O crescimento celular foi realizado segundo a técnica descrita em 4.2.4 e o pH e D.O. segundo a técnica descrita em 4.2.5.

Tabela 2 – Composição das formulações de coinoculante avaliadas

Reagentes	Formulações (g/L)					
	F1 (Controle)	F2	F3	F4	F5	F6
Ácido málico	5	5	5	5		2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
EDTA Fe.	0,056	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
Extrato de levedura	0,3	0,3	0,3	0,3	2	2
Glicerol	0,0	0,0	0,0	10	0,0	0,0
K ₂ HPO ₄	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5
KH ₂ PO ₄	0,0	1	1,8	1	0,5	0,5
Manitol	5	5	5	0,0	5	8
Mg.SO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NH ₄ Cl	0,0	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3
NH ₄ NO ₃	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
NaCl	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sacarose	0,0	0,0	0,0	0,0	5	0,0
Solução de micronutrientes (mL)	2	2	2	2	2	2

Fonte: O próprio autor. pH inicial ajustado em 6,8

Tabela 3 – Composição química da Solução estoque de micronutrientes

Reagentes	Quantidade (g/L)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,04
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,2
H ₃ BO ₃	1,4
MnSO ₄ .H ₂ O	1,8
NaMoO ₄ .2H ₂ O	1

Fonte: DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI (1995).

4.2.8 Análise dos tempos de incubação

O coinoculante objetivo deste trabalho é composto por bactérias que apresentam características distintas de crescimento e longevidade celular, bem como concentrações requeridas no produto final; quando inoculado com *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* spp. no mesmo dia, não atendia tais características básicas. Portanto, visando balancear e atender tais características foram cocultivados, em frascos de 500 mL, 100 mL de *Bradyrhizobium* spp. com concentração inicial de, aproximadamente 1×10^8 UFC/mL e *A. brasilense* com concentração inicial de aproximadamente, 1×10^7 UFC/mL, utilizando as formulações F3 e F4, que descreviam os melhores resultados na época da realização do ensaio, com agitação de 120 rpm a 29 °C. O ensaio foi iniciado com a inoculação de *Bradyrhizobium* spp. em quatro frascos, sendo considerado, nesse momento, o tempo inicial do cultivo ou tempo zero. Após dois dias de cultivo foram inoculadas as bactérias *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, originando o cocultivo (T1); após três dias, inoculou-se *A. brasilense* em (T2); e no quarto dia do cultivo em (T3), inoculou-se *A. brasilense*. Para o tratamento controle deste ensaio cultivou-se *Bradyrhizobium* spp. sem inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 ou *A. brasilense* Ab-V6, durante os cinco dias. Foram feitas análises de concentração celular de *A. brasilense* e *Bradyrhizobium* spp. nos tratamentos de cocultivo e somente de *Bradyrhizobium* spp. no tratamento controle.

As análises de concentração celular do tratamento controle foram do segundo ao quinto dia de cultivo de *Bradyrhizobium* spp., enquanto que, para os tratamentos de cocultivo T1, T2 e T3, as análises foram realizadas após 24 h da inoculação de *A. brasilense*. Desse modo, em T1 avaliou-se a concentração celular de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* no terceiro, quarto e quinto dia de ensaio, em T2 avaliou-se a concentração celular de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* no quarto e quinto dia de ensaio e em T3 avaliou-se a concentração celular de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* apenas no quinto dia de ensaio.

4.2.9 Análise do tempo de viabilidade celular promovido pela adição de protetores celular às formulações

Foram realizadas análises de concentração celular para determinação do tempo de viabilidade celular promovido pela presença de seis diferentes protetores (Tabela 4) as formulações F1 a F5 (Tabela 2), a formulação F6 não foi desenvolvida a tempo de ser submetida a esta avaliação. As estirpes foram inoculadas seguindo os parâmetros desenvolvidos em 4.2.8 e cada tratamento foi composto por uma formulação adicionada de um protetor celular, em triplicata. Após o fim do cultivo nas condições já descritas, cada repetição foi homogeneizada, subdividida em alíquotas de, aproximadamente, 5 mL e injetada por seringas acopladas a agulhas previamente esterilizadas às minibolsas (*minibags*) confeccionadas a partir de bolsas empregadas para o acondicionamento de inoculantes comerciais, fornecidas pela empresa Total Biotecnologia Indústria e Comércio LTDA. Cada *minibag* foi cortada e selada ao mesmo tempo em ambiente estéril por um selador portátil posicionado dentro da camara de fluxo laminar após assepsia com etanol 70%. As *minibags* foram cortadas com medidas aproximadas de 8 x 8 cm, acondicionando aproximadamente 10 mL de cultivo. A área foi calculada para acondicionar aproximadamente o dobro do volume injetado, a fim de transferir ao máximo as condições de inoculantes comerciais aos microrganismos. As amostras então envasadas foram identificadas e realocadas em uma sala de incubação com temperatura de 28 °C. Nos tempos zero dia (final do cocultivo), sete dias e 30 dias as amostras de coinoculante de cada *minibag* foram homogeneizadas e analisadas quanto à concentração celular e pH.

Tabela 4 – Protetores celulares empregados nos meios de cocultivo de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense*.

	Protetores	Concentração (g/L)
P1	Trealose	0,35
P2	Polivinilpirrolidona (PVP)	2,0
P3	Carboximetilcelulose (CMC)	2,0
P4	Amido de milho comercial (AMC)	1,0
P5	AMC + CMC	1,0; 1,0
P6	Glicerol	10,0

Fonte: O próprio autor.

4.3 Ensaios de eficiência agronômica a campo

4.3.1. Estabelecimento e condução dos ensaios

Os ensaios foram conduzidos seguindo as instruções normativas do MAPA, do ANEXO à IN SDA 13, de 25 de março de 2011 (MAPA, 2011b).

Foram conduzidos cinco experimentos na safra 2017/2018, sendo quatro no estado do Paraná nos municípios de Londrina, Ponta Grossa, Paranavaí e Florestópolis, e um no estado de São Paulo, no município de Lutécia. As coordenadas geográficas, altitude, classificação climática, textura e classificação dos solos constam da Tabela 5. As informações agronômicas sobre o ensaio podem ser visualizadas na Tabela 6.

Trinta a 40 dias antes da semeadura foi realizada a amostragem de solo nas camadas 0-20 e 20-40 cm para análise química e a correção com calcário, quando necessário. A análise química foi realizada segundo procedimentos de Raij et al. (2001) e Silva (2009). Os valores de referência considerados também foram definidos segundo Raij et al. (2001) e Silva (2009). As análises foram realizadas no laboratório LABORSOLO do Brasil S/S Ltda e os resultados podem ser visualizados nas Tabelas 7 e 8. As frações de areia, silte e argila foram determinadas segundo Donagema et al. (2011) e apresentadas na Tabela 8. O teor de C no solo foi determinado em um analisador elementar Vario TOC Cube em amostras secas ao ar e finamente moídas (<0,02 mm), cujos resultados estão na Tabela 8. Esse método é considerado adequado para solos com alto teor de Fe, devido a sua maior acurácia e reprodutibilidade (SEGNIN ET al., 2008). A população de rizóbios microssimbiontes foi estimada pelo método do número mais provável (NMP) (MAPA, 2010) com contagem em plantas, usando a cultivar BRS 1010IPRO de soja como planta indicadora e os resultados obtidos estão disponibilizados na Tabela 8. A contagem de bactérias diazotróficas do solo também foi realizada, em meio NFb, segundo metodologia da IN 30 (MAPA, 2010) e os resultados podem ser visualizado na Tabela 8.

Tabela 5 - Coordenadas geográficas, altitude, classificação climática, textura e classificação dos solos nos locais onde os ensaios foram conduzidos na safra 2017/18.

Local	Coordenadas ^a	Altitude (m)	Classificação Climática ^b	Textura do solo	Classificação do solo
Florestópolis (PR)	22° 50' 21,89" S 51° 27' 25,08" O	494	<i>Cfa</i>	arenosa	Latossolo Vermelho Distrófico ^c
Lutécia (SP)	22° 11' 45,58" S, 50° 25' 27,82" O	470	<i>Cfa</i>	arenosa	Latossolo Vermelho Distrófico ^c
Londrina (PR)	23° 11' 2,75" S 51° 10' 30,29" O	595	<i>Cfa</i>	argilosa	Nitossolo Vermelho Eutroférico ^c
Ponta Grossa (PR)	25° 8' 52,01" S 50° 4' 43,93" O	880	<i>Cfb</i>	arenosa	Latossolo Vermelho Distrófico ^c
Paranavaí (PR)	22° 57' 16,82" S 52° 28' 4,31" O	400	<i>Cfa</i>	arenosa	Latossolo Vermelho Distrófico ^c

^a Latitude (S), longitude (O). ^b De acordo com a classificação de Köppen-Geiger; *Cfa*, Subtropical úmido; *Cfb*, temperado. ^c Pela classificação norte-americana, Typic Acrudox

Tabela 6 – Informações agronômicas sobre os experimentos realizados a campo na safra 2017/18.

Local	Cultivar	Data de Semeadura	Densidade Plantas/há x1000	Data da coleta vegetativa	Estágio da Coleta Vegetativa	Data da Colheita	Área total da parcela	Área útil coletada para rendimento
Florestópolis	BRS 1010IPRO	18/10/2017	333	29/11/2017	42 DAP ^a , 35 DAE ^b , V5 ^c	27/02/2018	25,2 m ²	7,425 m ²
Paranavaí	BRS 1010IPRO	01/11/2017	333	14/12/2017	43 DAP, 35 DAE, V5	05/03/2018	24 m ²	6,75 m ²
Lutécia	BRS 1010IPRO	07/11/2017	333	20/12/2017	42 DAP, 35 DAE, V5	08/03/2018	25,2 m ²	6,75 m ²
Londrina	BRS 1010IPRO	15/11/2017	240	27/12/2017	42 DAP, 35 DAE, V5	24/03/2018	24 m ²	8,0 m ²
Ponta Grossa	BRS 1010IPRO	22/11/2017	240	10/01/2018	49 DAP, 36 DAE, V5	10/04/2018	24 m ²	8,0 m ²

^aDAP: Dias após plantio. ^b DAE: Dias após emergência. ^cFase vegetativa da soja V5 (quatro trifólios completamente desenvolvidos, ou cinco nós).

Tabela 7 - Caracterização química do solo nas camadas de 0-20 e 20-40 cm das áreas experimentais antes da semeadura dos ensaios da safra de 2017/2018.

Local	Profundidade	pH	pH	Acidez potencial	Ca ⁺²	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	P Mehlich 1	P Mehlich 3	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺
		(CaCl ₂)	(H ₂ O)	(H + Al)	-----cm _d /dm ³ -----				-----mg/dm ³ -----					
Florestópolis	00-20	5,04	5,69	2,50	1,16	0,59	0,14	0,01	57,8	66,0	1,70	153	152	2,23
	20-40	3,84	4,65	3,58	0,42	0,14	0,11	0,01	12,3	13,7	2,32	130	151	1,23
Paranavaí	00-20	5,17	5,80	2,38	1,00	0,57	0,17	0,01	19,1	26,9	1,10	124	165	5,19
	20-40	4,81	5,49	2,52	0,73	0,43	0,10	0,02	4,04	7,78	1,09	129	158	8,39
Lutécia	00-20	4,71	5,41	2,78	0,85	0,41	0,07	0,01	5,15	7,12	0,88	130	69,4	1,01
	20-40	4,19	4,95	2,99	0,79	0,48	0,04	0,01	4,39	5,60	0,91	153	61,5	1,31
Londrina	00-20	5,20	5,83	5,31	3,75	2,00	0,84	0,01	22,5	13,8	12,9	101	445	2,04
	20-40	5,07	5,72	5,35	3,22	1,73	0,37	0,01	11,4	6,49	11,1	98,6	316	1,28
Ponta Grossa	00-20	4,64	5,34	6,35	2,96	1,02	0,36	0,01	20,7	16,9	1,38	127	17,2	1,13
	20-40	4,40	5,14	6,74	1,64	0,62	0,27	0,01	2,97	2,33	1,08	110	12,4	0,50

Tabela 8 – Caracterização química, granulometria nas camadas de 0-20 e 20-40 cm e população de rizóbios microssimbiontes da soja (0-20 cm) e população de bactérias diazotróficas (0-20 cm) do solo dos locais experimentais antes do plantio dos ensaios da safra de 2017/2018.

Local	Profundidade	CTC (cmol _e /dm ³)		Saturação bases V (%)	C (g/dm ³)	Granulometria (%)			População de rizóbios (rizóbios/g)	População de bactérias diazotróficas (bactérias/g)
		pH 7,0	efetiva			Argila	Silte	Areia		
Florestópolis	00-20	4,40	1,90	43	2,89	8,5	2,35	89,1	2,15 x 10 ⁵	n.d.
	20-40	4,26	0,68	16	2,82	16,9	1,25	81,8	n.d. ^a	n.d.
Paranavaí	00-20	4,13	1,75	42	4,50	6,5	2,85	90,6	zero	2,50 x 10 ³
	20-40	3,80	1,28	33	2,36	8,5	2,1	89,4	n.d.	n.d.
Lutécia	00-20	4,12	1,34	32	4,14	11,9	1,1	86,9	7,36 x 10 ¹	9,50 x 10 ³
	20-40	4,31	1,32	30	4,07	9,95	1,0	89,0	n.d.	n.d.
Londrina	00-20	11,9	6,60	55	19,1	75,2	18,5	6,25	1,47x 10 ⁴	1,47 x 10 ³
	20-40	10,6	5,33	50	13,9	80,1	14,1	5,8	n.d.	n.d.
Ponta Grossa	00-20	10,7	4,35	41	23,4	49,3	6,45	44,2	1,10x 10 ⁶	9,50 x 10 ³
	20-40	9,28	2,54	27	19,8	52,2	6,65	41,1	n.d.	n.d.

Os experimentos foram delineados em blocos inteiramente casualizados, com seis repetições. A semeadura foi realizada com semeadora mecanizada de uma linha, a uma profundidade de 3 cm, com distância entre linhas de 50 cm. A fim de se evitar contaminação cruzada, as parcelas foram separadas por corredores de 1,5 m. A densidade de sementes e o tamanho das parcelas podem ser visualizados na Tabela 6, sempre observando o tamanho mínimo de 24 m² estabelecido no protocolo do MAPA (MAPA, 2011b).

Imediatamente antes da semeadura foi realizada a adubação com 300 kg/ha do formulado 00-20-20 (60 kg/ha de P₂O₅ e 60 kg/ha de K₂O) em todos os tratamentos. No tratamento controle não inoculado e com N-mineral, foram aplicados 200 kg de N/ha como ureia, metade antes da semeadura, na superfície da parcela e levemente incorporada, e o restante aplicado aos 35 DAE em cobertura. A data de semeadura em cada local pode ser visualizada na Tabela 6.

Nos estágios fenológicos V3-V5 (FEHR; CAVINESS, 1977) foi realizada a aplicação foliar de Co (2,5 g/ha) + Mo (20 g/ha). Não foram aplicados outros micronutrientes.

Todos os tratos culturais e fitossanitários foram realizados conforme especificado nas tecnologias para a produção de soja (EMBRAPA SOJA, 2013).

Os tratamentos foram: T1- Controle não inoculado e sem N-mineral; T2 - Controle não inoculado recebendo 200 kg de N/ha de N mineral (50% na semeadura e 50% no florescimento, como ureia); T3 - Inoculação padrão – inoculante turfoso contendo as estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ células/semente; T4 - Inoculante líquido comercial – contendo as estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. diazoefficiens* SEMIA 5080, aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ células/semente; T5 – T4 + 1 dose de inoculante comercial líquido de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, aplicado para fornecer 1,2 x 10⁵ células/semente; T6 - Formulação F3 – 1 dose de coinoculante fornecendo 1,2 x 10⁶ células de *B. diazoefficiens* SEMIA 5080/semente e 1,2 x 10⁵ células de *A. brasilense* Ab-V6/semente.

Em Ponta Grossa e Londrina foi adicionado um tratamento de inoculação no sulco de semeadura, T7 - Formulação F3 – 3 doses de coinoculante descrito em T6.

4.3.2 Coleta e avaliação dos experimentos a campo

Entre 42 e 49 dias após a semeadura (DAS) (Tabela 5), correspondendo a 35 a 37 dias após a emergência (DAE), quando as plantas estavam no estágio V5 de crescimento (FEHR; CAVINESS, 1977) foram coletadas cinco plantas por parcela para avaliação da nodulação (número e massa), da produção de biomassa aérea de plantas, do teor de N e do N total acumulado na parte aérea.

No laboratório, a parte aérea e as raízes foram separadas, lavadas cuidadosamente e deixadas em estufa a 50 °C, até massa constante (aproximadamente 72 h). Os nódulos foram removidos das raízes e colocados para secar novamente e, em seguida, pesados para a obtenção da massa de nódulos secos. O teor de N na parte aérea (N-Kjeldahl) foi determinado em espectrofotômetro pelo método do verde de salicilato, com leitura em 697 nm (FEIGL; ANGER, 1972) em extratos de plantas obtidos por digestão sulfúrica. A concentração multiplicada pela biomassa das plantas resultou no N total acumulado na parte aérea.

Os grãos foram limpos, pesados e, após a determinação da umidade em um determinador de umidade de grãos, a massa foi corrigida para 13% de umidade. O teor de N e o N total nos grãos foram determinados conforme descrito para a parte aérea.

4.4 Análises estatísticas

Os dados dos ensaios de análise do uso de diferentes fontes de carbono, do período de incubação e tempo de viabilidade celular promovida pela adição de protetores celulares às formulações foram submetidos ao teste de normalidade e de homogeneidade das variâncias. Em seguida, foi feita análise de variância (ANOVA). Quando o teste “F” foi significativo a 5%, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%, utilizando-se o programa estatístico R.

Para a avaliação estatística dos experimentos de eficiência agrônômica a campo foi utilizado o teste “F” a 5%, e quando não significativo a 5%, foi realizado o teste a 10% conforme especificado no anexo à IN No. 13 de 25 de março de 2011 (MAPA, 2011b), para comparação das médias ao nível de 10% de significância, posteriormente foi realizado o teste de Duncan a 5%,

5. Resultados e Discussão

5.4 Cultivo em diferentes fontes de carbono

Para uma compreensão inicial dos resultados obtidos nos ensaios 5.1.1 e 5.1.2, pode-se destacar as fontes de C utilizadas de acordo com suas composições químicas. O primeiro grupo, dos ácidos orgânicos, detém em sua estrutura a parte funcional de ácidos carboxílicos (-COOH) e é composto pelas fontes de C: ácido glutâmico (C₅H₉NO₄), ácido málico (C₄H₆O₅), ácido cítrico (C₆H₈O₇) e ácido maleico (C₄H₄O₄). O segundo grupo é composto pela fonte de C sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁), um dissacarídeo formado por concentração equimolar de glicose (C₆H₁₂O₆) e frutose (C₆H₁₂O₆), que pode ser hidrolisado facilmente por ácidos diluídos. O terceiro grupo é composto por moléculas com grupo químico funcional álcool (-OH), sendo eles o manitol (C₆H₁₄O₆), um açúcar-álcool de grande emprego medicinal e glicerol (C₃H₈O₃), que é o precursor de triglicerídeos, uma forma de lipídeo de armazenamento de energia. E, por último, extrato de levedura, que é composto por fontes de nutrientes complexas originadas no processo de secagem e moagem de leveduras.

