

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

BIOPOLÍMEROS COMO SUPORTE PARA INOCULANTES

Carlos Alberto Schuh
(Dissertação)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

BIOPOLÍMEROS COMO SUPORTE PARA INOCULANTES

CARLOS ALBERTO SCHUH
Farmacêutico-Bioquímico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Fixação Biológica de Nitrogênio).

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril de 2005

À minha querida esposa Fátima, pelo incentivo e apoio durante o período em que estive ausente e à minha filha Elise, por ter suportado a ausência do “pabi”.

AGRADECIMENTOS

Aos professores, Enilson Luiz Saccol de Sá (Orientador) e João Rui Jardim Freire (Co-Orientador), pelos ensinamentos transmitidos e pela atenção dispensada.

Ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Faculdade de Agronomia da UFRGS pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão de bolsa de estudo.

À Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII), pelo aporte de recursos ao projeto.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS: Andréia, Andressa, Cássia, Jonatas, Márcia, Mariel, Rafael e Rodrigo pela amizade e camaradagem.

Aos funcionários da UFRGS: Márcio pela assistência nos trabalhos desenvolvidos no laboratório de microbiologia do solo; Antônio (Tonho) pelo auxílio prestado nas análises e José (Zé) pela ajuda nos trabalhos na casa de vegetação.

BIOPOLÍMEROS COMO SUPORTE PARA INOCULANTES ⁽¹⁾

Autor: Carlos Alberto Schuh

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

A utilização de inoculantes em culturas de leguminosas é uma prática conhecida e empregada há longo tempo e o substrato mais utilizado até o momento tem sido a turfa. Diversos tipos de formulações inoculantes que existem no mercado visam oferecer uma alternativa ao emprego da turfa, porém muitas apresentam baixa capacidade para manter a sobrevivência e eficiência dos rizóbios. Este trabalho avaliou a utilização de catorze misturas diferentes de polímeros naturais e/ou sintéticos como suportes para inoculantes, visando a produção de inoculantes comerciais para soja, e a capacidade de manter a sobrevivência e preservar as características de infectividade e de efetividade das estirpes SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*. Avaliou-se a sobrevivência dos rizóbios nas formulações armazenadas, a capacidade de aderência das formulações em sementes, a sobrevivência dos rizóbios em sementes a 40 °C e a eficiência dos inoculantes em plantas de soja, cultivadas em vasos com solo, submetidas a estresse hídrico e térmico. Observou-se que as misturas contendo goma xantana, jataí e guar, tanto nas formulações em gel como líquidas, podem ser usadas como veículo para inoculantes proporcionando maior proteção aos rizóbios contra as condições de dessecação e temperatura. Todos os inoculantes mantiveram a sobrevivência da população de rizóbios durante um ano de armazenamento. Os rizóbios das formulações G5, L1 e L7, que continham goma arábica, foram afetados pelo estresse hídrico e pelas temperaturas elevadas, reduzindo o número de nódulos formados. Dentre as formulações líquidas, as que continham xantana e glicerol (L2) e com adição de polivinilpirrolidona (L5) e a formulação que continha xantana, carboximetilcelulose e polivinilpirrolidona (L6), foram as mais promissoras para a formulação de inoculantes para soja.

⁽¹⁾ Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (81p.) Abril, 2005.

BIOPOLIMERS AS A SUPPORT TO INOCULANTS ⁽¹⁾

Author: Carlos Alberto Schuh

Advisor: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

The inoculant utilization on legume crops is an agricultural procedure known for a long time. Peat is the most common inoculant carrier used so far. Several types of inoculant formulations are commercialized as an alternative to peat carrier inoculant but some of them have low capacity to sustain the survival of the Rhizobia. This research evaluated the utilization of fourteen different mixtures of naturals and/or synthetic biopolymers as inoculant carrier, in order to use for the industrial production of inoculants for soybean, and the capacity for sustaining the rhizobial survival and to preserve the infectivity and effectivity of *Bradyrhizobium japonicum* strain SEMIA 587 and *Bradyrhizobium elkanii* strain SEMIA 5079. The rhizobial survival in the inoculant formulations was evaluated during the storage period of one year. Also, were evaluated the inoculant formulations capacity to adhere on soybean seeds, the survival of rhizobia on seeds stored at 40 °C and the efficiency of the formulations inoculated on soybean plants cropped in vessels with soil, under water and temperature stress. It was observed that mixtures containing xanthan, locust bean and guar gum, either on gel or liquid formulations, could be used as legume inoculant carrier given better protection to rhizobia against desiccation and high temperature. All the inoculants studied kept the survival of Rhizobia population during a year of storage. The rhizobia in the inoculant formulations G5, L1 and L7, containing arabic gum, were affected by water and high temperature stresses reducing the number of nodules formed. Among the liquid formulations, those containing xanthan gum and glycerol alone (L2) and with polyvinylpyrrolidone (L5) and that containing xanthan gum, carboxymethylcellulose and polyvinylpyrrolidone (L6) appeared as promising as inoculant carriers.

⁽¹⁾ Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (81 p.) April, 2005.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Tipos de inoculantes	6
2.2 Uso de biopolímeros como suporte para inoculantes	7
2.2.1 Goma xantana	8
2.2.2 Galactomananas	9
2.2.3 Polivinilpirrolidona	11
2.2.4 Polivinilálcool	12
2.2.5 Carboximetilcelulose sódico	13
2.3 Fatores que interferem na nodulação e na fixação do N ₂	14
2.3.1 Qualidade do inoculante	14
2.3.2 Temperatura e umidade	15
2.3.3 Nitrogênio mineral	16
2.3.4 pH do solo	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Elaboração das formulações inoculantes a base de biopolímeros e a base de turfa	18
3.1.1 Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> utilizadas no experimento ..	19
3.1.2 Preparo dos inóculos com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079.....	19
3.1.3 Formulação dos inoculantes a base de biopolímeros	20
3.1.4 Injeção dos caldos de cultivo nas formulações a base de biopolímeros	22
3.1.5 Formulação dos inoculantes a base de turfa	22
3.2 Avaliação da sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 nos inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros	23
3.3 Avaliação da aderência nas sementes de soja com os inoculantes formulados a base de turfa e a base de biopolímeros	23
3.4 Avaliação do desempenho dos inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros na cultura de soja em solo não inoculado	25

3.4.1	Avaliação da sobrevivência dos rizóbios em sementes de soja inoculadas em solo sob condições de estresse hídrico	28
3.4.2	Avaliação da sobrevivência dos rizóbios em sementes de soja inoculadas em solo sob condições de estresse térmico	28
3.5	Remoção do nitrogênio residual do solo dos vasos	29
3.6	Avaliação do desempenho dos inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros na cultura de soja em solo inoculado	30
3.7	Avaliação da sobrevivência das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> nas sementes de soja	30
3.8	Análise estatística	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	Avaliação da sobrevivência das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> nos inoculantes formulados	32
4.2	Aderência das formulações em sementes e soja	35
4.3	Avaliação da sobrevivência dos rizóbios em sementes de soja inoculadas em solo sob condições de estresse hídrico	37
4.3.1	Avaliação em solo de primeiro cultivo	37
4.3.2	Avaliação em solo de segundo cultivo	41
4.4	Avaliação da viabilidade dos rizóbios dos inoculantes em sementes de soja no solo sob condições de estresse térmico	43
4.4.1	Monitoramento da temperatura do solo nos vasos de primeiro cultivo	44
4.4.2	Avaliação da inoculação com as diferentes formulações, em vasos com solo de primeiro cultivo submetidos a estresse térmico	44
4.4.3	Monitoramento da temperatura do solo nos vasos de segundo cultivo	49
4.4.4	Avaliação da inoculação com as diferentes formulações, em vasos com solo de segundo cultivo submetidos a estresse térmico	50
4.5	Avaliação da sobrevivência das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> inoculadas em sementes de soja	54
4.5.1	Avaliação na temperatura de 28 °C	54
4.5.2	Avaliação na temperatura de 40 °C	55
4.5.3	Taxa de mortalidade a 40 °C.....	57
5	CONCLUSÕES	60
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
7	APÊNDICES	70

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1	Composição dos inoculantes formulados a base de biopolímeros e proporção da mistura de polímeros em relação à quantidade total de polímeros utilizada 21
Tabela 2	Massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos por planta de soja cultivada em vasos com solo de primeiro cultivo e submetida à irrigação na semeadura ou cinco dias após, a partir de sementes inoculadas com os diferentes inoculantes 40
Tabela 3	Massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos de plantas de soja cultivadas em vasos com solo de segundo cultivo e submetidas à irrigação na semeadura ou cinco dias após, a partir de sementes inoculadas com os diferentes inoculantes 42
Tabela 4	Massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos por planta de soja, inoculada com as diferentes formulações inoculantes, cultivada em vasos com solo de primeiro cultivo e submetida a estresse de temperatura em casa de vegetação 47
Tabela 5	Massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos de plantas de soja, inoculadas com as diferentes formulações inoculantes, cultivadas em vasos com solo de segundo cultivo e submetidas a estresse de temperatura em casa de vegetação 51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 nos inoculantes na forma de gel comparados com o inoculante a base de turfa	33
Figura 2 Sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 nos inoculantes na forma líquida comparados com o inoculante a base de turfa	34
Figura 3 Número de células viáveis aderidas na superfície das sementes de soja inoculadas com as diferentes formulações inoculantes	36
Figura 4 Variação da temperatura do solo nos vasos submetidos a estresse térmico durante os primeiros 10 dias após a inoculação e plantio em solo de primeiro cultivo	45
Figura 5 Variação da temperatura do solo nos vasos submetidos a estresse térmico durante os primeiros 10 dias após a inoculação e plantio em solo de segundo cultivo	49
Figura 6 Avaliação do número de células viáveis após inoculação em sementes de soja e armazenamento na temperatura de 28 °C por 24, 48 e 72 horas e comparadas com a contagem inicial	55
Figura 7 Avaliação da sobrevivência das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> das formulações após inoculação em sementes de soja e armazenadas na temperatura de 40 °C por 24, 48 e 72 horas e comparadas com a contagem inicial	56
Figura 8 Taxa de mortalidade calculada para o número de células viáveis de <i>Bradyrhizobium</i> , aderidas a sementes de soja e armazenadas na temperatura de 40 °C por 72 horas	58

LISTA DE APÊNDICES

	Página
Apêndice 1 Características físico-químicas da turfa utilizada como veículo para elaboração da formulação inoculante turfoso	71
Apêndice 2 Meio de cultivo extrato de levedura-manitol - LMAV.....	72
Apêndice 3 Meio de cultivo extrato de levedura-glicerol	73
Apêndice 4 Meio de cultivo agar-glicose-peptona	74
Apêndice 5 Análise do solo utilizado no experimento de primeiro cultivo	75
Apêndice 6 Análise do solo utilizado no experimento de segundo cultivo.....	76
Apêndice 7 Valores de pH dos inoculantes formulados a base de biopolímeros e de turfa, ao longo de 12 meses de estocagem em condições de ambiente	77
Apêndice 8 Valores de temperatura do solo nos vasos de primeiro cultivo, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura	78
Apêndice 9 Variação da temperatura ambiente nas casas de vegetação, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura nos vasos de primeiro cultivo	79
Apêndice 10 Valores de temperatura do solo nos vasos de segundo cultivo, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura.	80
Apêndice 11 Variação da temperatura ambiente nas casas de vegetação, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura nos vasos de segundo cultivo	81

1 INTRODUÇÃO

O cultivo da soja, a oleaginosa mais importante produzida no Brasil, tem crescido muito com a abertura de novas fronteiras agrícolas, com destaque para as regiões do cerrado. Esta expansão agrícola, bem como a implantação de outras culturas de leguminosas, causou um aumento de demanda para os inoculantes, incentivando o aparecimento de diversas indústrias produtoras.

A prática da inoculação das sementes de leguminosas com bactérias fixadoras de nitrogênio vem sendo feita há muitos anos e tem contribuído significativamente para o aumento dos rendimentos na produção de grãos, com maior lucratividade na atividade agrícola e ajudando na preservação do meio ambiente.

Os diferentes tipos de inoculantes que existem no mercado, buscam uma alternativa técnica viável em substituição à turfa, pois procuram reduzir os custos de produção e facilitar a aplicação do produto na semente no momento da semeadura, bem como manter a sobrevivência e a eficiência do rizóbio em condições de campo. No entanto, as condições de armazenamento, técnicas de inoculação, tratamentos das sementes, semeadura e de cultivo são diferentes em cada lavoura e podem afetar significativamente a sobrevivência do rizóbio. Desta forma as pesquisas para obtenção de novas formulações que possam vir a substituir, com eficiência, a turfa como suporte nos inoculantes,

bem como a análise constante dos novos produtos, torna-se de extrema importância.