5.1.1 Cultivo de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6

Ácidos orgânicos e açúcares fornecidos por plantas, em especial por gramíneas, têm grande importância nutricional às bactérias do gênero *Azospirillum* e essas moléculas exsudadas das raízes provocam um gradiente químico que atrai bactérias desse gênero, resultando na movimentação em direção à planta em busca desses nutrientes (TARRAND ET AL, 1978; SINGH, 2014).

Analisando o grupo dos ácidos orgânicos, verificam-se pelo menos três comportamentos distintos quando cultivados com *A. brasilense*. O primeiro comportamento é descrito na utilização de ácido cítrico para cultivo de *A. brasilense*, desenvolvendo concentração máxima de $5,11 \times 10^8$ UFC/mL no primeiro dia e rápido decréscimo desse valor, não sendo detectado após sete dias de cultivo, demonstrando baixa afinidade do microrganismo por esta fonte de C (Tabela 9).

O segundo comportamento é visualizado no cultivo com ácido glutâmico, com pico de crescimento inicial forte, sendo o único a atingir

concentrações celulares na faixa de 10^9 UFC/mL, porém, seguido por baixa manutenção, gerando descréscimo na concentração celular e não sendo detectável após 15 dias de cultivo (Tabela 9). Em *A. brasilense*, o uso de ácido glutâmico pode resultar em rápidos crescimentos celulares, pois se trata de uma fonte de C e N, todavia, a geração de energia é muito baixa, logo se tornando escassa. Segundo Lehninger (2004), o ácido glutâmico pode ser metabolizado por vias de degradação de aminoácidos para uso do grupo amina, dependendo da concentração de N presente e, também, pode ser utilizado para a síntese de proteína e ácido nucleico, esse último pelo ciclo de Krebs. Hartmann (1989) descreve o uso de ácido glutâmico por *A. brasilense* como muito baixo, a ponto de a concentração de N presente na molécula não inibir a atividade da enzima nitrogenase, mesmo em altas concentrações.

O terceiro comportamento apresentado foi constatado pelo uso das fontes de C ácido málico e ácido maleico, resultando em crescimento celular de *A. brasilense* com concentração celular de 10^8 UFC/mL e, também, manutenção celular durante os 39 dias de ensaio (Tabela 9). Já foi reportado na literatura que espécies de *Azospirillum* são favorecidas pelo ácido málico, resultando em altas concentrações celulares (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Apesar do bom desempenho dos ácidos málico e maleico, o custo elevado do ácido maleico, em relação ao ácido málico, torna-o inviável para a produção de inoculante comercial.

O cultivo com sacarose demonstrou potencial de manutenção celular de *A. brasilense*, resultando em concentração celular máxima de $6,99 \times 10^8$ UFC/mL no primeiro dia de ensaio e manutenção celular detectável durante os 39 dias, embora com decréscimo de UFC/mL a partir do décimo dia (Tabela 9). Todavia, segundo Döbereiner e Pedrosa (1987), o uso de sacarose no cultivo de *A. brasilense* pode acarretar em baixas taxas de crescimento, pela dificuldade da espécie em metabolizar tal fonte de carbono. Hartmann e Baldani (2006) também descrevem como inadequado o uso de sacarose para o cultivo de *A. brasilense*. Não obstante, Yasuriyan et al. (1996) descrevem o uso de solução açucarada para aumento da sobrevivência de rizóbios nas sementes por aderência podendo, então, estar relacionado à proteção celular de *A. brasilense* e não ao consumo como fonte de carbono.

No tratamento que utilizou manitol como fonte de C no cultivo de *A. brasilense*, houve crescimento durante todo o ensaio, com valor máximo de $5,88 \times 10^8$ UFC/mL no segundo dia de cultivo, terminando com $1,37 \times 10^7$ UFC/mL no 39º dia. A presença da enzima manitol desidrogenase em *A. brasilense* reforça os resultados para o cultivo com manitol, uma vez que essa enzima cataliza a transformação de manitol em frutose, seguindo-se a metabolização a frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato, podendo ser utilizado na glicólise, uma vez que não possui a via das pentoses fosfato (WESTBY et al., 1983).

O meio de cultura com glicerol proporcionou ao cultivo de *A. brasilense* crescimento celular com valor máximo de $8,66 \times 10^8$ UFC/mL no primeiro dia, porém, não desenvolveu crescimento celular suficiente ao longo do tempo para permitir boa manutenção celular nesse ensaio, resultando em concentração celular não detectável a partir do décimo dia (Tabela 9). De acordo com Silva (2006), a entrada do glicerol na célula bacteriana ocorre por difusão facilitada, sendo um mecanismo universal de transporte do glicerol por microrganismos. Westby; Cutshall; Vigil (1983) verificaram a metabolização de glicerol por *Azospirillum* pela via glicolítica, após a transformação em gliceraldeído-3-fosfato. Entretanto, esta fonte de C não se mostrou efetiva para as estirpes de *A. brasilense* deste estudo.

O extrato de levedura proporcionou bom crescimento e manutenção celular às células de *A. brasilense*, com concentração máxima de $6,88 \times 10^8$ UFC/mL no primeiro dia e valores detectáveis durante os 39 dias de ensaio. Esses resultados descrevem a importância do uso deste composto em formulações de inoculantes, pois, mesmo em concentrações cerca de 16x menores que as fontes de C utilizadas, resultaram em bom crescimento celular, em comparação com as melhores fontes de C avaliadas.

Tabela 9 – Concentração celular (UFC/mL) de *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em meio de cultura com diferentes fontes de carbono durante 39 dias de cultivo em agitador orbital a 120 rpm e 29 °C.

Dias	Fontes de Carbono								
	Controle	E.L.	Sacarose	Glicerol	Manitol	Ácido glutâmico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido maleico
1	3,99 x10 ⁷	6,88 x10 ⁸	6,99 x10 ⁸	8,66 x10 ⁸	5,33 x10 ⁸	1,63 x10 ⁹	6,55 x10 ⁸	5,11 x10 ⁸	6,44 x10 ⁸
2	5,30 x10 ⁷	4,55 x10 ⁸	4,10 x10 ⁸	1,11 x10 ⁸	5,88 x10 ⁸	1,58 x10 ⁹	5,66 x10 ⁸	1,48 x10 ⁸	6,11 x10 ⁸
3	7,88 x10 ⁷	4,10 x10 ⁸	3,33 x10 ⁸	9,98 x10 ⁷	4,21 x10 ⁸	1,70 x10 ⁹	2,77 x10 ⁸	1,07 x10 ⁸	5,11 x10 ⁸
6	2,22 x10 ⁷	2,44 x10 ⁸	1,18 x10 ⁸	6,75 x10 ⁷	4,22 x10 ⁸	7,66 x10 ⁸	1,41 x10 ⁸	4,85 x10 ⁶	4,33 x10 ⁸
7	6,55 x10 ⁶	2,99 x10 ⁸	1,02 x10 ⁸	7,76 x10 ⁷	1,65 x10 ⁸	9,86 x10 ⁸	9,75 x10 ⁷	-	4,77 x10 ⁸
9	-	4,77 x10 ⁷	1,01 x10 ⁸	6,66 x10 ⁶	3,79 x10 ⁷	5,12 x10 ⁷	8,21 x10 ⁷	-	2,33 x10 ⁸
10	-	4,77 x10 ⁷	9,39 x10 ⁷	-	4,21 x10 ⁷	8,55 x10 ⁷	5,69 x10 ⁷	-	2,99 x10 ⁸
13	-	2,77 x10 ⁷	9,63 x10 ⁷	-	2,77 x10 ⁷	4,44 x10 ⁶	3,33 x10 ⁸	-	1,55 x10 ⁸
14	-	3,77 x10 ⁷	7,70 x10 ⁷	-	1,95 x10 ⁷	5,66 x10 ⁶	8,43 x10 ⁷	-	1,36 x10 ⁸
15	-	3,22 x10 ⁷	9,98 x10 ⁷	-	2,44 x10 ⁷	4,44 x10 ⁶	1,01 x10 ⁸	-	1,65 x10 ⁸
18	-	5,00 x10 ⁷	1,07 x10 ⁸	-	1,44 x10 ⁷	-	4,55 x10 ⁷	-	1,39 x10 ⁸
21	-	2,77 x10 ⁷	6,66 x10 ⁷	-	1,77 x10 ⁷	-	9,21 x10 ⁷	-	4,44 x10 ⁷
22	-	3,33 x10 ⁷	8,44 x10 ⁷	-	2,99 x10 ⁷	-	1,03 x10 ⁸	-	1,04 x10 ⁸
23	-	3,11 x10 ⁷	9,63 x10 ⁷	-	2,66 x10 ⁷	-	9,10 x10 ⁷	-	1,05 x10 ⁸
27	-	2,33 x10 ⁷	4,77 x10 ⁷	-	1,77 x10 ⁷	-	7,22 x10 ⁷	-	4,88 x10 ⁷
28	-	1,99 x10 ⁷	5,88 x10 ⁷	-	2,77 x10 ⁷	-	3,77 x10 ⁷	-	6,66 x10 ⁷
30	-	2,22 x10 ⁷	4,66 x10 ⁷	-	2,66 x10 ⁷	-	5,22 x10 ⁷	-	3,88 x10 ⁷
31	-	3,22 x10 ⁷	5,44 x10 ⁷	-	1,77 x10 ⁷	-	6,66 x10 ⁷	-	4,22 x10 ⁷
34	-	2,88 x10 ⁷	4,55 x10 ⁷	-	1,66 x10 ⁷	-	6,11 x10 ⁷	-	6,55 x10 ⁷
39	-	2,22 x10 ⁷	3,66 x10 ⁷	-	1,37 x10 ⁷	-	3,66 x10 ⁷	-	3,01 x10 ⁷

Fonte: O próprio autor. Inóculo inicial (tempo zero) ajustado em, aproximadamente, 1 x10⁷ UFC/mL. O tratamento controle não possui fonte de carbono. E.L., extrato de levedura. Cada valor representa a média de triplicatas e cada triplicata é resultante de triplicatas técnicas. Resultados abaixo do limite de detecção de 1,0E+06 UFC/mL.

Westby et al. (1987) descrevem, através de resultados enzimáticos, que a principal via de metabolismo de C para *A. brasilense* é a EntnerDoudoroff (ED). A ausência das enzimas fosfogluconato desidrogenase e gluconato 2-desidrogenase enfatiza a importância da via ED e o uso preferencial de ácidos orgânicos. Todavia, os autores detectaram as enzimas frutose-bisfosfato aldolase, frutose bisfosfatase e glicose-fosfato isomerase, validando a existência da rota Embden-Meyerhof-Parnas. Todas as enzimas da via triosefosfato de Embden-Meyerhof-Parnas também foram detectadas em quantidades substanciais em *A. brasilense*, porém, segundo os autores, essas enzimas são utilizadas de forma anabólica quando malato ou lactato estão disponíveis como única fonte de C.

Concomitantemente com as avaliações de crescimento celular, os valores de pH foram mensurados (Tabela 10). Ao decorrer do ensaio, a variação de pH, que inicialmente foi ajustado em 6,8, indicou alcalinização em todos os tratamentos. Os valores dos ácidos orgânicos, da sacarose e do extrato de levedura ultrapassaram o de pH 8, com valor de pH de 8,91 no 23º dia no cultivo com ácido maleico, que também resultou no maior pH ao final do ensaio, 8,77. Esses incrementos de pH podem ter ocorrido devido à presença de compostos resultantes do metabolismo e liberação de material intracelular durante a lise de células e/ou formação de subprodutos provenientes do consumo de polihidroxibutirato quando as fontes primárias se tornaram escassas (PHB) (TRUJILLO-ROLDÁN ET AL. 2013).

O tratamento controle, no qual não foi observado crescimento celular, apresentou pequena alcalinização, finalizando em pH 7,62 no fim do ensaio os tratamentos com ácido cítrico e glicerol, que permitiram crescimento celular, mas não a manutenção por mais de seis e nove dias, respectivamente. Apresentaram, também, acréscimo nos valores de pH, finalizando o ensaio com pH 7,03 no cultivo com glicerol e 8,24 no cultivo com ácido cítrico. Esses resultados não permitem relacionar o aumento de pH basicamente com a metabolização da fonte de C, uma vez que o tratamento controle não continha fonte de C. Há relatos na literatura que a alcalinização do cultivo por *A. brasilense* é decorrente dos compostos advindos da lise celular, bem como metabólitos secundários produzidos durante a metabolização das fontes de carbono, e que a adição de glicerol ao meio de cultivo com *A. brasilense* evita essa alteração do pH (CHRISTIANSEN-WENIGER; VAN VEEN,

1991). Essa característica apresentada pelo glicerol destaca a possibilidade de utilização como protetor celular em formulações contendo *A. brasilense*.

Tabela 10 – Valores de pH nos meios de cultivo de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 com diferentes fontes de carbono durante 39 dias em agitador orbital a 120 rpm e 29 °C.

Dias	Controle	E.L.	Sacarose	Glicerol	Manitol	Ácido Glutâmico	Ácido Málico	Ácido Cítrico	Ácido Maleico
1	7,08	7,08	7,39	7,06	7,13	7,30	7,49	7,52	7,29
2	7,15	7,12	7,62	6,99	7,24	7,47	7,92	7,83	7,45
3	7,38	7,48	7,70	6,87	7,14	7,36	7,80	7,91	7,51
6	7,58	7,35	7,77	7,31	7,50	7,67	8,01	8,40	7,85
9	7,56	7,89	8,07	7,38	7,83	8,06	8,24	8,34	7,79
10	7,52	7,56	7,77	7,05	7,63	8,28	8,33	8,17	8,16
13	7,54	7,68	8,11	7,09	7,85	8,56	8,36	8,41	8,40
15	7,60	7,36	7,94	6,99	7,35	8,48	8,29	8,25	8,22
27	7,58	8,04	8,36	7,02	8,10	8,52	8,30	8,32	8,59
28	7,65	8,14	8,40	6,97	8,20	8,55	8,47	8,45	8,91
31	7,58	8,19	8,38	7,01	8,19	8,55	8,53	8,44	8,93
34	7,63	8,05	8,39	7,01	8,17	8,54	8,38	8,46	8,79
39	7,62	7,83	8,37	7,03	8,19	8,55	8,53	8,42	8,77

Fonte: O próprio autor. pH inicial (tempo zero) ajustado em 6,8. O tratamento controle não possui fonte de carbono. E.L., extrato de levedura. Cada valor representa a média de triplicatas e cada triplicata é resultante de triplicatas técnicas.

Considerando as concentrações celulares, pH e os preços de cada reagente, pode-se concluir que as fontes de C com potencial de multiplicação celular de *A. brasilense* para o desenvolvimento de formulação de um coinoculante são as que contêm extrato de levedura, manitol e ácido málico. Embora a literatura descreva como inviável a utilização da sacarose como fonte de C, os valores apresentados neste ensaio direcionam a utilização dessa fonte de carbono para o desenvolvimento de formulações de coinoculante.

5.1.2 Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e 5080

A principal via de catabolismo de C de *Bradyrhizobium* é a E.D. e em culturas laboratoriais, o ciclo do ácido cítrico funciona completamente, descrevendo a capacidade de catabolizar diferentes fontes de C, como glicose, galactose, glicerol, frutose, arabinose, manitol, succinato, malato, xilitol, lactose, ramnose e gluconato, conferindo às bactérias vantagem competitiva para a formação de nódulos (POOLE, 2008; PRADELLA; OLIVEIRA; URENHA, 2001; VINCENT, 1977). A metabolização de manitol é semelhante em microrganismos de crescimento lento e rápido

(PARKER, 1971), sugerindo a presença da enzima manitol desidrogenase, também presente em *A. brasilense*.

Na avaliação do potencial das fontes de C para o crescimento celular de *Bradyrhizobium* spp., os tratamentos controle, ácido málico, ácido cítrico e ácido maleico indicaram baixo ou nenhum crescimento celular (Tabela 11). Quanto à manutenção celular, no tratamento controle não foi detectável após o 9º dia de análise, seguido por ácido málico (13º dia), ácido cítrico e ácido maleico ambos no 20º dia.

O cultivo de *Bradyrhizobium* spp. com ácido glutâmico apresentou melhor crescimento celular no 13º dia, com valor de $1,38 \times 10^9$ UFC/mL, decaindo até o 34º dia, quando não foi mais detectável (Tabela 11). Assim como em *A. brasilense*, a metabolização desse composto pode ser realizada em vias de degradação de aminoácidos, para síntese de proteína e ácido nucleico. A capacidade desse composto ser metabolizado como fonte de N e C permite grande e rápido ganho energético à célula bacteriana, mas de curta duração, o que leva a descartar sua utilização em formulações que têm como um dos objetivos principais a manutenção celular por longos períodos de tempo.

Nas vias de catabolismo de C em estirpes de *Bradyrhizobium*, não estão presentes as enzimas invertase, que catalisa a hidrólise da sacarose em frutose e glicose e 6-fosfogluconato desidrogenase, enzima essa da fase oxidativa da via das pentoses, não permitindo às células de *Bradyrhizobium* spp. metabolizar sacarose, ramnose e trealose, tornando inadequado o uso da sacarose como fonte primária de C (VINCENT, 1977; MARTINEZ-DRETS ET AL., 1972). Entretanto, o cultivo com sacarose no presente trabalho permitiu alta concentração celular durante os 60 dias, descrevendo o segundo melhor resultado para manutenção celular. O máximo crescimento foi observado no 13º dia, com valor de $3,33 \times 10^9$ UFC/mL e terminou o ensaio com $5,99 \times 10^9$ UFC/mL (Tabela 11). Uma hipótese para esses resultados é a possível hidrólise da sacarose por meio de íons hidrônio (H^+) derivados da dissociação da própria molécula em altas temperaturas, uma vez que foi realizada a autoclavagem do cultivo a 121 °C. Outro fator que pode ter gerado íons hidrônio é a produção de metabólitos secundários e ácidos advindos do crescimento celular durante a metabolização do extrato de levedura.

Os estudos apresentados por Yasuriyan et al. (1996) sobre o uso de solução açucarada para aumento da sobrevivência de rizóbios nas sementes não seriam aplicáveis, pois, ao contrário de *A. brasilense*, o cultivo de *Bradyrhizobium* spp. resultou em aumento dos valores de concentrações celulares, descrevendo, portanto, crescimento celular e não apenas manutenção.