As qualidades desejadas para um adequado suporte são: facilidade de obtenção e baixo custo, ser inerte ao rizóbio, deve ser facilmente esterilizável (autoclave ou radiação), proporcionar boa adesão às sementes, manter as características de infectividade e efetividade das estirpes inoculadas durante o período de estocagem e não ser tóxico às pessoas, animais e plantas (Keyser, 1992).

O suporte mais freqüentemente utilizado para a produção de inoculantes é a turfa. Isso se deve ao grande número de estudos disponíveis e que indicam que ela proporciona uma melhor proteção ao rizóbio, tanto na embalagem, como depois de aplicada nas sementes, pois devido a sua composição, rica em nutrientes, o rizóbio pode crescer na turfa sem que seja necessária a suplementação de nutrientes. No entanto, é importante lembrar que a composição físico-química da turfa nem sempre a qualifica como um bom veículo, pois dependendo de onde provem, pode não ter as características necessárias para a sobrevivência das bactérias. Deve-se levar em conta também, que a turfa não está disponível em alguns países e que representa um recurso natural não renovável.

Diversas substâncias como: argila, carvão, lignita, perlita, fosfato de rocha, talco, poliacrilamida, gomas naturais, alginatos, entre outras, tem sido estudados para uso como suporte para inoculantes, destacando-se as formulações feitas a partir de polímeros naturais ou sintéticos, que podem

fornecer as características desejadas ao produto final, bem como manter a viabilidade do rizóbio.

Desta forma, este trabalho baseou-se na hipótese de que, géis formados por biopolímeros podem servir como suporte de inoculantes para leguminosas e teve como objetivo geral, avaliar suportes para inoculantes formulados a partir de polímeros naturais e/ou sintéticos, que permitam a produção de inoculantes comerciais para soja, de forma alternativa à turfa, preservando as características de infectividade e de efetividade de estirpes de *Bradyrhizobium*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A inoculação em sementes de leguminosas, com rizóbios, é uma maneira eficiente e prática de se introduzir, no solo e na rizosfera, estirpes eficientes na fixação biológica do nitrogênio. Já era empregada no império romano, através da inoculação de novas áreas de cultivo com o solo proveniente de lavouras antigas e reconhecidamente tem contribuído para o aumento da fixação biológica do nitrogênio, principalmente quando não há estirpes nativas presentes no solo ou quando o número destas é muito baixo (Cartroux, 2001; Daeker et al., 2004).

Solos sem presença de rizóbios são encontrados quando uma nova cultura é introduzida em áreas onde não existem estirpes nativas, como a soja no Brasil, por exemplo, (Obarton & Rollier, 1970). Também deve-se considerar que as condições do solo como: pH, altas temperaturas, dessecação e salinidade, também podem ser prejudiciais à ocorrência das populações desejadas de rizóbios (Amarger, 2003).

A importância da população estabelecida no solo para a nodulação efetiva de culturas de leguminosas é reconhecida por diversos autores: (Thies et al., 1991; Singleton et al., 1992), reportam que 59% da resposta à inoculação, estão relacionados ao número de células de rizóbios presentes no solo no momento do plantio.

Nazih & Weaver, (1994) demonstraram que a nodulação em trevos (*Trifolium sp.*) com uma população de 10^2 rizóbios por grama de solo, não foi suficiente para produzir uma boa nodulação, mas que uma população de 10^3 rizóbios por grama produziu aumentos na nodulação, suficientes para atingir teores máximos de nitrogênio na parte aérea.

Em solos de primeiro ano de cultivo, onde não existe uma população estabelecida de rizóbios específicos para uma determinada espécie de leguminosa, a inoculação é uma prática indispensável e geralmente leva a respostas elevadas da planta. No sistema convencional de preparo do solo, os ganhos com a inoculação das sementes em áreas com cultivo anterior de soja são menos expressivos do que os obtidos em solos de primeiro ano, mas a re-inoculação deve ser feita de forma a favorecer as estirpes inoculadas, pois estas necessitam competir com as estirpes nativas do solo para formação de nódulos (Seneviratne et al., 2000).

No sistema plantio direto, com mais de três anos de cultivo de soja inoculada, a resposta à inoculação poderá ser menor, no entanto, deve-se fazer uma avaliação da nodulação e do desenvolvimento da cultura para decidir-se da necessidade de inoculação (Reunião de Pesquisa da Soja da Região Sul, 2004).

Grande parte dos inoculantes, comercializados no mundo há cerca de 10 anos, ainda careciam de melhorias na qualidade, pois análises demonstravam que os produtos possuíam contaminantes e baixas concentrações de rizóbios (Olsen et al., 1996; Gomez et al., 1997;).

No Brasil, a indústria de inoculantes tem feito um grande esforço para melhorar a qualidade dos produtos comercializados e em virtude da atuação da fiscalização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e do aumento das exigências nos padrões de qualidade, os inoculantes melhoraram muito a partir de 1996, normalmente excedendo as quantidades mínimas exigidas de células de rizóbio, e falhas de inoculação por esse motivo tornaram-se muito raras (Voss, 2002).

2.1 Tipos de inoculantes

A oferta de inoculantes no mercado nacional é bem variada, podendo ser encontrados inoculantes turfosos, líquidos, géis e liofilizados.

O inoculante líquido é constituído de um substrato aquoso estéril onde se veiculam as bactérias. O pó molhável consiste em substrato sólido, contendo bactérias liofilizadas que necessitam ser hidratadas antes da sua aplicação nas sementes. Os inoculantes turfosos têm origem de solos aluviais orgânicos e ácidos que são moídos, peneirados e corrigidos, visando elevar o pH para próximo da neutralidade. Paralelamente, em laboratório de microbiologia multiplicam-se, em fermentadores de diversos volumes, as estirpes da bactéria fixadora de N_2 . A produção ocorre injetando-se, assepticamente, determinado volume do caldo fermentado na turfa esterilizada (Câmara, 1998).

Segundo Brockwell (1995), inoculantes a base de turfa esterilizada são preferidos, pois eles podem conter até 100 vezes mais bactérias que a turfa não esterilizada.

A legislação brasileira (Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, DOU 10/08/2004, Anexo I) estabelece que os inoculantes comerciais devam apresentar, no mínimo, 10^9 células por grama ou mililitro de produto, ao final de seu prazo de validade e esta concentração equivale à quantidade de inoculante que deve ser misturada a 50 kg de sementes de soja para proporcionar, no mínimo, 600.000 células bacterianas viáveis por semente de soja. Os inoculantes devem ser elaborados com suporte estéril e estarem livres de microrganismos não especificados até fator de diluição 10^{-5} , podendo este suporte ser sólido ou fluído e ter um prazo de validade mínimo de seis meses a contar da data de fabricação.

Para a cultura da soja (*Glicine max*), estão recomendadas as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii* e as estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum*. Os inoculantes comerciais devem conter pelo menos duas estirpes, podendo estar em diferentes combinações.

2.2 Uso de biopolímeros como suporte para inoculantes

A biomassa terrestre é constituída, em grande parte (mais de 90%) por carboidratos e estes estão em sua maioria, na forma de polissacarídeos que podem ser obtidos a custos relativamente baixos e sendo provenientes de recursos renováveis, não tóxicos e possuindo características que permitem modificações químicas e bioquímicas, os tornam extremamente úteis na indústria (Zohuriaan & Shokrolahi, 2004).

Os polissacarídeos ou seus derivados, que são usados em alimentos e possuem utilidade na indústria por hidratarem-se em água quente ou fria, originando soluções ou dispersões em baixas concentrações, são conhecidos como “hidrocolóides”. As gomas são classificadas como naturais, que incluem os extratos de algas marinhas (alginatos), exudatos de plantas (goma arábica), de sementes ou raízes de plantas (goma jataí) ou obtidas pela multiplicação de microrganismos (goma xantana) e as modificadas, que incluem principalmente derivados de celulose e amido, como os éteres e ésteres de celulose (Lips et al., 1991).

2.2.1 Goma xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo de origem microbiana bem conhecida. Foi descoberto nos anos 50, tendo sua produção comercial se iniciado em 1964 nos Estados Unidos e comercializado sob a marca comercial Kelsan® (Cottrell & Kang, 1978).

Este polissacarídeo é produzido por bactérias do gênero *Xantomonas*, principalmente a espécie *Xantomonas campestris*. A produção industrial se dá em processos de batelada em bioreatores, com utilização de um açúcar, precedido de uma degradação ácida ou enzimática e posterior recuperação do polímero (Kiosseoglou et al., 2003).

Atualmente, os maiores produtores mundiais de xantana são a MERK e PFIZER nos Estados Unidos, RHÔNE POULEC e SANOFI-EF na França e JUNGBUNZLAUER na Áustria (Garcia-Ochoa et al., 2000).

A goma xantana tem propriedades espessantes devido à capacidade de formar soluções viscosas, mesmo em baixas concentrações. Além disso, as

dispersões de xantana possuem alto grau de pseudoplasticidade, tolerância a sais, ácidos e bases, alta estabilidade frente a extremos de pH e força iônica. As dispersões de xantana são resistentes à degradação enzimática e possuem habilidade de suspender material particulado. Sua propriedade mais relevante, no entanto, é o sinergismo com galactomananas, promovendo a formação de géis termorreversíveis que podem ser utilizados em uma vasta gama de produtos, principalmente alimentícios, como estabilizantes de emulsões (Parker et al., 1995).

A goma xantana pode ser usada para encapsular células bacterianas e seu efeito protetor é atribuído a sua capacidade de diminuir as transferências de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade de água (Mugnier & Jung, 1985).

2.2.2 – Galactomananas

Galactomananas são biopolímeros rígidos com uma estrutura central composta por β -1,4-manose, ligada a diversas unidades de α -1,6-galactose, formando um polímero. São exemplos de galactomananas, as gomas Guar e a Jataí, muito usadas na indústria de alimentos como espessantes, estabilizantes e umectantes (Dickinson, 2003).

O biopolímero goma Jataí, conhecido em vários países por diferentes nomes, como Carob e Locust bean gum, é de origem vegetal, extraído da planta *Cerotonia siliqua* L., subfamília Cesalpinoideae, conhecida como Algaroba ou Prosopis e tem origem na região mediterrânea. A goma jataí é um polissacarídeo neutro, constituído de cadeias lineares de (1-4)- β -D-

mannopiranosil, às quais estão ligados grupos (1-6)- α -D-galactopiranosil, como unidades laterais (Bozdemir & Tutas, 2003).

Devido às suas características de solubilidade em água e formação de viscosidade em diversas condições de pH e temperatura, as sementes de algaroba produzem uma goma muito usada na indústria cosmética, farmacêutica, têxtil e de papel. A goma jataí tem a propriedade de formar sinergismo em presença de outras gomas, formando um gel resistente, principalmente em combinação com a goma xantana, nas proporções de 60:40 a 40:60, respectivamente (Urlacher & Noble, 1999).

A goma Guar é obtida das sementes de uma planta leguminosa, a *Cyamopsis tetragonalobus*, que cresce principalmente no nordeste da Índia e no Paquistão. Devido às suas propriedades de solubilidade em água, baixo custo e excelentes características de viscosidade, a goma guar é usada na indústria de alimentos, recuperação de óleos e em cosméticos, além de outros usos (Reddy & Tammishetti, 2004). Estas galactomananas possuem em sua estrutura, uma forte ligação proteínas/peptídeos, uma propriedade intrínseca do polissacarídeo, responsável pela capacidade de emulsionar óleos e estabilizar emulsões (Garti, 1999).

Outra galactomanana, a goma Arábica, é obtida dos exudatos de diversas espécies de *Acácia* que produzem gomas, no entanto a espécie que mais tem sido estudada para a obtenção de goma, devido às suas variadas aplicações industriais, é a *Acácia senegal* (Joseleau & Ullmann, 1990; Osman et al., 1993).

Este polissacarídeo consiste de uma estrutura central de 1,3-β-D-galactopiranosil, ramificado com cadeias laterais de oligossacarídeos de 1,3-β-D-galactopiranosil, ligados na posição seis da cadeia principal de galactomanana. A composição da goma arábica compreende ainda, unidades de arabinose e ácidos urônicos (Pinto & Sanabria, 2001). Dentre as aplicações industriais para a goma arábica, destacam-se os usos como aditivo de alimentos, na indústria de papéis, cosméticos, tintas, adesivos e explosivos (Ganter & Reicher, 1999).

Vincent et al. (1962) reportaram maior sobrevivência de rizóbio em sementes, em relação à sua sobrevivência em esferas de vidro, com o uso de goma arábica como adesivo, indicando que ela pode fornecer alguma proteção contra os efeitos prejudiciais dos exudatos tóxicos das sementes.

2.2.3 – Polivinilpirrolidona

O polivinilpirrolidona (PVP), composto por poli[1-vinil-2-pirrolidona], conhecido comercialmente por Povidone, é um polímero sintético, formulado a partir de formadeído e acetileno (Litter, 1964).