O cultivo com extrato de levedura proporcionou às células de *Bradyrhizobium* spp. manutenção celular oscilante, com variação na concentração celular entre $9,10 \times 10^8$ e $2,44 \times 10^8$ UFC/mL, durante os 60 dias do ensaio (Tabela 11). Essa variação de concentração pode ter origem na homogeneização e/ou alíquotagem das amostras, não sendo possível assegurar se houve de fato, aumento de concentração celular em decorrência da metabolização do extrato de levedura; todavia, a manutenção celular de *Bradyrhizobium* spp. com o extrato de levedura viabiliza a sua utilização em formulações. Esse composto é uma fonte complexa e variável que pode diferir de composição de acordo com a marca utilizada e, por se tratar de uma fonte importante de vitaminas e micronutrientes para o crescimento microbiano, a concentração utilizada pode favorecer a produção celular ou até inibir o crescimento, produzindo células deformadas e com baixa viabilidade (DATE, 1976).

O cultivo com manitol, logo no primeiro dia de avaliação, resultou em concentração celular de $1,02 \times 10^9$ UFC/mL e foi a única fonte de C capaz de manter a concentração superior a 10^9 UFC/mL durante os 60 dias de ensaio, resultando também na maior concentração, chegando a $1,19 \times 10^9$ UFC/mL no fim do ensaio, (Tabela 11). Em trabalho utilizando o meio de cultura YM, Fernandes e Júnior et al. (2009) obtiveram concentrações celulares na faixa de 10^9 UFC/mL no cultivo de *Bradyrhizobium* BR3267 a 28 °C. Kremer e Peterson (1983), utilizando o meio YM em cultivo de *Rhizobium* CB756 a 25 °C e Balatti (1992) cultivando *B. japonicum* estirpe E109 em meio contendo 10 g/L de manitol também atingiram concentrações celulares na faixa 10^9 UFC/mL. Essa fonte de C é comumente utilizada em meios de cultivo complexos para o crescimento de *Bradyrhizobium*, como o meio YMA (Anexo 1) utilizado para a avaliação de UFC/mL neste presente trabalho.

O glicerol, por sua vez, manteve concentrações celulares superiores a 1×10^9 UFC/mL até o 27° dia, decaindo até o 44° dia, não sendo mais detectável

após essa avaliação (Tabela 11). Os estudos com glicerol em cultivo de rizóbios de crescimento lento descrevem altas concentrações e boa metabolização deste reagente. Lopreto et al. (1972), por exemplo, demonstraram ótimos resultados de crescimento celular de *B. japonicum* em cultivos utilizando apenas glicerol, Balatti (1992) cultivou *B. japonicum* estirpe E109 em meios distintos contendo 10 g/L de manitol e 10 g/L de glicerol e obteve 10^{10} UFC/mL após 60 h de cultivo com glicerol, enquanto que, com manitol, obteve apenas 10^9 UFC/mL. Temprano et al. (2000) conseguiram 10^9 UFC/mL de *Bradyrhizobium* quando utilizaram 12 g/L de glicerol em cultivo contendo 1 g/L de extrato de levedura.

Tabela 11 – Concentração celular (UFC/mL) de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com diferentes fontes de carbono durante 60 dias de cultivo em agitador orbital a 120 rpm e 29 °C.

Dias	Fontes de Carbono								
	Sem C (Controle)	Extrato de levedura	Sacarose	Glicerol	Manitol	Ácido glutâmico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido maleico
2	1,21x10 ⁸	6,44x10 ⁸	7,66x10 ⁸	7,88x10 ⁸	1,02x10 ⁹	3,22x10 ⁸	9,43x10 ⁸	1,07x10 ⁸	3,55x10 ⁸
3	3,10x10 ⁸	9,10x10 ⁸	1,69x10 ⁹	1,04x10 ⁹	9,29x10 ⁸	1,99x10 ⁸	4,22x10 ⁸	1,66x10 ⁸	8,75x10 ⁷
4	1,01x10 ⁸	3,22x10 ⁸	1,78x10 ⁹	1,41x10 ⁹	1,27x10 ⁹	4,22x10 ⁸	3,55x10 ⁸	1,11x10 ⁸	8,77x10 ⁷
5	1,13x10 ⁸	9,32x10 ⁸	2,44x10 ⁹	1,18x10 ⁹	1,22x10 ⁹	3,88x10 ⁸	4,55x10 ⁸	9,64x10 ⁷	6,66x10 ⁷
6	1,03x10 ⁸	6,88x10 ⁸	1,78x10 ⁹	1,01x10 ⁹	1,08x10 ⁹	5,44x10 ⁸	3,66x10 ⁸	7,33x10 ⁷	5,11x10 ⁷
7	1,95x10 ⁸	4,77x10 ⁸	1,81x10 ⁹	1,08x10 ⁹	9,74x10 ⁸	5,33x10 ⁸	3,33x10 ⁸	7,88x10 ⁷	3,77x10 ⁷
9	3,12x10 ⁷	5,27x10 ⁸	1,71x10 ⁹	1,05x10 ⁹	1,03x10 ⁹	8,09x10 ⁸	3,04x10 ⁸	6,58x10 ⁷	2,89x10 ⁷
10	-	7,10x10 ⁸	1,77x10 ⁹	1,33x10 ⁹	1,08x10 ⁹	1,06x10 ⁹	2,77x10 ⁸	6,22x10 ⁷	2,11x10 ⁷
11	-	8,76x10 ⁸	2,10x10 ⁹	1,53x10 ⁹	1,76x10 ⁹	1,38x10 ⁹	1,55x10 ⁸	5,66x10 ⁷	2,22x10 ⁷
12	-	7,44x10 ⁸	2,01x10 ⁹	1,18x10 ⁹	1,03x10 ⁹	1,17x10 ⁹	4,55x10 ⁷	5,55x10 ⁷	1,99x10 ⁷
13	-	7,77x10 ⁸	3,33x10 ⁹	1,27x10 ⁹	1,03x10 ⁹	1,08x10 ⁹	2,55x10 ⁷	3,32x10 ⁷	1,22x10 ⁷
20	-	4,77x10 ⁸	2,44x10 ⁹	1,29x10 ⁸	8,77x10 ⁸	2,66x10 ⁸	-	9,98x10 ⁶	3,44x10 ⁶
23	-	6,88x10 ⁸	2,04x10 ⁹	1,36x10 ⁹	1,07x10 ⁹	1,20x10 ⁸	-	-	-
25	-	5,55x10 ⁸	1,54x10 ⁹	1,25x10 ⁹	1,18x10 ⁹	6,22x10 ⁷	-	-	-
27	-	6,11x10 ⁸	1,41x10 ⁹	1,14x10 ⁹	1,11x10 ⁹	2,99x10 ⁷	-	-	-
34	-	3,33x10 ⁸	1,26x10 ⁹	5,88x10 ⁸	8,55x10 ⁸	4,44x10 ⁶	-	-	-
41	-	4,55x10 ⁸	1,07x10 ⁹	3,99x10 ⁷	1,45x10 ⁹	-	-	-	-
44	-	3,88x10 ⁸	5,77x10 ⁸	5,44x10 ⁶	1,12x10 ⁹	-	-	-	-
53	-	3,10x10 ⁸	9,42x10 ⁸	-	1,33x10 ⁹	-	-	-	-
60	-	2,44x10 ⁸	5,99x10 ⁸	-	1,19x10 ⁹	-	-	-	-

Fonte: O próprio autor. Inóculo inicial (tempo zero) ajustado em, aproximadamente, 1 x10⁸UFC/mL.Cada valor representa a média de triplicatas e cada triplicata é resultante de triplicatas técnicas. (-) Resultados abaixo do limite de detecção de 1,0 x10⁶ UFC/mL.

Comparando as concentrações celulares (Tabela 11) com os valores de pH (Tabela 12), é possível verificar a tendência de alcalinização dos meios de cultivo à base de ácidos orgânicos. Esse efeito pode ser notado de forma inversa no cultivo à base de glicerol, no qual durante a metabolização, o pH inicial de 6,8 decresceu até atingir 4,85 (Tabela 12) e $5,44 \times 10^6$ UFC/mL no 44° dia de armazenamento (Tabela 11). Segundo Pirt (1975), uma pequena variação de pH já pode resultar em alterações celulares drásticas. Em trabalhos desenvolvidos por Vincent (1977), é descrito que estirpes de *Bradyrhizobium* obtêm bom crescimento em ambientes com pH variando entre 5,5 e 7,5. Além de afetar o crescimento por desequilíbrio citoplasmático em relação ao meio, várias outras etapas da nodulação podem ser afetadas pela acidez, como exemplo, segundo Hungria e Vargas (2000) e Hungria e Stacey (1997), a acidez do solo pode interferir na fase de exsudação de flavonoides pela leguminosa e síntese dos fatores *nod*, etapa mais sensível da nodulação.

Os demais tratamentos, controle, extrato de levedura, sacarose e manitol apresentaram menor variação de pH, alcalinizando o meio de cultura, com o maior valor, de 7,48, sendo obtido com o extrato de levedura (Tabela 12). Esses valores corroboram que, para os tratamentos com manutenção do pH, foi possível manter boas concentrações celulares nos meios de cultivo.

Tabela 12 – Valores de pH nos meios de cultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com diferentes fontes de carbono durante 60 dias sem agitador orbital a 120 rpm e 29 °C.

Dias	Fontes de Carbono								
	Sem C (Controle)	Extrato de levedura	Sacarose	Glicerol	Manitol	Ácido glutâmico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido maleico
3	6,66	6,65	6,49	6,44	6,69	7,05	7,83	7,95	7,79
5	6,62	6,68	6,53	6,21	6,56	7,16	8,08	7,97	7,99
7	6,94	7,16	6,75	6,49	6,68	7,18	8,21	8,32	8,39
10	6,97	7,02	6,63	6,31	6,70	7,37	8,41	8,39	8,20
12	7,00	7,05	6,73	6,26	6,69	7,82	8,65	8,61	8,41
20	7,02	6,84	6,73	5,72	6,56	8,03	9,09	8,87	8,72
23	6,99	7,06	6,69	5,84	6,62	8,09	9,15	8,93	8,86
34	7,03	7,15	6,82	4,57	6,50	8,17	9,27	9,02	8,90
44	7,02	7,54	7,05	4,85	6,77	8,20	9,32	9,07	8,97
53	7,01	7,48	7,04	4,78	7,08	8,19	9,35	9,12	9,05
60	7,03	7,48	7,13	4,78	6,92	8,27	9,42	9,21	9,13

Fonte: O próprio autor. pH inicial (tempo zero) ajustado em 6,86. Cada valor representa a média de triplicatas e cada triplicata é resultante de triplicatas técnicas

Os dados de densidade óptica (D.O.) relativos ao cultivo de *Bradyrhizobium* spp. com diferentes fontes de C (Tabela 13) não apresentaram boa correlação com as concentrações celulares (Tabela 11). Os cultivos à base de extrato de levedura e sacarose não atingiram valores altos de D.O., porém, as concentrações celulares foram elevadas. Os maiores valores de D.O. alcançados foram dos cultivos à base de glicerol e manitol, os quais também atingiram valores elevados de concentração celular e acidificação do meio. Miguel e Moreira (2001), por exemplo, obtiveram maiores concentrações celulares de *B. japonicum*, produção de EPS e D.O. em cultivos com pH 6,0. Dilworth et al. (1999) descrevem um fenômeno denominado “acid habituation”, onde cultivos em ambiente ácido ativam a síntese de várias proteínas, principalmente da membrana externa e de produção de exopolissacarídeos (EPS), onde o controle do pH citoplasmático proporcionaria resistência à perda de nutrientes necessários à manutenção destes sistemas. Segundo Rinaudi e Giordano (2010), o EPS participa da sinalização molecular no processo de simbiose com plantas, nos mecanismos de “quorum sensing” e na formação de biofilme.

Analisando os dados do cultivo com manitol, verifica-se um rápido aumento da D.O. (Tabela 13), mantendo-se constante durante os 60 dias do ensaio. Os valores obtidos pelo cultivo com glicerol atingiram o pico de 0,24 no 11º dia, seguido de forte decréscimo, chegando a 0,04 no final do ensaio, valor inferior ao tratamento controle.

Tabela 13 – Valores de densidade óptica (D.O.) no cultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 com diferentes fontes de carbono durante 60 dia sem agitador orbital a 120 rpm e 29 °C.

Dias	Fontes de Carbono								
	Sem C (Controle)	Extrato de levedura	Sacarose	Glicerol	Manitol	Ácido glutâmico	Ácido málico	Ácido cítrico	Ácido maleico
2	0,01	0,05	0,09	0,11	0,09	1,3	0,10	0,04	0,05
3	0,04	0,10	0,13	0,15	0,12	0,20	0,12	0,04	0,06
4	0,04	0,10	0,12	0,18	0,17	0,22	0,12	0,04	0,06
5	0,05	0,08	0,11	0,18	0,16	0,18	0,12	0,04	0,07
6	0,05	0,07	0,10	0,20	0,18	0,20	0,12	0,04	0,06
7	0,05	0,07	0,09	0,22	0,19	0,18	0,13	0,04	0,05
9	0,05	0,06	0,09	0,23	0,21	0,19	0,11	0,04	0,05
10	0,05	0,06	0,09	0,23	0,22	0,20	0,11	0,04	0,05
11	0,07	0,06	0,09	0,24	0,24	0,21	0,11	0,04	0,05
12	0,05	0,06	0,08	0,23	0,22	0,20	0,09	0,04	0,05
13	0,05	0,06	0,08	0,23	0,22	0,20	0,07	0,03	0,04
20	0,05	0,05	0,07	0,20	0,26	0,19	0,05	0,02	0,03
23	0,05	0,06	0,08	0,19	0,28	0,18	0,05	0,03	0,03
25	0,04	0,05	0,07	0,18	0,27	0,18	0,06	0,02	0,03
27	0,03	0,05	0,07	0,16	0,25	0,17	0,05	0,02	0,03
34	0,05	0,05	0,06	0,09	0,25	0,16	0,05	0,02	0,03
41	0,05	0,04	0,07	0,06	0,27	0,16	0,05	0,02	0,03
53	0,05	0,05	0,07	0,04	0,25	0,19	0,08	0,02	0,02
60	0,05	0,04	0,06	0,04	0,24	0,17	0,06	0,02	0,03

Fonte: O próprio autor. Cada valor representa a média de triplicatas e cada triplicata é resultante de triplicatas técnicas.

Os resultados de D.O. (Tabela 13) podem ser explicados não apenas pelo crescimento celular, mas também pela produção de PHB e EPS durante a metabolização das fontes de C. O PHB é um tipo de polihidroxicanoato (PHA) que acumula dentro das células de vários microrganismos como uma substância armazenadora de energia sob condições de estresse, como limitação de

oxigênio e privação de nutrientes (ANDERSON: DAWES, 1990). O EPS é uma molécula extracelular, produzida em ambientes com disponibilidade de N e tipos de fonte de C específicas, sendo importante para proteção celular, evitando desidratação precoce; também pode afetar a eficiência bacteriana nos processos de infecção e nodulação (DJORDJEVIC et al., 1987).

Os tratamentos que continham ácido cítrico e ácido maleico resultaram em baixo crescimento e capacidade de manutenção celular (Tabela 11), e ambos também não resultaram em valores de D.O. superiores a 0,04 (ácido cítrico) e 0,07 (ácido maleico) (Tabela 13). Os valores de pH (Tabela 12), porém, foram os mais elevados dentre os tratamentos, levando a crer que essas fontes de carbono forneceram energia para manter uma concentração celular detectável por não mais que 20 dias, e não produziram metabólitos secundários para promover proteção suficiente para sobrevivência em cultivo com alcalinização crescente do meio, descartando a possibilidade de uso destas fontes de carbono para produção de formulações de coinoculantes comerciais.

Em relação aos demais ácidos orgânicos, o ácido glutâmico atingiu o menor valor de pH, 8,27 no último dia do ensaio, e também, o maior valor de D.O., 0,22 no quarto dia de cultivo. Nampoothiri et al. (2003) descrevem a relação C/N do meio de cultura para produção de goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis*, como um parâmetro importante na produção desses biopolímeros, pois na maioria das vezes a síntese dos EPSs por um microrganismo é favorecida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja o C ou outra fonte de energia. Segundo Nitschke, Rodrigues; Schinatto (2001), meios contendo elevada relação C/N favorecem o acúmulo desse polímero em duas fases distintas: na fase de crescimento, quando é requerida maior concentração de N para o crescimento celular; e na fase de produção, quando é necessária maior concentração de C, visando o acúmulo de produto.

As melhores opções para o desenvolvimento da formulação de coinoculantes foram glicerol, com máxima concentração celular de $1,46 \times 10^9$ UFC/mL e manitol, com concentração máxima de $1,76 \times 10^9$ UFC/mL, menor variação de pH final e maior D.O., de 0,28 ao 23º dia.