O polivinilpirrolidona é utilizado na indústria de cosméticos, têxtil, farmacêutica e como aditivo para melhorar características de determinados produtos. A adição deste polímero em produtos desinfetantes eleva a efetividade dos mesmos e, quando associado ao iodo, pode ser usado como desinfetante da pele e mucosas, combatendo infecções causadas por estreptococos, estafilococos e fungos (Wanchoo & Sharma, 2003).

O PVP como agente protetor para rizóbio foi patenteado na Nova Zelândia, em 1981, pela Coated Seed (Roughley, 1988). O PVP é um produto

capaz de melhorar as características físico-químicas de condicionadores para inoculantes de leguminosas (Castañeda, 1989).

Inoculantes formulados a base de turfa esterilizada, aditivados com 10 % de montmorilonita e com 1,5 % de PVP, apresentaram maior população de *Bradyrhizobium japonicum*, em relação ao controle (García-Blásquez, 1993).

O uso de PVP em inoculantes formulados a base de biopolímeros, proporcionaram concentrações de células viáveis, das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii*, iguais ou superiores aquelas obtidas por estes mesmos inoculantes não aditivados, após oito meses de armazenamento sob condições de temperatura ambiente (Denardin, 1997).

Estudos indicam que o PVP possui capacidade de proteger as bactérias através da absorção de compostos poli-fenólicos dos exudatos das sementes e formação de filme protetor, impedindo perdas de água (Bushby & Marshall, 1977).

2.2.4 – Polivinilálcool

Os polivinilálcoois são polímeros sintéticos usados desde os anos 30 em uma grande variedade de usos industriais, comerciais, médicos e alimentícios, que incluem resinas, lacas, colas, fios cirúrgicos e embalagens para alimentos. Nos Estados Unidos a maioria do polivinilálcool produzido é usada na indústria têxtil e de papéis, estando aprovado para uso em embalagens que entram em contato com alimentos (DeMerlis & Schoneker, 2003). Com a fórmula estrutural $(-CH_2-CHOH-)_n(-CH_2-CHOCOCH_3-)_m$ o polivinilálcool é uma substância que se apresenta sem odor, de cor branca a creme e solúvel em água. Suas características dependem do método de

preparação, que pode ser por hidrólise total ou parcial do polivinilacetato, sendo classificado como parcialmente ou totalmente hidrolizado.

O PVA, juntamente com o PVP e o ácido láctico são usados na preparação de hidrogéis contendo substâncias bioativas contendo heparina, tripsina e antibióticos para uso médico-hospitalar (Ostrovidova et al., 2003).

Microrganismos aeróbios que são usados para retirar oxigênio de embalagens de alimentos (*P. subpelliculosa*), quando encapsulados em uma matriz a base de PVA, tiveram melhor sobrevivência e maior atividade durante o período de armazenamento (Altieri et al., 2004). O PVA possui efeito estabilizador de dispersões aquosas e quando um microrganismo está exposto à dessecação, este efeito pode ajudar a reduzir a precipitação de proteínas celulares e conseqüente coagulação das células. A manutenção da estrutura macromolecular aumenta a sobrevivência do microrganismo (Amiet-Charpenter et al., 1998).

2.2.5 – Carboximetilcelulose sódico

O carboximetilcelulose sódico (CMC) é um éter de celulose obtido pela reação da celulose com hidróxido de sódio, originando a álcali-celulose. Da reação do álcali-celulose com monocloroacetato de sódio obtém-se o carboximetilcelulose sódico. A celulose é constituída de uma longa cadeia de unidades anidrogucose, sendo que cada unidade contém três grupos de hidroxilas terminais. Através da substituição do hidrogênio dessas hidroxilas por grupos carboximetil, obtém-se o carboximetilcelulose sódico.

O CMC de grau purificado apresenta-se como um pó de coloração de branco a creme, higroscópico, inodoro e insípido. É fisiologicamente inerte,

não tóxico e não sensibilizante, tendo muitas aplicações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, devido às suas importantes propriedades de viscosidade (Sanz et al. 2005). O CMC e a goma arábica são os adesivos mais utilizados para melhorar a fixação da turfa na inoculação de sementes de leguminosas, no entanto, os relatos sobre os efeitos protetores desta substância sobre as bactérias são variáveis e indicam um grau de proteção menor do que o oferecido pela goma arábica (Elegba & Rennie, 1984).

Dados de um estudo de sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em géis preparados com hidroxietilcelulose, outro derivado da celulose, concluíram que o *Bradyrhizobium* sobreviveu nos géis durante 70 dias a 28 °C e que a aderência do gel às sementes proporcionou um maior número de células de *Bradyrhizobium* por semente após a inoculação (Jawson et al., 1989).

2.3 Fatores que interferem na nodulação e na fixação do N₂

Diversos fatores podem interferir no processo de nodulação e fixação do nitrogênio, dentre estes destacam-se:

2.3.1 Qualidade do inoculante

As propriedades de um bom veículo para inoculantes são descritas como: possuir alta capacidade de retenção de água, não-tóxico para o rizóbio, fácil esterilização em autoclave ou irradiação gama, matéria prima disponível e barata, suficientemente adesivo para aplicação efetiva na semente, capacidade de tamponamento

do pH, capacidade de troca de cátions (Keyser et al., 1992; Yardin et al., 2000).

O inoculante deve apresentar alta concentração de células viáveis para a cultura na qual está sendo usado (Câmara, 1998). Para que ocorra uma boa colonização da rizosfera das plântulas de soja é necessário que se tenha, estirpes de rizóbio eficientes e um ótimo veículo para inoculação. O número de bactérias deve ser o maior possível no momento da colonização e para que isso ocorra é necessário que o inoculante forneça um alto número de rizóbios viáveis ou se utilize maior dosagem de inoculante para compensar as perdas entre a inoculação da semente e a nodulação efetiva (Brockwell , 1995).

2.3.2 Temperatura e umidade

Os efeitos das altas temperaturas sobre a planta hospedeira e seus prejuízos à fixação do N₂, são conhecidos há muito tempo (Jones & Tisdale, 1921; Lowendorff, 1981) e é um importante fator que interfere na fixação biológica do nitrogênio, principalmente em regiões tropicais, onde temperaturas de solo superiores a 40 °C são comumente encontradas em regiões produtoras de soja, e podem causar prejuízos à nodulação, principalmente devido à frágil estrutura do solo, erosão, baixos teores de matéria orgânica e práticas agrícolas inapropriadas (Galleti, 1971; Giller & Wilson, 1993).