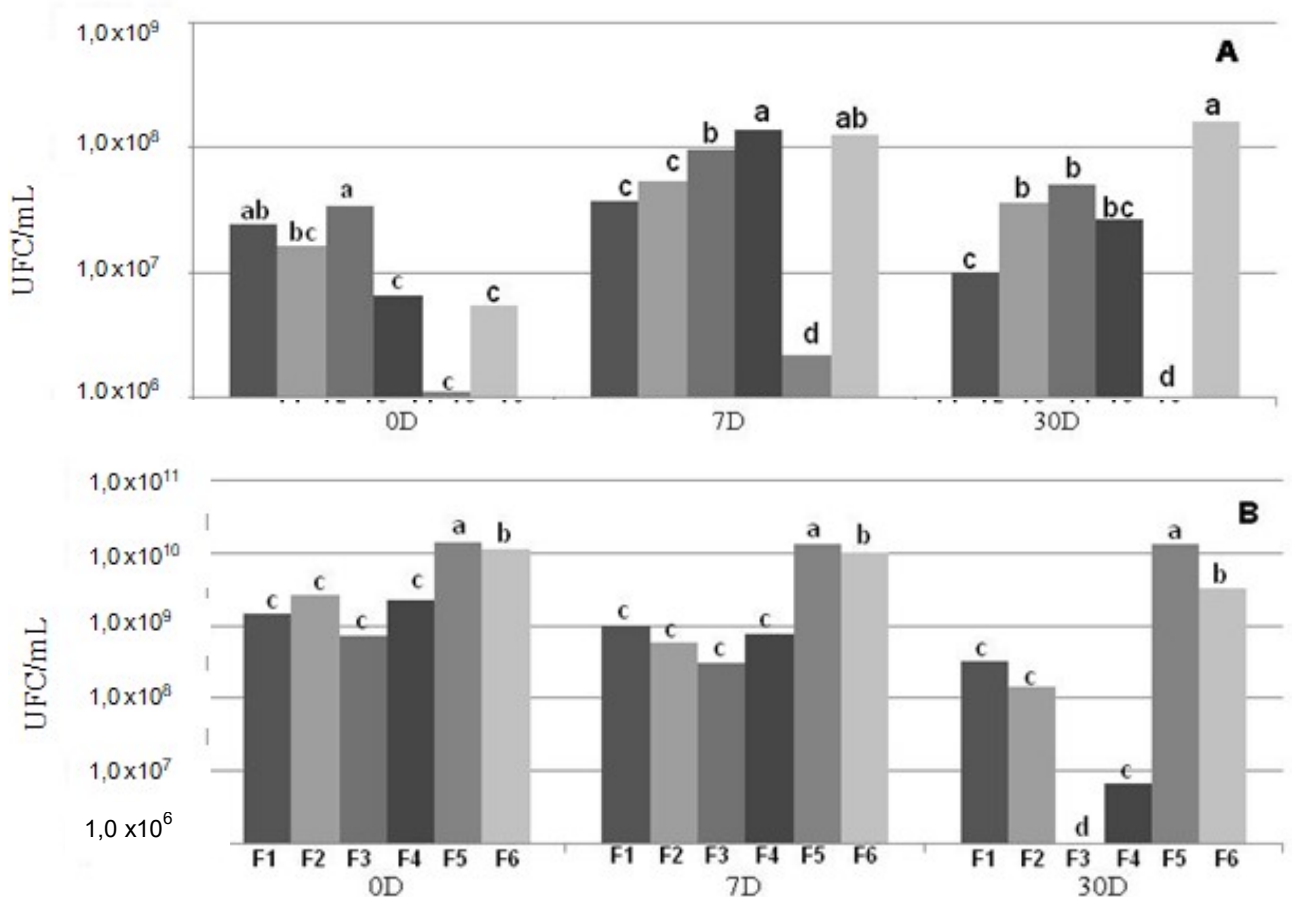
5.2 Desenvolvimento das formulações

5.2.1 Crescimento celular das formulações de cocultivo sem a adição de protetores

Utilizando as fontes de C selecionadas nos ensaios descritos nos itens 5.1.1 e 5.1.2 foram desenvolvidas cinco formulações (Tabela 2) candidatas à produção de coinoculante e um tratamento controle composto da fusão dos meios de cultivos estabelecidos RC e YM (Anexo 1).

As concentrações de *A. brasilense* (Figura 1A) resultantes no final do cocultivo e início do armazenamento (zero dia) foram inferiores a 10^8 UFC/mL, sendo a mais elevada, de $3,44 \times 10^7$ UFC/mL, obtida com a F3, enquanto que a menor, de $1,1 \times 10^6$ UFC/mL, na F5. Aos sete dias de armazenamento, com exceção da F5, as formulações foram propícias ao crescimento de *A. brasilense*, com destaque para a F4, que possibilitou um incremento de $6,67 \times 10^6$ para $1,40 \times 10^8$ UFC/mL, e a F6, com crescimento celular alcançando $1,29 \times 10^8$ UFC/mL de *A. brasilense*. No final do ensaio, aos 30 dias de armazenamento, apenas a F6 não resultou em decréscimo na concentração celular, mantendo valores superiores a 10^8 UFC/mL. No mesmo período, ocorreu mortalidade celular elevada de *A. brasilense* na formulação F5 (Figura 1A).

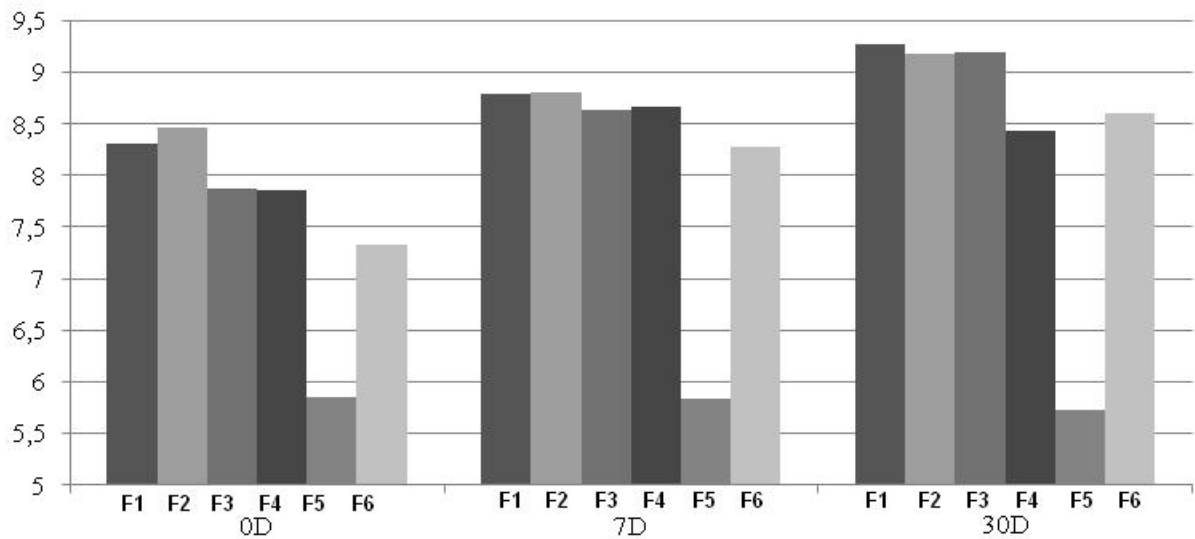
Figura 1 – Concentração celular (UFC/mL) de (A) *Azospirillum* e (B) *Bradyrhizobium* ao fim do cocultivo (zero dia, 0D), aos sete dias (7D) e 30 dias (30D) de armazenamento nas formulações (F1 a F6) de coinoculante contendo *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 sem protetor celular. As letras comparam as médias de três repetições entre as formulações, dentro de cada tempo, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Os resultados de crescimento celular no período final de cultivo e início do armazenamento para *Bradyrhizobium* spp. foram superiores a 10^9 , exceto na formulação F3, que atingiu concentração celular de $7,30 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 1B). As formulações F5 e F6 resultaram em concentrações significativamente superiores aos demais tratamentos, da ordem de 10^{10} UFC/mL. Aos sete dias de armazenamento, as formulações F5 e F6 mantiveram superioridade de concentração, com pequenos decréscimos, enquanto que as demais formulações resultaram em mortalidade celular, resultando em concentrações inferiores a 10^9 . As formulações F5 e F6 possibilitaram concentrações celulares superiores a $1,0 \times 10^{10}$ e $1,0 \times 10^9$ durante os 30 dias, respectivamente. Nas demais formulações, as concentrações decaíram durante o armazenamento, atingindo $6,67 \times 10^6$ em F4 e valores inferiores a 10^6 em F3 (Figura 1B).

Assim como nos cultivos de *A. brasilense* (Tabela 10) e *Bradyrhizobium* spp. (Tabela 12) com ácido málico, os valores de pH do cocultivo na presença de ácido málico aumentaram com o decorrer do tempo, ultrapassando a faixa de pH 9,0 nas formulações F1, F2 e F3 e pH 8,0 nas formulações F4 e F6 (Figura 2). Já na formulação F5, que utilizou sacarose e manitol, isso não ocorreu.

Figura 2 – Valores de pH ao fim do cocultivo (0D), aos sete dias (7D) e 30 dias (30D) de armazenamento das formulações (F1 a F6) de coinoculante contendo *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6, *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 sem protetor celular. Os dados representam médias de três repetições.



Todas as formulações, exceto a F1 (controle), utilizavam solução tampão fosfato (Tabela 2). De acordo com princípios químicos de solução tampão, utilizando a equação matemática (3) com pK_a de 6,86 (KH_2PO_4), a capacidade tamponante de F3 deveria ser maior, todavia, não foi capaz de diminuir a variação de pH, tal qual as demais formulações com capacidade tamponante diferente.

$$(3) \quad pH = pK_a + \log_{10} \left\{ \frac{[A^-]}{[HA]} \right\}$$

[A⁻] = concentração da base conjugada
 [HÁ] = concentração do ácido
 pK_a = constante de dissociação do ácido

Com os três resultados descritos nas Figuras 1A e 1B e 2, a única formulação capaz de manter concentrações celulares mínimas de *A. brasilense* e

Bradyrhizobium spp. foi a F6, apesar de seguir tendência de alcalinização do meio de cultivo, indicando que o fator de tamponamento pode ser aprimorado.

Para a produção de inoculantes comerciais é muito importante conhecer as propriedades dos microrganismos em foco, como condições ideais para crescimento, incluindo pH do cultivo, aeração, nutrientes metabolizados e, não menos importante, o tempo de cultivo, afim de determinar o período de crescimento celular e posterior envase. Este último parâmetro torna-se muito importante no desenvolvimento de coinoculantes à base de *B. japonicum* SEMIA 5079, *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6, pois as concentrações mínimas de células viáveis de cada espécie devem ser mantidas por, pelo menos, seis meses de prateleira, para atender à legislação brasileira; desse modo, fez-se necessário o ensaio 5.2.2.

5.2.2 Ensaio de crescimento celular em relação ao momento de inoculação de *A. brasilense*

Com objetivo de adequação dos parâmetros de produção do coinoculante a fim de conseguir atingir o ponto máximo da fase log de ambas as espécies em cocultivo, não foi considerado necessário o uso de um tratamento controle para *A. brasilense*, pois este microrganismo apresenta baixo tempo de geração, ou seja, seu crescimento é mais rápido que o de *Bradyrhizobium*. Esse fato inviabiliza a possibilidade de cultivo inicial somente com essa bactéria, com posterior inoculação de *Bradyrhizobium* spp., de crescimento lento, seguindo o cocultivo. Portanto, se inoculado em conjunto com as estirpes de *Bradyrhizobium*, ou inoculado antes com posterior inoculação de *Bradyrhizobium* spp. para realização do cocultivo, as células de *A. brasilense* poderiam ultrapassar a fase log durante o crescimento de *Bradyrhizobium* spp.e/ou utilizar excessivamente os nutrientes necessários para a manutenção celular durante o tempo de prateleira.Outro ponto importante é a concentração de *A. brasilense* que deve ser inoculada à semente, pois, diferente de *Bradyrhizobium* spp., essa espécie tem efeitos hormonais na planta que podem ser negativos em altas concentrações. Bhattacharyya e Jha (2012) descrevem os efeitos negativos advindos de altas doses de *A. brasilense*, ressaltando que BPCP podem produzir uma variedade de hormônios vegetais, em

mecanismos ainda não totalmente compreendidos, podendo inibir o crescimento das plantas em altas doses.

Hungria et al. (2013) avaliaram diferentes concentrações de *A. brasilense* em coinoculação de soja aplicadas nas sementes e no sulco de semeadura e verificaram que a produtividade diminuiu com o aumento da dose de *A. brasilense*. Para concentrações de $2,5 \times 10^8$, 5×10^8 e $7,5 \times 10^8$ UFC/mL de *A. brasilense* nas sementes foram obtidos 2.496, 2.321 e 2.217 kg/ha de soja, respectivamente. Na safra seguinte, os autores avaliaram a coinoculação com aplicação de *A. brasilense* no sulco de semeadura nas concentrações de $2,5 \times 10^8$ UFC/mL e no tratamento via sementes na concentração de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL. De acordo com os resultados obtidos, ambos os métodos de aplicação nas respectivas doses foram equivalentes em termos de rendimento de grãos. Roberto et al. (2010) estudaram as respostas da cultura do milho à aplicação de diferentes doses de *A. brasilense* via sementes e encontraram resultados de decréscimos significativos (Tukey, $p > 0,05$) para doses inferiores a 50% do recomendado pelo fabricante, que era de 120 mL/60.000 plantas.

No presente trabalho, ao terceiro dia de cultivo, o tratamento com apenas *Bradyrhizobium* spp. (controle) resultou em concentração celular significativamente maior (Tabela 14), ao final da fase log, sendo o melhor momento para o envase. Em T1, após o cocultivo com *A. brasilense* por 24 h com células de *Bradyrhizobium* spp. previamente cultivadas por dois dias, as concentrações celulares de *Bradyrhizobium* spp. foram significativamente menores que o controle, caracterizando possíveis interações entre os microrganismos. A diminuição do número de células viáveis em T2 foi ainda mais drástica, atingindo cerca de dez vezes menos do que o controle. A concentração de *Bradyrhizobium* spp. chegou a 10^9 em T3, porém, a concentração de *A. brasilense* não atingiu o valor mínimo estabelecido de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. Esses efeitos podem ocorrer por antagonismo, ou seja, competição entre as espécies por nutrientes do meio de cultivo.

Tabela 14 – Concentração celular no cocultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 em diferentes dias de ensaio em F3.

Dias do cocultivo	<i>Bradyrhizobium</i> spp. (UFC/mL)				<i>A. brasilense</i> (UFC/mL)		
	Controle	T1	T2	T3	T1	T2	T3
2	2,56x10 ⁹						
3	4,22x10 ⁹ a	1,23x10 ⁹ b			5,33x10 ⁷		
4	2,89x10 ⁹ a	1,47x10 ⁹ b	3,87x10 ⁸ c		6,55x10 ⁷ a	2,44x10 ⁷ b	
5	2,44x10 ⁹ a	1,69x10 ⁹ ab	3,10x10 ⁸ c	1,44x10 ⁹ b	6,67x10 ⁷ a	5,67x10 ⁷ b	1,11x10 ⁷ c

Fonte: O próprio autor. Controle - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. sem inoculação de *A. brasilense*; T1 - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. por dois dias, inoculação de *A. brasilense* no segundo dia e seguimento do cocultivo por três dias; T2 - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. por três dias, inoculação de *A. brasilense* no terceiro dia e seguimento do cocultivo por dois dias; T3 - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. por quatro dias, inoculação de *A. brasilense* no quarto dia e seguimento do cocultivo por um dia. Os resultados representam médias de três repetições. As letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos para cada dia de cocultivo (linha) separado por gênero, as letras maiúsculas comparam as médias entre os dias de cocultivo (coluna), ambos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Uma diferença importante entre as formulações F3 e F4 é a fonte de N utilizada, que para F3 foi NH₄Cl e em F4 foi NH₄NO₃. Entretanto, mesmo com essa diferença, a formulação F3 (Tabela 14) foi estatisticamente semelhante à formulação F4 (Tabela 15), com os melhores parâmetros em T1, sendo possível utilizar estes parâmetros de inoculação para o ensaio 5.4.

Tabela 15 – Concentração celular no cocultivo de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 para diferentes dias de ensaio em F4.

Dias do cultivo	<i>Bradyrhizobium</i> spp. (UFC/mL)				<i>A. brasilense</i> (UFC/mL)		
	Controle	T1	T2	T3	T1	T2	T3
2	2,22x10 ⁹						
3	5,00x10 ⁹ a	1,47x10 ⁹ b			3,56x10 ⁷		
4	5,00x10 ⁹ a	3,90x10 ⁹ ab	1,90x10 ⁹ b		4,11x10 ⁷ a	1,78x10 ⁷ a	
5	1,37x10 ¹⁰ a	3,38x10 ⁹ b	2,17x10 ⁹ b	2,40x10 ⁹ b	5,33x10 ⁷ a	2,22x10 ⁷ a	1,00x10 ⁷ a

Fonte: O próprio autor. Controle - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. sem inoculação de *A. brasilense*; T1 - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. por dois dias, inoculação de *A. brasilense* no segundo dia e seguimento do cocultivo por três dias; T2 - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. por três dias, inoculação de *A. brasilense* no terceiro dia e seguimento do cocultivo por dois dias; T3 - Cultivo de *Bradyrhizobium* spp. por quatro dias, inoculação de *A. brasilense* no quarto dia e seguimento do cocultivo por um dia. Os resultados representam

médias de três repetições. As letras minúsculas comparam as médias entre os tratamentos para cada dia de cultivo (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar da diferença entre a composição das formulações F3 e F4, o momento de inoculação de *A. brasilense* foi o mesmo, resultando em crescimento de *Bradyrhizobium* spp. em T1, onde as células são cultivadas durante dois dias e, no segundo dia, foi feita a inoculação de *A. brasilense*, encerrando o cultivo no quinto dia. Portanto, os parâmetros analisados neste ensaio mostram a importância do momento de inoculação do *A. brasilense* ao meio de cocultivo para atingir altas concentrações de células viáveis de ambas as espécies.

5.2.3 Avaliação do tempo de viabilidade celular proporcionado pela adição de protetores celulares

Aplicando as melhores condições de incubação obtidas para as formulações F3 e F4 descritas no item 5.2.2 a todas as outras formulações, avaliou-se a influência na manutenção celular e no pH nas formulações F1, F2, F3, F4 e F5 pela adição dos protetores celulares P1 - 0,035% trealose, P2 - 2% PVP, P3 - 0,3% CMC, P4 - 0,1% amido de milho, P5 - 0,1% amido de milho + 0,1% CMC e P6 - 1% glicerol. A formulação F6, como já descrito, foi desenvolvida tardiamente, não sendo possível, até o momento, avaliar o coinoculante com adição de protetores; todavia, os resultados de F6 serão adicionados às tabelas seguintes deste tópico para demonstrar sua capacidade positiva em relação aos demais tratamentos.

Em F2, os protetores não causaram diferença significativa (Tukey 5%) na concentração de *A. brasilense* em relação ao cultivo sem protetor no término do cultivo (Tabela 16). Após sete dias de armazenamento, porém, todos os protetores, exceto PVP a 2%, promoveram concentração significativamente maior em relação ao controle (Tabela 17). No 30º dia de armazenamento, glicerol a 1% foi capaz de manter a concentração celular em 3×10^8 UFC/mL, diferindo significativamente dos demais tratamentos (Tabela 18).

Na formulação F3, ao término do cocultivo, nenhuma amostra atingiu 10^8 UFC/mL de *A. brasilense* (Tabela 16). Após sete dias, porém, os tratamentos com PVP a 2%, amido de milho a 0,1%, e glicerol a 1% resultaram em crescimento superior a 1×10^9 UFC/mL, diferindo significativamente do tratamento sem protetor celular (Tabela 17). Aos 30 dias de armazenamento, os protetores trealose a 0,035%

e amido de milho a 0,1% possibilitaram a manutenção de células da ordem de 10^8 UFC/mL. Apesar de não diferir estatisticamente (Tukey 5%) do amido de milho a 0,1%, o glicerol a 1% foi o único protetor a manter a concentração celular na faixa de 10^9 UFC/mL (Tabela 18).

Para a F4, o protetor PVP a 2% resultou em maior concentração celular, diferindo significativamente dos demais protetores no início (Tabela 6) e aos sete dias (Tabela 17) de armazenamento, atingindo $1,3 \times 10^9$ UFC/mL de *A. brasilense* no final do período (Tabela 18). Aos 30 dias, os protetores CMC a 0,3% e glicerol a 0,1% conseguiram manter concentração celular acima de 1×10^8 UFC/mL, apesar de não diferirem significativamente do tratamento controle (Tabela 18).

Os protetores celulares não promoveram resultados positivos na formulação F5; todos os tratamentos não atingiram concentrações mínimas de UFC/mL de *A. brasilense*, decaindo fortemente até abaixo do limite de detecção após 30 dias de armazenamento (Tabela 18).

A formulação F6, mesmo não contendo protetor, apresentou significativamente os melhores resultados de concentração celular de *A. brasilense* em relação ao tratamento sem protetor das demais formulações após 30 dias de armazenamento, sugerindo grande potencial e a necessidade de verificação do efeito dos protetores celulares para determinar o efeito benéfico na manutenção celular a essa formulação (Tabela 18).

Tabela 16 – Concentrações celulares de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (UFC/mL) obtidas no cocultivo com *Bradyrhizobium* spp. nas formulações F1, F2, F3, F4 e F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), no dia do armazenamento.

	<i>A. brasilense</i>					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
P0 - Sem Protetor	2,44x10 ⁷ Aab	1,67x10 ⁷ Abc	3,44x10 ⁷ BCa	6,67x10 ⁶ Cc	1,11x10 ⁶ Ac	5,56x10 ⁶ c
P1 -0,035% Trealose	1,56x10 ⁷ Aa	1,67x10 ⁷ Aa	2,44x10 ⁷ Ca	3,78x10 ⁷ Ca	4,44x10 ⁶ Aa	-
P2 - 2% PVP	2,78x10 ⁷ Ab	1,44x10 ⁷ Ab	2,33x10 ⁷ Cb	8,55x10 ⁸ Aa	5,56x10 ⁶ Ab	-
P3 - 0,3% CMC	2,11x10 ⁷ Ab	1,67x10 ⁷ Ab	1,78x10 ⁷ Cb	2,33x10 ⁸ Ba	4,44x10 ⁶ Ab	-
P4 - 0,1% Amido de Milho	2,56x10 ⁷ Ab	1,00x10 ⁷ Ab	9,00x10 ⁷ Aa	7,78x10 ⁶ Cb	2,22x10 ⁶ Ab	-
P5 - 0,1% Amido de Milho + 0,1% CMC	1,78x10 ⁷ Abc	2,11x10 ⁷ Abc	5,11x10 ⁷ ABCa	4,11x10 ⁷ Cab	1,11x10 ⁶ Ac	-
P6 - 1% Glicerol	1,67x10 ⁷ Ab	1,44x10 ⁷ Ab	7,99x10 ⁷ ABa	2,11x10 ⁷ Cb	2,22x10 ⁶ Ab	-

Fonte: O próprio autor. Os dados representam médias de seis repetições. As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. “-”: Tratamentos não realizados.

Tabela 17 – Concentrações celulares de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (UFC/ mL) obtidas no cocultivo com *Bradyrhizobium* spp. nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 7 dias de armazenamento.

	<i>A. brasilense</i>					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
P0 - Sem Protetor	3,78x10 ⁷ Cc	5,44x10 ⁷ Cc	9,67x10 ⁷ Cb	1,40x10 ⁸ Ca	2,22x10 ⁶ Ad	1,29x10 ⁸ ab
P1 -0,035% Trealose	2,56x10 ⁷ Cb	9,22x10 ⁷ Bb	6,00x10 ⁸ Ba	5,11x10 ⁷ Cb	8,89x10 ⁶ Ab	-
P2 - 2% PVP	1,06x10 ⁸ Bb	7,78x10 ⁷ BCb	1,36x10 ⁹ Aa	1,30x10 ⁹ Aa	3,33x10 ⁶ Ab	-
P3 - 0,3% CMC	3,44x10 ⁷ Cbc	1,17x10 ⁸ ABab	5,78x10 ⁷ Cbc	1,56x10 ⁸ Ca	4,44x10 ⁶ Abc	-
P4 - 0,1% Amido de Milho	1,78x10 ⁷ Cb	1,06x10 ⁸ ABb	1,24x10 ⁹ Aa	1,21x10 ⁸ Cb	nd	-
P5 - 0,1% Amido de Milho + 0,1% CMC	3,00x10 ⁷ Cc	1,29x10 ⁸ Aab	1,54x10 ⁸ Ca	1,10x10 ⁸ Cb	5,56x10 ⁶ Ac	-
P6 - 1% Glicerol	3,67x10 ⁸ Ab	1,32x10 ⁸ Ac	1,07x10 ⁹ Aa	5,44x10 ⁸ Bb	nd	-

Fonte: O próprio autor. Os dados representam médias de seis repetições. As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. nd: não detectadas colônias nas diluições analisadas.

“-“ : Tratamentos não realizados.

Tabela 18 – Concentrações celulares de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 (UFC/mL) obtidas no cocultivo com *Bradyrhizobium* spp. nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 30 dias de armazenamento.

	<i>A. brasilense</i>					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
P0 - Sem Protetor	1,00x10 ⁷ Bc	3,67x10 ⁷ Bb	5,11x10 ⁷ Cb	2,67x10 ⁷ Bbc	nd	1,61x10 ⁸ a
P1 - 0,035% Trealose	4,44x10 ⁶ Bc	3,78x10 ⁷ Bbc	5,22x10 ⁸ Ba	9,89x10 ⁷ Bb	nd	-
P2 - 2% PVP	4,44x10 ⁶ Bb	6,00x10 ⁷ Bb	9,67x10 ⁷ Cb	2,00x10 ⁹ Aa	nd	-
P3 - 0,3% CMC	1,22x10 ⁷ Bb	5,00x10 ⁷ Bb	3,78x10 ⁷ Cb	2,11x10 ⁸ Ba	nd	-
P4 - 0,1% Amido de Milho	7,78x10 ⁶ Bb	4,11x10 ⁷ Bb	8,55x10 ⁸ Aa	2,89x10 ⁷ Bb	nd	-
P5 - 0,1% Amido de Milho + 0,1% CMC	7,78x10 ⁶ Bb	5,78x10 ⁷ Ba	4,56x10 ⁷ Ca	1,33x10 ⁷ Bb	nd	-
P6 - 1% Glicerol	3,44x10 ⁸ Ab	3,22x10 ⁸ Ab	1,01x10 ⁹ Aa	1,14x10 ⁸ Bb	nd	-

Fonte: O próprio autor. Os dados representam médias de seis repetições. As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. nd: não detectadas colônias nas diluições analisadas.

“-“ : Tratamentos não realizados.

Para as células de *B. japonicum* SEMIA 5079 e *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 na formulação F2, os protetores celulares não foram capazes de manter concentrações celulares superiores a 10^9 UFC/mL durante os 30 dias de armazenamento, sendo o melhor resultado garantido pelo protetor CMC a 0,3%, com concentração de $4,1 \times 10^8$ UFC/mL (Tabela 21). Nessa mesma avaliação, em F3, o amido de milho a 0,1%, embora tenha apresentado melhor desempenho em relação aos demais protetores, não garantiu concentração celular mínima para a produção de inoculantes comerciais. Do mesmo modo, na F4, os melhores desempenhos foram conseguidos com CMC a 0,3% e amido de milho a 0,1%, mas também em concentrações inferiores a 10^9 UFC/mL aos 30 dias (Tabela 21).

A formulação F5 foi a que permitiu as melhores concentrações de *Bradyrhizobium* spp. dentre todas as formulações, atingindo a faixa de 10^{10} UFC/mL ao término do cultivo (Tabela 19) e aos sete dias de armazenamento (Tabela 20), salvo o cultivo com glicerol a 1%, que resultou em concentração celular de $9,60 \times 10^9$ UFC/mL no final da fermentação, mas logo ao sétimo dias de armazenamento chegou a $2,16 \times 10^{10}$; esse foi o melhor crescimento entre todas as formulações que utilizaram esse protetor no período de sete dias de armazenamento (Tabela 20). Bom desempenho foi também conseguido, aos sete dias, com trealose 0,035%, resultando em $6,70 \times 10^9$ UFC/mL. Após 30 dias, todos protetores celulares, exceto amido de milho 0,1%, bem como o controle, mantiveram concentrações celulares superiores $1,0 \times 10^9$ UFC/mL (Tabela 21).

Os resultados de F6, mais uma vez, se sobressaíram, sendo significativamente superiores aos obtidos em F1, F2, F3 e F4, mantendo $3,29 \times 10^9$ UFC/mL de *Bradyrhizobium* spp. após 30 dias de armazenamento (Tabela 21), reforçando sua qualidade e potencial e também a necessidade de ensaios de avaliação dos reforços na adição de protetores celulares.

Tabela 19 – Concentrações celulares (UFC/ mL) de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 obtidas no cocultivo com *Azospirillum brasilense* nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), no dia do armazenamento.

	<i>Bradyrhizobium</i> spp.					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
P0 - Sem Protetor	1,48x10 ⁹ Ac	2,60x10 ⁹ Ac	7,30x10 ⁸ BCc	2,19x10 ⁹ Ac	1,39x10 ¹⁰ Aa	1,12x10 ¹⁰ b
P1 -0,035% Trealose	9,83x10 ⁸ Abc	1,75x10 ⁹ Bb	1,13x10 ⁹ BCbc	7,87x10 ⁸ Bc	1,01x10 ¹⁰ Ba	-
P2 - 2% PVP	1,10x10 ⁹ Abc	2,42x10 ⁹ Ab	9,73x10 ⁸ BCc	Nd	1,05x10 ¹⁰ Ba	-
P3 - 0,3% CMC	1,17x10 ⁹ Ac	2,26x10 ⁹ ABb	6,60x10 ⁸ Cc	1,53x10 ⁹ ABbc	1,21x10 ¹⁰ ABa	-
P4 - 0,1% Amido de Milho	1,33x10 ⁹ Ab	1,93x10 ⁹ ABb	2,15x10 ⁹ Ab	1,53x10 ⁹ ABb	1,40x10 ¹⁰ ABa	-
P5 - 0,1% Amido de Milho + 0,1% CMC	1,06x10 ⁹ Ab	1,55x10 ⁹ Bb	1,35x10 ⁹ Bb	1,51x10 ⁹ ABb	1,17x10 ¹⁰ ABa	-
P6 - 1% Glicerol	1,34x10 ⁹ Abc	2,12x10 ⁹ ABbc	9,57x10 ⁸ BCc	2,50x10 ⁹ Ab	9,60x10 ⁹ Ba	-

Fonte: O próprio autor. Os dados representam médias de seis repetições. As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. nd: não detectadascolônias nas diluições analisadas. “-“ : Tratamentos não realizados.

Tabela 20 – Concentrações celulares (UFC/ mL) de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 obtidas no cocultivo com *Azospirillum brasilense* nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 7 dias de armazenamento.

	<i>Bradyrhizobium</i> spp.					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
P0 - Sem Protetor	9,80x10 ⁸ Ac	5,90x10 ⁸ Ac	3,10x10 ⁸ Bc	7,53x10 ⁸ Bc	1,35x10 ¹⁰ BCa	9,96x10 ⁹ b
P1 - 0,035% Trealose	6,90x10 ⁸ BCb	3,03x10 ⁸ Ab	7,63x10 ⁸ Bb	1,67x10 ⁸ Db	6,70x10 ⁹ Da	-
P2 - 2% PVP	6,30x10 ⁸ Cb	5,47x10 ⁸ Ab	6,70x10 ⁸ Bb	nd Ec	1,38x10 ¹⁰ Ba	-
P3 - 0,3% CMC	6,93x10 ⁸ BCb	2,43x10 ⁸ Ab	nd	4,07x10 ⁸ Cb	1,22x10 ¹⁰ Ca	-
P4 - 0,1% Amido de Milho	1,05x10 ⁹ ABb	5,10x10 ⁸ Ab	2,71x10 ⁹ Aa	1,24x10 ⁹ Ab	nd	-
P5 - 0,1% Amido de Milho + 0,1% CMC	1,33x10 ⁹ Ab	4,90x10 ⁸ Ac	1,63x10 ⁸ Bd	1,27x10 ⁸ Dd	1,27x10 ¹⁰ BCa	-
P6 - 1% Glicerol	1,26x10 ⁹ Ab	3,20x10 ⁸ Abc	2,27x10 ⁸ Bc	5,90x10 ⁸ BCbc	2,16x10 ¹⁰ Aa	-

Fonte: O próprio autor. Os dados representam médias de seis repetições. As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. nd: não detectadas colônias nas diluições analisadas. “-“ : Tratamentos não realizados.

Tabela 21 – Concentrações celulares (UFC/ mL) de *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 5079 e SEMIA 5080 obtidas no cocultivo com *Azospirillum brasilense* nas formulações F1, F2, F3, F4, F5 e F6 (Tabela 2) acrescidas de diferentes protetores celulares: trealose (0,035%); PVP (1%); CMC (0,3%); amido de milho comercial (0,1%); amido de milho comercial (0,1%) + CMC (0,1%); glicerol (1%), após 30 dias de armazenamento.

	<i>Bradyrhizobium</i> spp.					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
P0 - Sem Protetor	3,17x10 ⁸ Ac	1,47x10 ⁸ ABc	nd	6,67x10 ⁶ Bc	1,34x10 ¹⁰ Aa	3,29x10 ⁹ b
P1 -0,035% Trealose	1,83x10 ⁸ ABb	8,00x10 ⁷ Bb	3,00x10 ⁷ Bb	2,67x10 ⁷ Bb	3,73x10 ⁹ Ca	-
P2 - 2% PVP	nd	1,90x10 ⁸ ABb	1,33x10 ⁷ Bb	Nd	6,90x10 ⁹ BCa	-
P3 - 0,3% CMC	1,57x10 ⁸ ABa	4,10x10 ⁸ Aa	nd	1,77x10 ⁸ Aa	8,27x10 ⁹ Ba	-
P4 - 0,1% Amido de Milho	2,80x10 ⁸ ABa	4,00x10 ⁷ Bb	2,07x10 ⁸ Aab	5,33x10 ⁷ Bb	nd	-
P5 - 0,1% Amido de Milho + 0,1% CMC	1,83x10 ⁸ ABb	2,53x10 ⁸ ABb	nd	1,03x10 ⁸ ABb	1,23x10 ¹⁰ ABa	-
P6 - 1% Glicerol	7,67x10 ⁷ Bb	1,90x10 ⁷ Bb	nd	6,67x10 ⁷ ABb	2,29x10 ⁹ Ca	-

Fonte: O próprio autor. Os dados representam médias de seis repetições. As letras maiúsculas comparam as médias entre os protetores dentro de cada formulação (coluna), e minúsculas comparam as médias de cada protetor entre as formulações (linha) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. nd: não detectadas colônias nas diluições analisadas. “-“ : Tratamentos não realizados.

Kumaresan e Reetha (2011) também utilizaram trealose 10 mM e observaram concentração de *A. brasilense* de $4,0 \times 10^8$ UFC/mL, resultado semelhante à concentração em F3 após 30 dias de armazenamento ($5,22 \times 10^8$ UFC/mL); no entanto, não houve resultados positivos para *Bradyrhizobium* spp. em nenhuma das formulações. No trabalho desenvolvido por Santos (2017), a concentração máxima conseguida para *A. brasilense* foi de $4,59 \times 10^7$ UFC/mL em uma de suas formulações. Streeter (2003) verificou o potencial de proteção advinda de trealose durante ensaios de estresse salino e dessecação de células de *B. japonicum*, observando um aumento de 294% de sobrevivência celular após 24 horas.

O uso de PVP a 2% também foi avaliado por Leo Daniel et al. (2013), em que a concentração de *A. brasilense* foi mantida por dez dias na ordem de 10^{10} UFC/mL. Tittabutret al. (2007) relatam a capacidade de PVP 2% em auxiliar na manutenção celular de *Bradyrhizobium* USDA 110 em concentrações superiores a 10^8 UFC/mL durante seis meses. Kumaresan e Reetha (2011) observaram que a concentração de *A. brasilense* permaneceu em $1,33 \times 10^8$ UFC/mL por 11 meses de armazenamento. Apenas na formulação F4 com *A. brasilense* o protetor PVP 2% auxiliou positivamente na manutenção celular, permitindo concentração de 2×10^9 UFC/mL aos 30 dias (Tabela 18).

Freitas (2014) utilizou misturas de espirulina/CMC (40:60%) no armazenamento de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* durante 28 dias e verificou concentração celular de 10^9 UFC/mL. Na formulação F4, o uso de CMC a 0,3% trouxe resultados positivos apenas para a manutenção de *A. brasilense*, atingindo $2,11 \times 10^8$ UFC/mL após 30 dias de armazenamento (Tabela 18). No mesmo trabalho, utilizando a mistura composta de 10% e 2,5% de espirulina, foi possível manter a concentração na faixa de 10^{11} células viáveis de *Bradyrhizobium*/mL durante 28 dias de armazenamento. Fernandes Junior (2006) obteve concentração de $2,29 \times 10^9$ UFC/mL de *Bradyrhizobium* durante 35 dias de armazenamento em temperatura ambiente com a mistura de CMC/amido de milho. O protetor P5 originado da mistura de 0,1 g de CMC e 0,1 g de amido de milho foi capaz de manter concentrações superiores a 10^8 UFC/mL de *A. brasilense* durante sete dias em F2, F3 e F4 (Tabela 17) e 10^9 UFC/mL de *Bradyrhizobium* spp. em F1

durante sete dias de armazenamento (Tabela 20) e 10^{10} UFC/mL em F5 durante 30 dias de armazenamento (Tabela 21).

Para *A. brasilense*, o glicerol a 1% auxiliou na manutenção celular de todas as formulações, exceto na formulação F5 e com ênfase na formulação F3, que foi superior estatisticamente, resultando em concentração celular de $1,01 \times 10^9$ UFC/mL aos 30 dias (Tabela 18). Esse protetor já foi relatado em estudos de Kumaresan e Reetha (2011), em que a concentração de 10 mM, aproximadamente 1% v/v, permitiu manter a concentração celular de *A. brasilense* de $2,33 \times 10^8$ UFC/mL por 11 meses. Entretanto, a presença de glicerol em F4 na concentração de 1% resultou em decréscimo para $1,14 \times 10^8$ UFC/mL após 30 dias de armazenamento (Tabela 18). É importante ressaltar que não foram encontrados estudos que utilizavam glicerol como fonte majoritária de carbono no cultivo de ambas as espécies, dificultando a compreensão de tal efeito em F4. Em relação à proteção celular de *Bradyrhizobium*, o uso do glicerol resultou em bons resultados apenas em F5, porém, não houve contagem de *A. brasilense* nesta formulação, descartando sua utilização.

A análise dos resultados obtidos indicou que alguns protetores celulares seriam viáveis para a manutenção de *A. brasilense*, mas não foram efetivos para *Bradyrhizobium* spp. Além disso, a eficiência não foi suficiente para assegurar concentrações celulares mínimas para validar as formulações como produto comercial.