Temperaturas de solo situadas entre 25 e 35°C são apontadas como adequadas para boa nodulação e fixação do nitrogênio em leguminosas tropicais (Norris & Date, 1976). Para solos tropicais as temperaturas limites para a fixação do N₂ variam de 27 a 40 °C e a maior atividade da nitrogenase

ocorrem entre 19 e 30°C, com decréscimo acentuado fora destes limites (Pankhurst & Sprent, 1976; Munévar & Wollum, 1981; Montañez et al., 1995).

O estresse hídrico também é um importante fator de interferência na fixação do N₂, pois prejudica o crescimento da planta e do rizóbio, afetando a sobrevivência do rizóbio e sua população no solo, bem como a formação e longevidade dos nódulos, na síntese de leghemoglobina e nas funções do nódulo. O estresse hídrico severo pode levar a interrupção irreversível da fixação do N₂ (Sprent, 1976; Vincent, 1980; Walker & Miller, 1986; Venkateswarlu et al., 1989; Stamford et al., 1990; Guerin et al., 1991).

2.3.3 Nitrogênio mineral

Todas as formas de nitrogênio mineral influenciam negativamente a fixação do N₂ e afetam diversos aspectos da simbiose leguminosa/rizóbio (Streeter, 1988), no entanto, a severidade com que ocorre esta inibição depende da forma deste nitrogênio e pela concentração em que se encontra na rizosfera (Imsande, 1986).

Concentrações de NH₄⁺ (≥ 1,0 mM) têm efeito negativo sobre número e peso de nódulos e atividade da nitrogenase em várias espécies de leguminosas (Dart & Wildon, 1970; Guo, 1992). Além disto, a repressão da indução do gene regulatório *nodD* e genes *nodABC* são dependentes da concentração de amônio em *Bradyrhizobium japonicum* (Wang & Stacey, 1990). Exudação de flavonóides responsáveis pela sinalização e pela infecção das bactérias nas raízes também são afetados por NH₄⁺ (Cho & Harper, 1991; Wojtaszek et al., 1993).

Apesar de existirem trabalhos mostrando efeitos diferenciados, tanto positivos quanto negativos do nitrogênio mineral sobre a nodulação (Dart & Wildon, 1970; Svenning et al., 1996), os efeitos inibitórios do nitrato (NO_3^-) sobre a simbiose leguminosa/rizóbio em concentrações acima de 1-5 mM são claramente aceitos (Gulden & Vessey, 1997). O uso de adubação nitrogenada também possui potencial para causar efeitos adversos como fito-toxidez, podendo ainda ocorrer volatilização da amônia e acúmulo de nitrato no solo (Graham & Vance, 2000).

2.3.4 pH do solo

Solos ácidos e com baixa fertilidade são comuns em solos tropicais, e frequentemente apresentam concentrações tóxicas de alumínio e alguns casos manganês (Lal, 1993). Tais condições de solos ácidos podem determinar problemas para a planta, a bactéria e a simbiose (Giller & Wilson, 1993).

Há variação entre espécies e dentro da espécie entre estirpes quanto a tolerância a acidez (Lowendorff, 1981; Vargas & Graham, 1988; Brockwell, 1995). O pH ótimo para o crescimento fica entre 6,0 e 7,0 (Jordan, 1984), poucos rizóbios apresentam bom desenvolvimento em pH abaixo de 5,0 (Graham & Vance, 2000). Exceções incluem estirpes de *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium* sp. Particularmente *Sinorhizobium meliloti* é descrito como altamente sensível a acidez (Brockwell, 1995), mas variações na tolerância a pH ácido foram descritas para estas espécies (Graham & Vance, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Diversas formulações inoculantes foram elaboradas para avaliar-se a capacidade de sobrevivência de células viáveis de estirpes de rizóbios em formulações à base de biopolímeros. Os experimentos em laboratório foram realizados nas instalações do Laboratório de Microbiologia do Solo e os ensaios de inoculação em plantas de soja, na casa de vegetação do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Elaboração das formulações inoculantes a base de misturas de biopolímeros e a base de turfa

Os polímeros utilizados foram obtidos de diversos fornecedores, no mercado nacional. As matérias primas utilizadas foram as seguintes: Goma Xantana (Satiaxane CX91, lote 4259 - Degussa), Álcool Polivinílico (PVA 24-88, lote 02022 – Bandeirante Química), Goma Guar (M. Cassab Comércio e Indústria Ltda., lote XB523), Goma Jataí (Starmix YG 314, Star & Art), Polivinilpirrolidona (Inlab, tipo K-30, PM 40.000), Goma Arábica (Farmoquímica – Porto Alegre), Carboximetilcelulose sódica (CMC - Induscol -T-5000, lote 5-155/03, Ipiranga Química).

Para a formulação do inoculante a base de turfa, utilizou-se como substrato turfa esterilizada por radiação gama (50 KiloGrays), embalada em sacos plásticos, que foi gentilmente cedida pela indústria de inoculantes Biosoja. Suas características físico-químicas são mostradas no apêndice 1.

3.1.1 Estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas no experimento

As diferentes formulações de inoculantes foram inoculadas com as estirpes SEMIA 587 de *Bradyrhizobium elkanii* e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium japonicum*, recomendadas oficialmente para a produção de inoculantes para soja. Ambas as culturas utilizadas (estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079) foram fornecidas pela coleção de culturas de rizóbios do Centro de Fixação Biológica de Nitrogênio da FEPAGRO/RS.

As culturas liofilizadas foram reconstituídas, separadamente, em meio extrato de levedura-manitol e inoculadas em placas de Petri com meio extrato de levedura-manitol-ágar com corante vermelho de Congo (meio LMAV, Apêndice 2) para avaliação da pureza das culturas. Estas placas foram incubadas em incubadora bacteriológica a 28° C, por 10 dias. Após, as culturas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio extrato de levedura-manitol, incubadas por oito dias e armazenadas sob refrigeração.

3.1.2 Preparo dos inóculos com as estirpes SEMIA 587 e 5079

As estirpes foram recuperadas em solução salina (NaCl 0,85%) e crescidas em meio extrato de levedura-glicerol líquido (Apêndice 3) com agitação constante de 120 rpm, durante cinco dias a 28°C.

Para confirmação da pureza, as culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar-glucose-peptona com púrpura de bromocresol

(Apêndice 4), incubadas a 28 °C por 10 dias. Após, as culturas foram crescidas separadamente em frascos contendo 25 mL de meio extrato de levedura-glicerol. O número total de células, ao final do período de crescimento de 10 dias, foi avaliado por contagem em um microscópio óptico (marca Olympus, modelo CH 30) em 400 aumentos, com câmara de Petroff-Hauser, e em microscópio óptico de contraste de fase.

Para preparação do caldo de cultura, usado para inocular as formulações, alíquotas de 1mL de cada cultura foram inoculadas em frascos contendo 50 mL de meio extrato de levedura-glicerol para multiplicação celular. O número de células viáveis do caldo foi avaliado empregando-se o método de diluições sucessivas e contagem em gotas em placas com meio LMAV (Miles & Misra, 1938). O inóculo avaliado continha uma concentração celular em torno de 10^9 células.mL⁻¹. A pureza dos caldos foi avaliada pelo monitoramento do pH do caldo e avaliação microscópica com coloração das células pelo método de Gram.

Os caldos de cada cultura foram então misturados, em iguais proporções, em condições assépticas e, então, a mistura foi utilizada para a inoculação das formulações dos inoculantes. A mistura dos dois caldos foi então, utilizada para inocular as diferentes formulações empregadas como suportes e apresentava a concentração de células vivas de rizóbios de $1,3 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹.

3.1.3 Formulação dos Inoculantes a base de biopolímeros

Para a elaboração dos substratos a base de biopolímeros, as suspensões das gomas foram preparadas com água destilada ou meio glicerol,

sob agitação contínua e aquecimento a 70 °C em uma placa aquecedora com agitador magnético. A agitação foi mantida até obter-se completa homogeneização da mistura gelatinosa. Após o resfriamento à temperatura de 25 °C, o pH das formulações foi ajustado para 7,0 (+/- 0,1) com a adição de volumes variáveis de HCl 0,1 N, dependendo do pH de cada formulação. Em seguida, alíquotas de 45 mL destas misturas foram vertidas em frascos de vidro com tampa de polipropileno rosqueada, com capacidade total de 100 mL, os quais foram fechados e esterilizados em autoclave durante 15 minutos, à temperatura de 121° C e pressão de 1,0 Kgf.cm⁻². Na Tabela 1, encontra-se a composição dos inoculantes assim preparados.

Tabela 1 Composição dos inoculantes formulados a base de biopolímeros e proporção percentual dos polímeros em cada formulação preparada.

Formulações em Gel	
Código	Composição
G1	Goma xantana (0,4) + PVP (0,1) + Água destilada
G2	Goma xantana (0,4) + Goma guar (0,4) + Água destilada
G3	Goma xantana (0,2) + Goma jataí (0,2) + Água destilada
G4	Goma xantana (0,4) + Goma guar (0,4) + PVP (0,1) + Água destilada
G5	Goma arábica (0,8) + Goma jataí (0,4) + PVA (0,1) + Água destilada
G6	Goma xantana (0,2) + Goma jataí (0,2) + PVP (0,1) + Meio glicerol
G7	Goma xantana (0,2) + Goma jataí (0,2) + PVP (0,1) + Água destilada
G8	Goma xantana (0,2) + Goma guar (0,2) + Meio glicerol
Formulações Líquidas	
Código	Composição
L1	Goma xantana (0,1) + Goma arábica (0,2) + Água destilada
L2	Goma xantana (0,1) + Meio glicerol
L3	Goma xantana (0,1) + Água destilada
L5	Goma xantana (0,1) + PVP (0,1) + Meio glicerol
L6	Goma xantana (0,1) + CMC (0,1) + PVP (0,1) + Água destilada
L7	Goma arábica (1,2) + PVA (0,1) + PVP (0,1) + Água destilada

Obs.: CMC = carboximetilcelulose sódica; PVP = polivinilpirrolidona; PVA = álcoolpolivinílico

3.1.4 Injeção dos caldos de cultivo nas formulações a base de biopolímeros

Após a esterilização, os frascos contendo 45 mL da formulação a base de biopolímeros na forma de gel, foram aquecidos em banho de água à temperatura de 30° C, para que conservassem as formas fluídas, facilitando, assim, a injeção e a mistura dos caldos de cultivo nos mesmos. Após 15 minutos no banho, eram transferidas para câmara de fluxo laminar, onde em cada frasco foi adicionada, assepticamente, uma alíquota de 5,0 mL da mistura dos caldos das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 utilizando-se uma pipeta de vidro de 5,0 mL esterilizada. Após a inoculação dos substratos com o caldo de cultivo, as embalagens foram fechadas e agitadas, manual e vigorosamente, buscando-se homogeneizar os inoculantes formulados pelas diferentes misturas de gomas com o caldo de cultivo.

Foram elaborados 140 frascos constituindo-se de 14 diferentes formulações inoculantes com biopolímeros e 10 repetições de cada formulação. Os frascos foram conservados em temperatura ambiente e no escuro, no laboratório.

3.1.5 Formulação dos inoculantes a base de turfa

O controle da esterilidade da turfa foi realizado segundo a técnica descrita por Somasegaran & Hoben (1994) e não se observou a presença de contaminantes. Em cada embalagem, contendo 85 gramas de turfa esterilizada, injetou-se assepticamente, 85 mL do caldo de cultivo utilizando-se seringas hipodérmicas descartáveis e esterilizadas. Após, o orifício feito pela agulha na embalagem foi fechado com fita adesiva.

Após a impregnação da turfa com o caldo de cultivo, as embalagens foram manuseadas delicadamente, buscando-se homogeneizar a mistura. Os inoculantes assim formulados totalizaram 10 unidades de 170 gramas cada, as quais foram armazenadas em temperatura ambiente e no escuro, no laboratório.

3.2 Avaliação da sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 nos inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros

As avaliações da sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 de *Bradyrhizobium*, nos inoculantes formulados foram realizadas aos 40, 60, 120, 180, 270 e 360 dias, após a inoculação do caldo de cultivo. Nesse processo de avaliação, mediu-se a concentração de células viáveis de rizóbio por unidade de massa, no inoculante a base de turfa, e por unidade de volume, nos inoculantes a base de biopolímeros.

O método empregado foi o da diluição seriada, usando-se solução salina (NaCl 0,85%), adicionada de Tween 80 a 0,01%. Alíquotas das diluições foram inoculadas em placas de petri com meio LMAV, de acordo com o método de contagem em gotas (drop plate method, MILES & MISRA, 1938), efetuando-se quatro repetições para cada diluição.