Ao comparar as concentrações celulares das Tabelas 16 a 18 (*A. brasilense*) e 19 a 21 (*Bradyrhizobium* spp.) com as variações de pH durante o armazenamento (Tabela 22), notam-se variações semelhantes às dos ensaios nos itens 5.2.1 e 5.2.1, com alcalinização das formulações que continham ácido málico como fonte de C preferencial para *A. brasilense*, ou seja, todas as formulações, exceto F5, na qual foi verificada acidificação.

Tabela 22 – Variação de pH do cocultivo de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* nas formulações F1 a F6 com adição de protetores celulares durante o armazenamento. pH₀: final do cocultivo; pH₇: após 7 dias de armazenamento; pH₃₀: após 30 dias de armazenamento.

Tratamentos	pH ₀	pH ₇	Δ pH ₀₋₇	pH ₃₀	Δ pH ₀₋₃₀
F 1+P0	7,87	8,63	0,76	9,19	1,32
F 1+P1	8,43	7,75	-0,68	9,24	0,81
F 1+P2	8,16	8,87	0,71	9,54	1,38
F 1+P3	8,11	8,81	0,70	9,3	1,19
F 1+P4	8,25	8,91	0,66	9,19	0,94
F 1+P5	8,07	8,96	0,89	9,26	1,19
F 1+P6	8,08	8,45	0,37	9,06	0,98
F2+P1	8,44	8,79	0,35	9,28	0,84
F2+P2	8,18	8,78	0,60	9,21	1,03
F2+P3	8,10	8,85	0,75	9,18	1,08
F2+P4	7,89	8,77	0,88	9,38	1,49
F2+P5	8,10	8,76	0,66	9,31	1,21
F2+P6	8,09	8,68	0,59	8,69	0,60
F3+P1	8,06	7,99	-0,07	8,54	0,48
F3+P2	7,89	8,33	0,44	8,59	0,70
F3+P3	8,13	8,67	0,54	8,44	0,31
F3+P4	7,84	8,11	0,27	8,51	0,67
F3+P5	8,33	8,97	0,64	9,18	0,85
F3+P6	7,67	7,70	0,03	7,52	-0,15
F4+P0	7,85	8,66	0,81	8,43	0,58
F4+P1	7,83	8,33	0,50	8,63	0,80
F4+P2	7,48	8,20	0,72	8,78	1,30
F4+P3	7,95	8,34	0,39	8,61	0,66
F4+P4	7,86	8,62	0,76	8,51	0,65
F4+P5	8,09	8,33	0,24	8,64	0,55
F4+P6	8,05	8,30	0,25	8,42	0,37
F5+P1	5,84	4,14	-1,70	5,47	-0,37
F5+P2	6,03	5,56	-0,47	5,51	-0,52
F5+P3	5,65	5,46	-0,19	5,49	-0,16
F5+P4	5,80	5,72	-0,08	5,65	-0,15
F5+P5	5,48	5,49	0,01	5,46	-0,02
F5+P6	4,32	3,84	-0,48	3,67	-0,65
F6+P0	7,32	8,27	0,95	8,61	1,29

Fonte: O próprio autor. P0: sem protetor; P1: Trealose 0,035%; P2: PVP 2%; P3: CMC 0,3%; P4: Amido de milho 0,1%; P5: Amido de milho 0,1% + CMC 0,1%; P6: Glicerol 1%.

Infelizmente os dados de análise dos protetores não foram totalmente analisados antes do início da safra de soja 2017-2018, razão pela qual foram utilizadas, nos ensaios a campo, apenas as formulações F3 e F4 sem protetor. Todavia, na safra 2018-2019 foram utilizadas as formulações F3 com CMC

0,3 %, F4 com 0,1% de amido de milho e F6 sem protetor, essa última a mais promissora, mas os ensaios ainda estão em análise.

5.3. Avaliação de eficiência agrônômica a campo

Conforme já comentado, foi definido que o coinoculante carregaria a estirpe *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 (=CPAC 7), com alta capacidade de FBN (HUNGRIA; MENDES, 2015), e *A. brasilense* Ab-V6, maior produtora de fitormônios (FUKAMI et al., 2018).

O experimento de Lutécia foi conduzido em uma área de primeiro ano de cultivo de soja, não tendo recebido inoculantes anteriormente e continha baixa população de rizóbios estabelecida no solo, estimada em $7,36 \times 10^1$ células de rizóbio/g de solo (Tabela 8) de modo que, na avaliação realizado no estágio V5 de crescimento da soja não houve nodulação nos tratamentos controle sem (T1) e com (T2) adubação nitrogenada, acarretando em baixa produtividade no caso do controle sem receber adubação nitrogenada (Tabela 23). A formulação F3 (T6), resultou em número de nódulos comparável à proporcionada pelo inoculante turfoso padrão (T3) e à coinoculação comercial, representada pelo fornecimento em separado de *Bradyrhizobium* spp. e *A. brasilense* (T5) e superior ao inoculante líquido com registro contendo apenas *Bradyrhizobium* spp. (T4). Nessa mesma coleta realizada em V5, o melhor desempenho de produção de biomassa e N total acumulado na parte aérea foi constatado no tratamento recebendo N-fertilizante. Contudo, na coleta realizada na maturidade fisiológica da soja, os maiores rendimentos foram constatados com o inoculante turfoso padrão, que tem se mostrado como padrão ouro em condições limitantes de primeiro cultivo de soja e solos com alto teor de areia e nas formulações líquidas consistindo de coinoculação comercial e do coinoculante desenvolvido neste estudo. O coinoculante desenvolvido neste estudo superou o rendimento do tratamento recebendo N-fertilizante em 26%. Os dois coinoculantes foram os tratamentos que resultaram em maior massa de 100 grãos, enquanto que todos os tratamentos inoculados resultaram em maior N total acumulado nos grãos, superiores estatisticamente ao tratamento recebendo N-fertilizante e ao tratamento controle não inoculado. Como conclusão dessa área tem-se que o coinoculante desenvolvido neste estudo foi comparável à coinoculação

em separado com as duas bactérias e superior estatisticamente aos controles não inoculados, sem e com fertilizante nitrogenado (Tabela 23).

Em Paranavaí a área também era de primeiro ano de cultivo, com população de rizóbios abaixo da detecção pelo método NMP (MAPA, 2010) (Tabela 8), de modo que a nodulação estava praticamente ausente nas plantas não inoculadas, com ou sem adubação nitrogenada, na avaliação realizada no estágio V5 de crescimento da soja (Tabela 24). Ainda em V5, os dois tratamentos coinoculados não diferiram estatisticamente do tratamento recebendo N-fertilizante na produção de biomassa da parte aérea. Todos os tratamentos inoculados incrementaram o teor de N na parte aérea em relação aos dois controles não inoculados, mas considerando o N total acumulado na parte aérea, somente o tratamento não inoculado e sem receber N-fertilizante foi inferior estatisticamente. Na maturidade fisiológica, o maior destaque foi para os dois tratamentos coinoculados, que diferiram estatisticamente dos controles não inoculados, com e sem N-fertilizante. A formulação desenvolvida neste estudo também diferiu estatisticamente no rendimento de grãos em relação à inoculação exclusivamente com *Bradyrhizobium* em formulação líquida ou turfosa. Muito importante, todos os tratamentos inoculados resultaram em maiores teores e N total nos grãos de soja. Como conclusão desse ensaio, tem-se que o coinoculante desenvolvido neste estudo apresentou eficiência agrônômica comparável à do coinoculação com registro com as bactérias separadas e foi superior aos controles não inoculados, sem e com N-fertilizante, bem como superior à inoculação somente com *Bradyrhizobium* spp. (Tabela 24).

Em áreas de primeiro ano de cultivo, comumente é recomendada a aplicação de mais doses de inoculantes à base de *Bradyrhizobium* soja para atingir melhores resultados, suprimindo a possível baixa concentração baixa de rizóbios no solo. Segundo Freitas et al. (2017), foram necessárias 10 doses de inoculante à base de *B. japonicum* por 50 kg de sementes para a atingir a melhor produtividade (3.601 kg/ha); seis doses garantiram a maior nodulação nas raízes primárias e com 10 doses, nas raízes secundárias, com valores de 36 e 48 nódulos, respectivamente.

Tabela 23 – Eficiência agrônômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Lutécia-SP em relação a diferentes inoculantes contendo *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e 5080 e *Azospirillum* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.

Tratamento ^a	Estágio V5					Maturidade Fisiológica			
	Nodulação		Massa da parte aérea	N na parte aérea		N nos grãos		Rendimento	Massa de 100 grãos
	(nº/pl)	(mg/pl)	(g/pl)	Teor (g/kg)	Total (mg/pl)	Teor (g/kg)	Total (kg/ha)	(kg/ha)	(g)
T1 – Não inoculado	0,0 b	0,0 c	6,71 b	21,0 ^{n.s.}	140,9 b	38,3 c	61 c	1.601 c	14,4 d
T2 – Não inoculado + 200 kg de N	0,0 b	0,0 c	9,53 a	23,9	227,7 a	43,8 b	142 b	3.244 b	15,7 c
T3 – IP turfoso	12,5 a	54,7a	4,73 b	25,3	119,7 b	52,9 a	215 a	4.059 a	17,2 b
T4 – I líquido	4,9 b	30,5 b	4,70 b	22,0	103,4 b	51,6 a	181 a	3.500 b	15,5 c
T5 – Coinoculação comercial	10,6 a	30,3 b	5,71 b	21,0	119,9 b	51,7 a	211 a	4.086 a	18,0 a
T6 – Coinoculação com F3	10,5 a	33,8 b	6,02 b	25,8	155,3 b	50,7 a	208 a	4.100 a	17,7 ab
Valor de <i>p</i>	0,001	0,001	0,02	0,10	0,009	0,001	0,001	0,001	0,001

Fonte: O próprio autor. ^aT1) Controle não inoculado e sem N-mineral; T2) Controle não inoculado recebendo 200 kg de N/ha, 50% na semeadura e 50% no florescimento; T3) Inoculação padrão – Inoculante turfoso com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 milhões de células/semente; T4) Inoculação padrão – Inoculante líquido com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ de células/semente; T5) T4 + 1 dose de inoculante comercial líquido contendo 10⁸ células/semente de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 aplicado para fornecer 1,2 x 10⁵ de células/semente; T6) Formulação F3 – 1 dose na concentração de 10⁹ células/mL para *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e 10⁸ células/mL de *A. brasilense* Ab-V6. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; n.s.: não significativo. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidas por letras distintas, em cada coluna diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; n.s., não significativo.

Tabela 24 – Eficiência agrônômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Paranavaí-PR em relação a diferentes inoculantes contendo *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e 5080 e *Azospirillum* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.

Tratamento ^a	Estágio V5					Maturidade Fisiológica			
	Nodulação		Massa da parte aérea	N na parte aérea		N nos grãos		Rendimento	Massa de 100 grãos
	(n°/pl)	(mg/pl)	(g/pl)	Teor (g/kg)	Total (mg/pl)	Teor (g/kg)	Total (kg/ha)	(kg/ha)	(g)
T1 – Não inoculado	0,1 b	0,5 b	3,00 b	17,1 b	51,3 b	50,0 b	110 b	2.202 d	12,6 a
T2 – Não inoculado + 200 kg de N	0,1 b	0,8 b	5,34 a	17,8 b	95,0 a	41,7 c	107 b	2.574 cd	12,8 a
T3 – IP turfoso	13,2 a	101,0 a	3,62 b	22,1 a	80,0 ab	54,0 a	157a	2.904 bc	11,8 b
T4 – I líquido	8,5 a	74,2 a	3,60 b	21,0 a	75,6 ab	51,0 ab	143 a	2.800 bc	11,5 b
T5 – Coinoculação comercial	10,7 a	76,2 a	4,32 ab	20,3 a	87,7 ab	52,9 a	166 a	3.140 ab	12,5 a
T6 – Coinoculação com F3	8,6 a	77,6 a	3,92 ab	21,2 a	83,1 ab	52,0a	181 a	3.491 a	12,4 a
Valor de <i>p</i>	0,001	0,001	0,038	0,007	0,097	0,001	0,001	0,001	0,003

Fonte: O próprio autor. ^aT1) Controle não inoculado e sem N-mineral; T2) Controle não inoculado recebendo 200 kg de N/ha, 50% na semeadura e 50% no florescimento; T3) Inoculação padrão – Inoculante turfoso com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 milhões de células/semente; T4) Inoculação padrão – Inoculante líquido com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ de células/semente; T5) T4 + 1 dose de inoculante comercial líquido contendo 10⁸ células/semente de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 aplicado para fornecer 1,2 x 10⁵ de células/semente; T6) Formulação F3 – 1 dose na concentração de 10⁹ células/mL para *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e 10⁸ células/mL de *A. brasilense* Ab-V6. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ou a 10%.

Na área utilizada para o ensaio de eficiência agronômica em Florestópolis a utilização da tecnologia de inoculação por várias safras estabeleceu uma população rizobiana na profundidade 0-20 cm estimada em $2,15 \times 10^5$ células de rizóbios/g de solo (Tabela 8). Com isso, houve boa nodulação, mesmo nos controles não inoculados, que não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos inoculados nos parâmetros de número e massa de nódulos avaliados em V5, exceto pelo tratamento com N-fertilizante, com inibição da nodulação (Tabela 25). Também em V5, a maior produção de biomassa e N total na parte aérea foram constatados nos tratamentos não inoculado recebendo N-fertilizante, no inoculante líquido comercial com *Bradyrhizobium* e no coinoculante desenvolvido neste estudo. A formulação de coinoculante F3 resultou na maior produtividade, equiparada estatisticamente ao coinoculante comercial com as estirpes isoladas, com o inoculante turfoso e com o controle recebendo N-fertilizante. Todos os tratamentos inoculados resultaram em incrementos no teor de N nos grãos e, no caso do N total acumulado nos grãos, também com o tratamento recebendo N-fertilizante. Como conclusão deste ensaio tem-se, mais uma vez, que a formulação de coinoculante desenvolvida neste estudo apresentou eficiência comparável à do coinoculante comercial com registro contendo as bactérias separadamente e foi superior ao controle não inoculado, ainda que a área apresentasse população elevada estabelecida de rizóbios compatíveis com a soja (Tabela 25).

Em Ponta Grossa (Tabela 26) e Londrina (Tabela 27), foi adicionado um tratamento de aplicação no sulco de semeadura da formulação de coinoculante F3, com a aplicação de três doses. Esse modo de utilização da tecnologia de inoculação é importante, por representar uma alternativa de proteção às células de *Bradyrhizobium* e, no caso de coinoculação, também às células de *Azospirillum* do contato direto de agroquímicos que são utilizados para tratamento fitossanitário das sementes. Segundo alguns trabalhos, a mortalidade celular pode chegar a 49% no número de células viáveis de *Bradyrhizobium* spp. em soja após apenas 4 h do tratamento de sementes com agroquímicos (Garcia et al., 2016). Hungria et al. (2012) relataram efeitos negativos à nodulação de soja na presença de agroquímicos, mas que foram

contornados pela inoculação no sulco de semeadura na concentração equivalente de 2,5 milhões de células de *Bradyrhizobium* spp./semente.

Em Ponta Grossa, ainda que em área com população de rizóbios compatível com a soja elevada, a co inoculação resultou nos maiores valores de número e massa de nódulos em V5 (Tabela 26). Nessa mesma coleta, houve destaque para os dois tratamentos com o coinoculante desenvolvido neste estudo, aplicado via sementes ou sulco, no teor de N na parte aérea e, em relação ao N total acumulado, esses dois tratamentos não diferiram estatisticamente do N-fertilizante. Na maturidade fisiológica, os maiores rendimentos foram obtidos com o coinoculante desenvolvido neste estudo, aplicado via sementes ou sulco, que não diferiram estatisticamente do coinoculante comercial com as duas bactérias separadas. O coinoculante desenvolvido neste estudo diferiu estatisticamente, incrementando o rendimento de grãos, em relação ao controle não inoculado, em 565 kg/ha e 525 kg/ha quando aplicado via semente ou sulco, respectivamente. Também incrementou estatisticamente o rendimento em relação aos inoculantes turfoso e líquido contendo apenas *Bradyrhizobium* spp. e ao controle sem inoculação recebendo N-fertilizante. Deve-se destacar, ainda, os maiores valores de N total acumulado nos grãos obtidos em todos os tratamentos coinoculados. Como conclusão desse ensaio, tem-se que a eficiência agrônômica do coinoculante desenvolvido foi comprovada mesmo em área com população estabelecida de rizóbios compatíveis, resultando em incremento no rendimento tanto em relação ao controle não inoculado, como em relação à inoculação exclusivamente com *Bradyrhizobium* spp., e com desempenho semelhante ao coinoculante comercial contendo as duas bactérias separadamente (Tabela 26).

Em Londrina, em área que apresentou população de rizóbios estimada em $1,47 \times 10^3$ células de rizóbios/g de solo (Tabela 8), não foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos inoculados e controle não inoculado sem N-fertilizante em nenhum dos parâmetros avaliados em V5, somente que o N-fertilizante reduziu a nodulação (Tabela 27). Também não houve diferença entre os tratamentos no rendimento de grãos e nos demais parâmetros avaliados na maturidade fisiológica, confirmando que a população

estabelecida no solo foi capaz de fornecer o N necessário para o desenvolvimento das plantas. A comprovação da eficiência da FBN vem, também, da constatação de que não houve incremento no rendimento de grãos pela aplicação de N-fertilizante (Tabela 27).

Como indicados nas avaliações agronômicas das áreas de Florestópolis (Tabela 25), Ponta Grossa (Tabela 26) e Londrina (Tabela 27), em áreas já cultivadas, a diferença nas avaliações agronômicas nos tratamentos sem inoculação como ou sem adubação nitrogenada e os tratamentos inoculados tornam-se menores, devido à alta concentração de rizóbios no solo. Mesmo assim, foram confirmados benefícios estatisticamente significativos, particularmente pela coinoculação, em Florestópolis e Ponta Grossa. Em áreas de primeiro ano, como em Lutécia (Tabela 23) e Paranavaí (Tabela 24), as diferenças foram evidenciadas, demonstrando os resultados positivos das tecnologias de inoculação e coinoculação.

A literatura evidencia os resultados positivos advindos das tecnologias de inoculação e coinoculação na soja. Rengel et al. (2018) verificaram aumento significativo em altura de plantas, diâmetro de caule, número de nós reprodutivos e vagens por planta nos tratamentos coinoculados com *B. japonicum* e *A. brasilense* em soja, em experimentos avaliados em Campo Mourão no ano de 2016. No mesmo trabalho, os autores verificaram que os resultados de inoculação nas sementes e no sulco de semeadura não diferiram estatisticamente. Equivalência de aplicação via sementes e sulco também foi confirmada por Bracchini et al. (2016), com a aplicação, no sulco, de três doses de *Bradyrhizobium*, resultando em acréscimos no rendimento de grãos da soja de ambos em comparação com o controle não inoculado. Barbaro-Torneli (2018) obteve, com a coinoculação com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* via sulco de semeadura, um incremento de 246 kg/ha, ou 4,1 sacas/ha a mais na produtividade da soja em relação à média dos tratamentos inoculados apenas com *Bradyrhizobium*.

Tabela 25 – Eficiência agrônômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Florestópolis-PR em relação a diferentes inoculantes contendo *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e 5080 e *Azospirillum* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.

Tratamento ^a	Estágio V5					Maturidade Fisiológica			
	Nodulação		Massa da parte aérea	N na parte aérea		N nos grãos		Rendimento	Massa de 100 grãos
	(n ^o /pl)	(mg/pl)	(g/pl)	Teor (g/kg)	Total (mg/pl)	Teor (g/kg)	Total (kg/ha)	(kg/ha)	(g)
T1 – Não inoculado	26,2 ^{n.s.}	64,3 ^{n.s.}	1,02 b	29,6 a	30,2 ab	45,4 c	124 b	2.722 b	15,47 ^{n.s.}
T2 – Não inoculado + 200 kg de N	25,3	65,1	1,61 a	29,7 a	47,8 a	46,6 b	147 ab	3.158 ab	15,90
T3 – IP turfoso	26,2	55,8	0,93 b	28,5 ab	26,5 b	48,3 ab	137 ab	2.833 ab	15,33
T4 – I líquido	25,4	66,0	1,28 ab	26,9 c	34,4 ab	48,0 ab	131 ab	2.725 b	15,50
T5 – Coinoculação comercial	26,8	62,9	0,98 b	26,7 c	26,2 b	49,8 a	165 a	3.321 ab	15,60
T6 – Coinoculação com F3	29,4	71,9	1,22 ab	26,2 c	31,9 ab	49,0 a	165 a	3.368 a	15,85
Valor de p	0,10	0,10	0,095	0,02	0,090	0,001	0,095	0,090	0,10

Fonte: O próprio autor. ^aT1) Controle não inoculado e sem N-mineral; T2) Controle não inoculado recebendo 200 kg de N/ha, 50% na semeadura e 50% no florescimento; T3) Inoculação padrão – Inoculante turfoso com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 milhões de células/semente; T4) Inoculação padrão – Inoculante líquido com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ de células/semente; T5) T4 + 1 dose de inoculante comercial líquido contendo 10⁸ células/semente de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 aplicado para fornecer 1,2 x 10⁵ de células/semente; T6) Formulação F3 – 1 dose na concentração de 10⁹ células/mL para *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e 10⁸ células/mL de *A. brasilense* Ab-V6. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ou a 10%; n.s., não significativo.

Tabela 26 – Eficiência agrônômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Ponta Grossa-PR em relação a diferentes inoculantes contendo *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e 5080 e *Azospirillum* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.

Tratamento ^a	Estágio V5					Maturidade Fisiológica			
	Nodulação		Massa da parte aérea	N na parte aérea		N nos grãos		Rendimento	Massa de 100 grãos
	(n°/pl)	(mg/pl)	(g/pl)	Teor (g/kg)	Total (mg/pl)	Teor (g/kg)	Total (kg/ha)	(kg/ha)	(g)
T1 – Não inoculado	20,4 b	65,0 b	4,55 b	38,4 b	174 c	44,1 b	176 b	4.001 b	16,6 ^{n.s}
T2 – Não inoculado + 200 kg de N	20,8 b	32,9 c	6,75 a	42,3 ab	286 a	43,7 b	177 b	4.048 b	16,7
T3 – IP turfoso	21,0 b	67,9 b	4,58 b	38,8 b	177 c	45,8 ab	184 b	4.025 b	16,0
T4 – I líquido	20,2 b	66,0 b	4,33 b	38,9 b	168 c	46,0 ab	185 b	4.020 b	16,1
T5 – Coinoculação comercial	28,9 ab	85,0 a	5,40 ab	42,0 ab	218 b	48,9 a	212 a	4.335 ab	16,5
T6 – Coinoculação com F3	26,3 ab	85,8 a	5,44 ab	45,7 a	249 ab	48,7 a	222 a	4.566 a	16,9
T7 – Coinoculação no com F3 no sulco	31,4 a	94,8 a	5,42 ab	46,6 a	252 ab	48,0 a	221 a	4.528 a	16,7
Valor de p	0,092	0,003	0,04	0,090	0,02	0,02	0,095	0,087	0,10

Fonte: O próprio autor. ^aT1) Controle não inoculado e sem N-mineral; T2) Controle não inoculado recebendo 200 kg de N/ha, 50% na semeadura e 50% no florescimento; T3) Inoculação padrão – Inoculante turfoso com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 milhões de células/semente; T4) Inoculação padrão – Inoculante líquido com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ de células/semente; T5) T4 + 1 dose de inoculante comercial líquido contendo 10⁸ células/semente de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 aplicado para fornecer 1,2 x 10⁵ de células/semente; T6) Formulação F3 – 1 dose na concentração de 10⁹ células/mL para *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e 10⁸ células/mL de *A. brasilense* Ab-V6; T7) Formulação F3 – 3 doses do tratamento T6. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ou a 10%; n.s., não significativo.

Tabela 27 – Eficiência agrônômica do inoculante F3 em soja cultivar BRS 1010IPRO em Londrina-PR em relação a diferentes inoculantes contendo *Bradyrhizobium* SEMIA 5079 e 5080 e *Azospirillum* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 na safra 2017/18.

Tratamento ^a	Estágio V5					Maturidade Fisiológica			
	Nodulação		Massa da parte aérea	N na parte aérea		N nos grãos		Rendimento	Massa de 100 grãos
	(n°/pl)	(mg/pl)	(g/pl)	Teor (g/kg)	Total (mg/pl)	Teor (g/kg)	Total (kg/ha)	(kg/ha)	(g)
T1 – Não inoculado	56,9 a	207 a	9,32 ^{n.s}	27,4 ^{n.s}	255 ^{n.s}	44,9 ^{n.s}	184 ^{n.s}	4.101 ^{n.s.}	17,3 ^{n.s}
T2 – Não inoculado + 200 kg de N	27,8 b	85 b	9,91	29,8	295	45,7	186	4.067	17,7
T3 – IP turfoso	54,8 a	215 a	8,66	31,9	276	45,3	187	4.137	17,3
T4 – I Líquido	55,0 a	210 a	8,50	31,8	270	45,1	184	4.080	17,1
T5 – Coinoculação	55,6 a	215 a	9,20	32,4	298	44,5	186	4.193	17,0
T6 – Coinoculação com F3	46,3 a	188 a	8,56	31,0	265	44,8	184	4.112	17,2
T7 – Coinoculação no sulco com F3	48,2 a	177 a	8,63	30,9	267	44,0	187	4.260	17,1
Valor de p	0,007	0,001	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

Fonte: O próprio autor. ^aT1) Controle não inoculado e sem N-mineral; T2) Controle não inoculado recebendo 200 kg de N/ha, 50% na semeadura e 50% no florescimento; T3) Inoculação padrão – Inoculante turfoso com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 milhões de células/semente; T4) Inoculação padrão – Inoculante líquido com 10⁹ células/g de *Bradyrhizobium* spp. aplicado para fornecer 1,2 x 10⁶ de células/semente; T5) T4 + 1 dose de inoculante comercial líquido contendo 10⁸ células/semente de *A. brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6 aplicado para fornecer 1,2 x 10⁵ de células/semente; T6) Formulação F3 – 1 dose na concentração de 10⁹ células/mL para *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 e 10⁸ células/mL de *A. brasilense* Ab-V6; T7) Formulação F3 – 3 doses do tratamento T6. Os dados representam médias de seis repetições e, quando seguidas por letras distintas, em cada coluna, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%; n.s. não significativo.

Resultados obtidos por Garcia (2015) indicaram que nas plantas não coinoculadas com *A. brasilense* houve menor nodulação e que os tratamentos com duas doses de *B. japonicum* + duas doses de *A. brasilense* em plantas de soja da cultivar TMG 1179RR resultaram na maior produtividade (3.581 kg/ha). Para a cultivar TMG 4182, porém, a maior produtividade foi conseguida pela inoculação simples com quatro doses de *B. japonicum*. Deak (2017) obteve, via coinoculação, acréscimos de 73% e 34% no número de nódulos em relação à testemunha não inoculada e à inoculação apenas com *B. japonicum*, respectivamente; além disso, o comprimento das raízes foi incrementado em cerca de 33% pela coinoculação.

O melhor desenvolvimento radicular atribuído à coinoculação é benéfico em várias etapas do desenvolvimento das plantas. A densidade radicular propicia à planta maior capacidade de absorção de nutrientes, maior área para infecção de rizóbios, resistência a estresses hídricos e acamamento decorrente de ventos intensos. Segundo Fernandes e Reis (2008), quando uma planta sofre estresse por déficit hídrico, vários processos metabólicos são afetados, incluindo a simbiose, pois com a desidratação do nódulo a atividade da nitrogenase diminui ou pode até cessar. Entretanto, se for por um período de seca curto, o nódulo se reidrata e a nitrogenase é reativada, recuperando o processo de FBN (Cerezine et al. 2015), principalmente quando se realiza a coinoculação com *Azospirillum*.

Os efeitos da restrição hídrica com 30% e 70% da capacidade de campo entre 45 e 55 dias em plantas de soja foram estudados por Cerezini et al. (2012), em que verificaram o decréscimo de massa da parte aérea seca e aumento de raízes em diferentes genótipos de soja. Em 2015, Cerezini et al. inocularam as estirpes SEMIAs 587, 5019 e 5080 de *Bradyrhizobium* spp. em soja sob restrição hídrica e verificaram, entre outros parâmetros, a diminuição na massa seca da parte aérea e N total nas plantas que sofreram estresse hídrico durante sete dias.

6. Conclusões

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho pode-se concluir que:

- As estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* apresentam maior crescimento e manutenção celular em meio de cultura com ácido málico como fonte de carbono;
- As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079 e *Bradyrhizobium diazoefficiens* SEMIA 5080 apresentam bom crescimento em meio de cultura com manitol e glicerol como fonte de carbono;
- O melhor momento de inoculação de *A. brasilense* no cultivo que já apresenta o crescimento de *Bradyrhizobium* spp. foi no terceiro dia, seguindo-se mais dois dias de crescimento para atingir a concentração de células adequada para as duas bactérias.
- Para *A. brasilense*, o protetor celular que proporcionou maior sobrevivência às células foi o glicerol a 1%;
- Para *Bradyrhizobium* spp., o protetor celular que proporcionou maior sobrevivência das células foi a mistura de 0,1% de amido de milho e 0,1% de CMC;
- A campo, a formulação F3 do coinoculante apresentou eficiência agrônômica estatisticamente igual à da coinoculação com produto comercial para coinoculação com registro consistindo de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em embalagens distintas, indicando a viabilidade comercial da formulação de coinoculante desenvolvida neste estudo;
- A campo, a formulação F3 do coinoculante resultou em incrementos significativos no rendimento de grãos, em relação ao inoculante líquido contendo apenas *Bradyrhizobium* spp., em quatro dos cinco ensaios conduzidos; no quinto ensaio, todos os tratamentos inoculados forneceram N suficiente às plantas, não diferindo estatisticamente do tratamento recebendo N-fertilizante;
- A alcalinização e a acidificação foram os principais fatores limitantes à manutenção celular nas formulações;
- Outras formulações promissoras para estudos futuros foram a F5 para *Bradyrhizobium* spp. e a F6 para coinoculante.

7. Referências Bibliográficas

- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. Response of the peanut plant to Inoculation with rhizobia, with special reference to morphological development of the nodules. **Botanical Gazette**, v.102, n.1, p.121-142, 1940
- ALMEIDA, F.R. F. Soja – cresce o plantio da soja. **Agroanalysis**, v.17, n.9, p.30-32, 1997.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ANOLLÉS, G.C. Molecular dissection and improvement of the nodule symbiosis in legumes. **Field Crops Research**, v.53, p.47-68, 1997.
- ARAÚJO, M. M. **Caracterização e seleção de linhagens de soja resistentes ou tolerantes à ferrugem asiática**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- BALATTI, A. P. **Producción de inoculantes para leguminosas: Tecnología de las fermentaciones aplicada a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium***. La Plata, Argentina. Editora Trabuco, Cap 4, p. 63-91, 153 p., 1992.
- BARBARO-TORNELI, I.; M. FINOTO, E. L.; TOKUDA, F. S.; MEDEIROS, C.N. F.; GASPARINO, A. C.; BORGES, W. L., B.; FREITAS, R. S.; MATHEUS, G. P.; HIPOLITO, J. L.; CAZENTINI-FILHO, G.; CASTELETI, M. L.; Influência de modos de aplicação da co-inoculação no desempenho agrônômico de soja. In: ENCONTRO TÉCNICO SOBRE AS CULTURAS DA SOJA E DO MILHO NO NOROESTE PAULISTA, 3, 2018, Araçatuba. Edição especial: **Anais...Local**: Editora, p. 105-114, 2018.
- BASHAN, Y., HERNANDEZ, J. -P.; LEYVA, L. A., BACILIO, M. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. **Biology and Fertility Soils**, v.35, p. 359–368, 2002.
- BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C. F.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in Cerrados soil. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 2, p. 270-284, 2007.
- BENINTENDE, S.; UHRICH, W.; HERRERA, M.; GANGGE, F.; STERREN, M.; BENINTENDE, M. Comparación entre coinoculación com *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense* e inoculación simple con *Bradyrhizobium*

japonicum en la nodulación, crecimiento y acumulación de N en el cultivo de soja. **Agriscientia**, v. 27, n. 2, p. 71-77, 2010.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BHUVANESWARI, T. V.; TURGEON, B. G.; BAUER, W. D. Early events in the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, v.66, p. 1027-1031, 1980.

BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E., G.; SUZUKAWA, A. K.; LIMA, L. H., S.; PICCININ, G. G. Co-inoculação e modos de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 15, n. 1, p. 27-35, 2016.

BRANDÃO JUNIOR, O.; HUNGRIA, M. Efeito de doses de inoculante turfoso na fixação biológica do nitrogênio pela cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 527-535, 2000.

BROWN, W. F.; ADJEI, M. B. Urea ammoniation effects on the feeding value of guineagrass (*Panicum maximum*) hay. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p.3085-3093, 1995.

BUSHBY, H. V. A.; MARSHALL, K. C., Some factors affecting the survival of rootnodule bacteria on desiccation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, p.143-147, 1977.

CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, v. 147, p. 1-9, 2014

CÂMARA, G. M. S. **Soja**:tecnologia de produção. Piracicaba: [s.n.], p. 278-293, 1998.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, p. 154-163, 2009.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p.28-35, 2009.

CASTELLEN, P. **Análise estrutural e funcional da região *glnBA* de *Azospirillum brasilense***. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Bioquímicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

CEREZINI, P.; FAGOTTI, D.S.L.; KUWANO, B.H.; SOUZA, D.I.; PÍPOLO, A.E., HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Fixação biológica de nitrogênio em genótipos de soja com diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 6., 2012, Cuiabá. Soja: integração nacional e desenvolvimento sustentável. **Anais**.... Brasília, DF: Embrapa, 2012.

CEREZINI, P.; PELAQUIM, J.A.P.; KUWANO, B.H.; GRUNVALD, A.K.; PÍPOLO, A.E.; HUNGRIA M.; NOGUEIRA, M.A. Inoculação de diferentes estirpes de *bradyrhizobium* em soja sob restrição hídrica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 7.; MERCOSOJA, 2015, Florianópolis. Tecnologia e mercado global: perspectivas para soja: **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2015.

CHIBEBA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.; BRITO, O.; ARAUJO, R.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soy bean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v.6, p.1641-1649, 2015.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C., VAN VEEN, J.A.. **Fixação de nitrogênio por *Azospirillum brasilense* no solo e na rizosfera sob condições ambientais controladas.** Biol Fertil Soils 12, 100-106, 1991.

CONAB. **Calendário de plantio e colheita de grãos no Brasil 2017.**

Disponível em: <https://www.conab.gov.br/outras-publicacoes/item/download/21099_79625cc8ceb43fb85f49cea4961b0ea6>. Acesso em 23 jul. 2018.

CONAB. **V. 6 - SAFRA 2018/19- N. 4 - Quarto levantamento | JANEIRO 2019.** Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>> Acesso em 12fev. 2019.

DALL' AGNOL, A.; VIDOR, C. **A saga da soja no Brasil: uma trajetória de sucessos.** Londrina: EmbrapaSoja, 2002.

DATE, R. A. Legume inoculant production. **Proceedings Indian National Science Academy**, New Delhi, v. 40, n. 6, p. 667-686, 1976.

DE LEY, J.; RASSEL, A. A. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. **Journal of General Microbiology**, v. 41, p. 85–91, 1965.

DEAK, E. A. Temperatura e umidade do solo na co-inoculação na cultura da soja. 81f. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Salta Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-graduação em Agronomia, RS, 2017.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, J. D.; KENNEDY, I. R. Desiccation tolerance of rhizobia when protected by synthetic polymers. **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, n.2, p.573–580, 2007.

DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; ORMENÕ-ORRILLO, E.; MELO, I.S.; MARTINÉZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p.3342–3351, 2013.

DILWORTH, M.J.; RYNNE, F.G.; CASTELLI, J. M.; VIVAS-MARFISI, A.I.; GLENN, A.R. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. **Microbiology**, v. 145, p.1585-1593, 1999.

DJORDJEVIC, S. P.; CHEN, H.; BATLEY, M.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**, v. 169, p. 53-60, 1987.

DÖBEREINER, J. History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Itaguaí: Embrapa-CNPAB, 60p., 1995.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers; Berlin: Springe-Verlag. 155 p., 1987.

DONAGEMA, G. K.; CAMPOS, D. V. B.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. H. M. (orgs). **Manual de métodos de análise de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 230 p., 2011.

DSMZ. **Prokaryotic nomenclature up-to-date**. Disponível em <<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>>. Acesso em 10 fev. 2019.

ECKERT, B., WEBER, O. B., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M., HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 17-26, 2001.

ELMERICH, C. Historical perspective: from bacterization to endophytes. In: ELMERICH C.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations**. Dordrecht: Springer, 321 p., 2007.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - Região Central do Brasil - 2004**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/451526/tecnologias-de-producao-de-soja---regiao-central-do-brasil-2004>>. Acesso em 21 Dez. 2018.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja – Região Central do Brasil - 2007**. Londrina: Embrapa Soja, 2006. 225 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 11).

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

FARIA, S. M.; HAY, G. T.; SPRENT, J. I. Entry of rhizobia into roots of *Mimosa scabrella* Benth occurs between epidermal cells. **Journal Genetic Microbiology**, v.134, p.2291-2296, 1988.

FARIA, S. M.; JESUS, R. M.; FRANCO, A. A. Field establishment of nodulate *Leucaena leucocephala* K-72. **Leucaena Research Reports**, v. 6, p. 14-16, 1985.

FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 14, p. 89-106, 2007.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames, US: Iowa State University, 12 p. (Special Report, 80), 1977.

FEI, H.; VESSEY, J.K. Further investigation of the roles of auxin and cytokinin in the NH₄⁺ 1-induced stimulation of nodulation using white clover transformed with the auxin-sensitive reporter GH3: gusA. **Physiologia Plantarum**, v.12, p.674–681, 2004.

FEIGL, F.; ANGER, V. **Spot tests in inorganic analysis**. 6th ed. Amsterdam: Elsevier, 668 p, 1972.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosa**. 43f. Seropédica: UFRRJ. 2006. (Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo), 2006.

FERNANDES JÚNIOR, P.I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 33p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252), 2008.

FERNANDES JÚNIOR, P.I. Polímeros como veículos para formulação de inculantes de rizóbios. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1184-1190, 2009.

FIESP (Federação das Indústrias do Estado de São Paulo). **Safra mundial de soja 2018/19 – 8º Levantamento do USDA**. Disponível em <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-soja/attachment/file-20181212131922-boletimsojadezembro2018/>>. Acesso em: 10 Jan. 2019.

FREITAS, C. S.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER G. R.; OLIVEIRA, P. J. Desenvolvimento de veículo de inoculação a base de spirulina/carboximetil celulose: estudo da viscosidade, da estabilidade e da sobrevivência de células de rizóbio. –In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, 21, Cuiabá, MT. Anais... 214.P. 7377-7383., 2014

FREITAS, D. S., R.; SOUZA, J. E. B.. Resposta agrônômica da soja, inoculada com diferentes doses de *Bradyrhizobium* em solo de 1º ano. **Ipê Agronomic Journal**, v.1, n. 1, p. 58-70, 2017.

FREIRE, J. R. J. Trabalhos em rizobiologia no Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA. INOCULANTES LEGUMINOSA, 4., 1968, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, s.n., p. 19-24, 1968.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A. A pesquisa com a soja, a seleção de rizóbios e a produção de inoculantes no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 5, p. 1-25, 1999.

FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; DE LA OSA, C.; VALDERRAMA-FERNÁNDEZ, R.; MEGÍAS, G.; HUNGRIA, M. Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Archives of Microbiology**, v.200, p.1191-1203, 2018.

GARCIA, M. V.C.; FERREIRA, E.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Avaliação da sobrevivência de *Bradyrhizobium* em sementes de soja na presença de agrotóxicos. In: RELARE, 19., 2016, Londrina. **Anais...Londrina: a.n.**, p. 26, 2016.

GARCIA, A. **Doses de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas, na produção e na qualidade fisiológica de sementes de soja.** 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistema de Produção, 2015 Ilha Solteira, 2015.

GOORMACHTIG, S., CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes. **Trends in Plant Science**, v.9, n. 11, p. 518-522, 2004.

HARTMANN, A. Ecophysiological aspects of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. In: SKINNER, F. A.; BODDEY, R. M.; FENDRIK, I., (Ed.). **Nitrogen fixation with non-legumes**. London: Kluwer, p. 123-136, 1989.

HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. The genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDT, E., (Ed.). **The Prokaryotes**: v. 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses. New York, NY: Springer New York, p.115-140, 2006.

HOLLIS, A. B.; KLOOS, W. E.; ELKAN, G. H. DNA:DNA hybridization studies of *Rhizobium japonicum* and related Rhizobiaceae. **Journal of General Microbiology**, v.123, n.2, p.215-222, 1981.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum* sp.**: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, Argentinap.17-35, 2008.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasiliense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325), 2011.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soy bean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. v.2. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., p.1005-1019, 2015.

- HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchange between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 519-530, 1997.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crop Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R.J..Efeito dos fungicidas na sobrevivência de bradyrhizobium e na nodulação e fixação biológica do nitrogênio com a cultura da soja: incompatibilidade com a aplicação na semente e dose de inoculante para a aplicação no sulco. In: RELARE, 15., Londrina. **Anais...**Londrina, s.n. p. 53., 2016, 2012.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283), 2007.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina, Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516- 7860; n.35), 2001.
- HUNGRIA, M.; MENNA, P.; DELAMUTA, J.R.M. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. In: DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**.v.1. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.,2015. p.191-202.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v.49, n.7, p.791-801, 2013.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p.9-89, 1994.
- JONES, K. M.; KOBAYASHI, H.; DAVIES, B. W.; TAGA, M. I. M.; WALKER, G. C. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. **Nature Review Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 619-633, 2007.
- JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 136–139, 1982.
- KEYSER, H. H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B. B. Rhizobial ecology and technology. In: MEETING, F.B. (Ed.). **Soil microbial ecology**: applications in agricultural and environmental management. New York, NY: Marcel Dekker, Inc, p. 205-226, 1993.
- KREMER, R. J.; PETERSON, H. L. Effects of carrier and temperature on Survival of *Rhizobium* spp. in legume inoculant: development of an improved

type of inoculant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1790-1794, 1983.

KUMARESAN, G.; REETHA, D. Survival of *Azospirillum brasilense* in liquid formulation amended with different chemical additives. **Journal of Phytology**, v. 3, n. 10, p. 48-51, 2011.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL; S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan (1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 501-505, 1992.

KUZMA, M.M.; WINTER, H.; STORER, P.; ORESNIK, I.; ATKINS, C. A.; LAYZELL, D.B. The site of oxygen limitation in soybean nodules. **Plant Physiology**, v.119, p.399–407, 1999.

LEHNINGER, A. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, 2ª ed., Ribeirão Preto: Editora Sarvier, 319 p., 2004.

LEO DANIEL, A. E.; VENKATESWARLU, B.; SUSEELENDRA, D.; PRAVEEN, K. G.; MIR H. A. S. K.; MEENAKSHI, T.; UZMA, S.; SRAVANI, P.; LAKSHMI, N. M. Effect of polymeric additives, adjuvants, surfactants on survival, stability and plant growth promoting ability of liquid bioinoculants. **Journal of Plant Physiology & Pathology**, v. 1, p. 1-5, 2013.

LOPES, A.C.A.; VELLO, N. A.; PANDINI, F.; ROCHA, M. M.; TSUTSUMI, C. Y. Variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. **Scientia Agrícola**, v. 59, p. 341-348, 2002.

LOPRETO, C.R., MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generación de una cepa de *Rhizobium japonicum*. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* v.193 p. 35-47, 1972.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 30**, de 12 de novembro de 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-30-2010-dou-17-11-10-metodo-inoculantes.pdf>>. 2010. Acesso em 12 jan. 2019.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13**, de 24 de março de 2011. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. 2011a. Acesso em 12 jan. 2019.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **ANEXO à IN SDA 13**, de 25 de março de 2011. Protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionado ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos->

agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>. 2011b. Acesso em 12 jan. 2019.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 14, DE 13 DE ABRIL DE 2018**. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/fertilizantes-substratos/InstruoNormativan14_2018.pdf/view>. 2018. Acesso em 20 abr. 2018.

MARTINEZ-DRETS, G.; ARIAS, A. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing groups. **Journal of Bacteriology**, v. 109, p. 467-470, 1974.

MENDANHA SANTOS, K. M. Co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum* na soja como estratégia para aumento de produtividade e redução do uso de nitrogênio. 32f. TCC Faculdade Evangélica de Goianésia – FACEG, Goianésia, 2018.

MERCANTE, F. M. **Uso de inoculante garante economia de 3 bilhões de dólares na cultura soja no país**. Disponível em <http://www.embrapa.br/noticias/artigos> Acesso em 21 de nov. 2018.

MESCHEDE, D. K.; BRACCINI, A. L.; BRACCINI, M. C. L.; SCAPIM, C. A.; SCHUAB, S. R. P. Rendimento, teor de proteínas nas sementes e características agronômicas das plantas de soja em resposta à adubação foliar e ao tratamento de sementes com molibdênio e cobalto. **Acta Scientiarum, Agronomy**, v. 26, n. 2, p. 139-145, 2004.

MIGUEL, D.L.; MOREIRA, F.M.S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 873-883, 2001.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S., SIQUEIRA, J. O., BRUSSARD, L. Soil organisms in tropical ecosystems: a key role for Brazil in the global quest for the conservation and sustainable use of biodiversity. In: MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J. O., BRUSSARD, L. (Eds.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallingford UK: CABI Publishing, 2016. p.1-12.

MULLER, I. Fixação simbiótica do nitrogênio. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 401-414.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1513-1519, 2003.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por

Xanthomonas campestris C7 L1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.

NUKUI, N.; EZURA, H.; YUHASHI, K. –I.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosyntheses and perception and nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. **Plant&Cell Physiology**, v.41, n.7, p.803- 807, 2000.

OLDROYD, G. E. D.; DOWNIE, J. M. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 519-546, 2008.

ORTEGA FILHO, S.; BRONDI, E. O. Produção de plástico biodegradável a partir da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E. (Org.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livrocere, 2006. p. 377-384.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. M5SP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanuscajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, n. 2, p. 213-22, 2007.

PARDINHO, J. P.; PRIMIERE, C. Produtividade da soja em relação à inoculação e co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. **Revista Cultivando o Saber**, Edição Especial, p. 109 –114, 2015

PARKER, C. A. The significance of acid and alkali production by rhizobia on laboratory media. In: AUSTRALIAN LEGUMEINOCULANTS CONFERENCE, 4., 1971, Canberra. Proceedings. Melbourne, CSIRO, 3p., 1971.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BABENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. Bacterial associations with legumes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 37, p. 17-42, 2015.

PEÑA, J. J.; DÖBEREINER, J. **Effects of ammonia and nitrate in nitrogenase activity of tropical nitrogen fixing bacteria**. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE OS IMPACTOS GLOBAIS DA MICROBIOLOGIA APLICADA, 4. São Paulo. Abstracts... São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1973. p. 1148, 1973

PESSOA, A. C. S.; LUCHESE, E. B.; CAVALLET, L. E.; GRIS, E. P. Produtividade da soja em resposta à adubação foliar, tratamento de sementes com molibdênio e inoculação *Bradyrhizobium japonicum*. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 531-535, 1999.

PIRT, S.J. Energy and carbon source requirements. In: Principles of microbe and cell cultivation. Oxford. Blackwell Scientific Publications, p. 63-80, 1975.

POOLE, P. S. Physiology of root-nodule **bacteria**. In: DILWORTH, M. C. (Ed.) **Nitrogen-fixing leguminous symbioses**. Dordrecht: Springer, p. 241-292, 2008.

PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M.S.; URENHA, L. C.. Produção de inoculantes agrícolas. In: LIMA, U. A.. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. v.3São Paulo: E. Blucher, p. 279-305, 2001.

QUADROS, P. D. de. Inoculação de *Azospirillum* sp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul. 74 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2009.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 285 p., 2001.

REIS, V.M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S. (Ed). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.153-174, 2006.

RENGEL, S. D.; MEERT, L.; HANEL, A.; ESPINDOLA, J. S.; BORGHI, W. A.. Diferentes inoculantes e formas de inoculação e sua influência sobre os componentes de produção e teor de nitrogênio da cultura da soja. **Revista Campo Digit@l**, v. 13, n. 1, p.46-51, jul./dez., 2018.

RICKARD, D.J.; MONROE, D.G.; RUESINK, T.J.; KHOSLA, S.; RIGGSB, L.; SPELSBERG, J. Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. **Journal of Cell Biochemistry**, v.89, n.3, p.633-646, 2003.

RINAUDI, L.V.; GIORDANO, W. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. **FEMS Microbiology Letters**, v.304, p.1-11, 2010.

ROBERTO, V. M. O.; SILVA, C.D.; LOBATO, N. P. Resposta da cultura do milho a aplicação de diferentes doses de inoculante (*Azospirillum brasilense*) via semente. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010. Goiania. **Anais...** Goiânia:s.n., p. 2429-2434, 2010.

ROHR, T. G. **Estudo reológico da mistura carboximetilcelulose/amido e sua utilização como veículo de inoculação bacteriano**. 124 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

ROSA, D. R.; FRANCO, B. L. M.; CALI, M. R. Biodegradabilidade e propriedades mecânicas de novas misturas poliméricas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.11, n.2, p. 82-88, 2001.

RUFINI, M.; FERREIRA, P. A. A.; SOARES, B. L.; OLIVEIRA, D. P.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p.81-88, 2011.

RYLE, G.J. A.; POWELL, C. E.; GORDON, A. J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soyabean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v.30, p.145-153, 1979.

SANTOS, M. S.. **Desenvolvimento de novas formulações líquidas de inoculantes para *Azospirillum brasilense* estirpes Ab-V5 e Ab-V6**. 86 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

SCHMIDT, J.S.; HARPER, J. E.; HOFFMAN, T. K.; BENT, A. Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. **Plant Physiology**, v.119, p.951– 959, 1999.

SCHONINGER, E.L.; LANGE, A.; SILVA, A. F.; LEMKE, A. F.; MONTEIRO, S.; SILVA, J. A. N. Atributos químicos do solo e produtividade da cultura de soja em área de semeadura direta após calagem superficial. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 1253-1262, 2010.

SEDIYAMA, T. (Org.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecenias, 2009. 314 p.

SILVA, F. C. (Ed. Técnico). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**, 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 627 p. (ISBN 978-85-7383-430-7), 2009.

SILVA, L. R. **Produção experimental de inoculantes agrícolas a base de *Azospirillum* spp. para fixação biológica de nitrogênio em gramíneas e forrageiras**. 137 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SINGH, P.; KUMAR, V.; AGRAWAL, S. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, Article ID 426483, 2014.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia**. New York: SpringerVerlag, 1994. 470 p.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, v. 65, p. 249-258, 2000.

STREETER, J.G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 484–491, 2003.

SPRENT, J.I. **Nodulation in legumes**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2001.146p. 2001.

SUGANUMA, N.; TAMAOKI, M.; KOUCHI, H. Expression of nodulin genes in plant-determined ineffective nodules of pea. **Plant Molecular Biology**, v. 28, p. 1027-1038, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. SANTARÉM, E. R. (Trad.). **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb.nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967-980, 1978.

- TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch-composition, fine structure and architecture **Journal of Cereal Science**, v.39, n.2, p. 151–165,2004.
- TEMPRANO, F., ALBAREDA, M., CAMACHO, M. et al. **Sobrevivência de várias cepas de *Rhizobium* / *Bradyrhizobium* em diferentes formulações de inoculantes e sementes inoculadas**. *Int Microbiol* 5, 81–86, 2002.
- THAKUR, B.; AMARNATH, C. A.; MANGOLI, S. H.; SAWANT, S. N. Polyaniline nanoparticle base colorimetric sensor for monitoring bacterial growth. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 2017, p. 262-268, 2015.
- TIMMERS, A.C.J.; AURIAC, M. C.; TRUCHET, G.. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Development**, v.126, p.3617-3628, 1999.
- TITTABUTR, P.; PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONG, N.; SINGLETON, P.W.; BOONKERD, N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**, v. 33, n. 1, p. 69-77, 2007.
- TRUJILLO-ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; GONZALEZ-MONTECUBIO, C. F.; ACEVEDO-SÁNCHEZ, E. V.; MARTÍNEZ-SALINAS, C.; GARCÍA-CABRERA, R. I.; GAMBOA-SUASNAVART, R. A.; MARÍN-PALACIO, L. D.; VILLEGAS, J.; BLANCAS-CABRERA, A. Scale-up from shake flasks to pilot-scale production of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* for preparing a liquid inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 22, p.9665-9674, 2013.
- VADEZ, D.; SINCLAIR, T. R.; SERRAJ, R.; PURCELL, L. C. Manganese application alleviates the water deficit-induced decline of N₂ fixation. **Plant, Cell and Environment**, v.23, p.497-505, 2000.
- VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio em soja, In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos de cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 295-360.
- VINCENT, J.M. *Rhizobium*: General microbiology. In: HARDY R.W.F.; SILVER, W. (Ed.). **A treatise on dinitrogen fixation**. Sec III. New York: John Wiley and Sons, p. 277-366, 1977.
- YASURIYAN, V.; HAMEED, M.S.; RAJ, S.A. Influence of adhesives and time lag between seed treatment and sowing on survival of rhizobia and crop response to inoculation. **Madras Agricultural Journal**, v. 83, p. 488-490, 1996.
- WALSH, K.B. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, n.4/5, p.637- 655, 1995.
- WESTBY, C. A.; CUTHAIL, D. S.; VIGIL, G. V. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 156, p. 1369-1372, 1983.

WESTBY, C. A.; ENDERLIN, C. S.; STEINBERG, N. A.; JOSEPH, C. M.; MEECKS, J. C. Assimilation of NH_4^+ by *Azospirillum brasilense* grown under nitrogen limitation and excess. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.4211-4214, 1987.

WILLEMS. A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, p. 3-14, 2006.

ZHAO, X.; MA, F.; LI, P.; LI, G.; ZHANG, L.; ZHANG, Q., ZHANG, W.;WANG, X. Simultaneous determination of isoflavones and resveratrols for adulteration detection of soybean and peanut oils by mixed-mode SPE LC-MS/MS. **FoodChemistry**, v. 176, p. 465-71, 2015.

ZILLI, J. E.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.3, p. 335-338, 2010.

8. ANEXO 1 – Meios de Cultivo e Soluções

Tabela 28 – Composição da solução salina 0,85%

Composto	Composto Concentração (g/L)
NaCl	8,5

Tabela 29 – Composição do meio de cultivo YM (Yeast Mannitol)

Composto	Concentração (g/L)
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02
NaCl	0,1
Manitol	5,0 a 10
Extrato de levedura	0,4

pH 6,8 – 7,0

Para o preparo do meio de cultura Yeast-Mannitol-Agar (YMA) deve-se adicionar 10 a 15 g de Ágar bacteriológico ao meio YM (Tabela 29) de acordo com a IN N° 30, de 12 de novembro de 2010 (MAPA, 2010). Além deste, deve ser adicionado ao meio 10 mL de solução de vermelho Congo (Tabela 31) e completar para 1 litro com água destilada, o pH deve ser ajustado entre 6,8-7,0.

Tabela 30 – Composição do meio de *Agar Rojo Congo* (RC)

Composto	Concentração (g/L)
NaCl	0,01
Extrato de Levedura	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
KOH	4,8
Ágar bacteriológico	15

pH 6,8 – 7,0

A composição do meio RC (Tabela 30) foi modificado de RODRIGUEZ-CÁCERES (1982) quanto ao teor de NaCl, que de 0,1 passou a ser 0,01, adição de 5 g/L de ácido málico e pela presença de 0,023 mL de solução EDTA-Ferro (1,64%). Além destes compostos, devem ser adicionados

ao meio 15 mL de solução de vermelho Congo (Tabela 31) e completar para 1 litro com água destilada.

Tabela 31 – Composição da solução de Vermelho Congo 0,25%

Composto	Concentração (g/L)
Vermelho Congo	2,5

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ-CÁCERES, 1982.