3.3 Avaliação da aderência nas sementes de soja com os inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros

A eficiência da inoculação das sementes de soja com os inoculantes a base de turfa e a base de biopolímeros foi avaliada quantificando-se o

número de células viáveis de inóculo, aderidas por unidade de semente inoculada. Essa avaliação foi realizada após 40 dias de armazenamento no escuro e em temperatura ambiente.

A avaliação do número de células viáveis de inóculo aderidas em cada semente inoculada foi feita a partir de amostras aleatórias de 10 sementes coletadas em cada saco de polipropileno que continha as 100 g de sementes inoculadas com diferentes tipos de inoculantes. Essas amostras foram transferidas para os frascos erlenmeyer, contendo 10 mL solução salina a 0,85% de NaCl, acrescida de Tween 80 a 0,01% e aplicou-se o método das diluições seriadas, com inoculação em meio de cultura LMAV, de alíquotas de 20 μ L, conforme o método de contagem por gotas, descrito por MILES & MISRA (1938). O processo de inoculação das sementes, com os inoculantes a base de biopolímeros, foi procedido adicionando-se a 100 g de sementes, previamente desinfetadas, 0,5 mL de inoculante. As sementes foram ensacadas em câmara de fluxo laminar e pesadas ao lado da câmara, ajustando-se o peso e tomando o cuidado de fechar o saco plástico para evitar contaminações.

A inoculação das sementes, com o inoculante a base de turfa, foi realizada adicionando-se previamente, em 100 g de sementes nos sacos de polipropileno, 1,0 mL de uma solução adesiva esterilizada formada com carboximetilcelulose sódica a 0,5% em água destilada e, após a impregnação nas sementes, adicionou-se 0,5 g do inoculante turfoso. A homogeneização foi obtida agitando-se suave e manualmente o saco de polipropileno contendo a mistura de sementes e inoculante.

O teste de comprovação da desinfecção das sementes foi realizado mediante a técnica de diluições seriadas, colocando-se amostras aleatórias de 10 sementes em frascos erlenmeyer contendo 10 mL de solução fisiológica, acrescida de Tween 80, a 0,01% e inoculando-se alíquotas e 20 µL em meio de cultura LMAV, conforme o método de contagem por gotas, descrito por MILES & MISRA (1938).

3.4 Avaliação do desempenho dos inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros na cultura de soja em solo não inoculado

Após 40 dias da elaboração dos inoculantes, avaliou-se o efeito protetor das formulações sob condições de estresse hídrico em experimento, em casa de vegetação, com vasos contendo solo sem população de *Bradyrhizobium* e com teor de nitrogênio mineral de 18,2 mg.Kg⁻¹ de solo. A capacidade de retenção de água do solo foi determinada previamente como sendo de 20%, de forma a permitir a irrigação em torno de 80 % da capacidade de campo.

O solo foi coletado na Estação Experimental Agronômica da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), no município de Eldorado do Sul – RS que se encontra inserido na microrregião da Depressão Central. O solo foi classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico. A coleta foi realizada em uma área de campo nativo sem histórico anterior de cultivo de soja. Após a coleta, o solo foi peneirado em peneira de malha 10 mm e foi corrigido com Calcário (8.600 Kg.ha⁻¹), Superfosfato triplo (186 Kg.ha⁻¹) e Cloreto de Potássio (100 Kg.ha⁻¹), de acordo

com as recomendações da Comissão de Fertilidade do Solo (1995). A mistura foi feita em betoneira e após a completa homogeneização, o solo foi deixado incubando por 30 dias para reação dos adubos e, posteriormente, se colocou 2,8 Kg de solo em cada vaso. Os resultados da análise química deste solo são mostrados no Apêndice 5.

As sementes de soja, cultivar RS-10, utilizadas no ensaio, foram desinfetadas superficialmente imergindo-as em álcool etílico 98° GL, durante três minutos, e a seguir, em solução de hipoclorito de sódio a 5%, durante um minuto. Foram então lavadas por seis vezes sucessivas com água destilada esterilizada e, a seguir, transferidas para uma bandeja de alumínio esterilizada e levadas a secar em condições assépticas, por duas horas em câmara de fluxo laminar em temperatura ambiente. Após a secagem, 100 g de sementes foram colocadas em sacos de polipropileno, previamente esterilizados, e inoculadas com cada um dos 14 tipos de inoculantes a base de biopolímeros e também com o inoculante turfoso.

A inoculação das sementes, com o inoculante a base de turfa, foi realizada adicionando-se previamente, em 100 g de sementes nos sacos de polipropileno, 1,0 mL de uma solução adesiva esterilizada formada com carboximetilcelulose sódica a 0,5% em água destilada e, após a impregnação nas sementes, adicionou-se 0,5 g do inoculante turfoso. A homogeneização foi obtida, manuseando-se suavemente a mistura de sementes + inoculante turfoso + água. A inoculação das sementes com os inoculantes a base de biopolímeros foi realizada adicionando-se 0,5 mL da formulação inoculante às

100 g de sementes embaladas nos sacos de polipropileno. As sementes inoculadas foram homogeneizadas da maneira descrita anteriormente.

Em cada vaso com solo, semearam-se cinco sementes e 10 dias após a emergência das plântulas, realizou-se um desbaste, deixando-se apenas duas plântulas por vaso. Os vasos foram irrigados com água destilada de modo a manter-se o solo com umidade equivalente a 80% de sua capacidade de campo. Os vasos dos tratamentos controle com adição de nitrogênio foram irrigados com solução de nitrato de amônia e a dose foi calculada de modo que cada vaso recebeu o equivalente a 100 Kg de N por hectare, divididos em três dosagens (no plantio, após quatro e oito dias), posteriormente, estes vasos foram irrigados com água destilada.

Após 36 dias da semeadura, as plantas foram colhidas cortando-se a parte aérea e retirando-se as raízes, de cada vaso separadamente, em saco plástico e devolvendo-se o solo aos vasos, de modo a preservarem-se os tratamentos, para que o experimento pudesse ser repetido. As partes aéreas das plantas, de cada um dos tratamentos, foram colocadas em saco de papel pardo e postas a secar em estufa com circulação de ar na temperatura de 65° C, para determinação de sua massa seca.

O sistema radicular das plantas, de cada um dos vasos, foi lavado em água corrente e levado ao laboratório para retirada dos nódulos existentes. A seguir, os nódulos de cada uma das raízes das plantas, de cada um dos tratamentos, foram contados e colocados em sacos de papel para secagem em estufa na temperatura de 65° C e posterior determinação de sua massa seca.

3.4.1 Avaliação da sobrevivência dos rizóbios em sementes de soja inoculadas em solo sob condições de estresse hídrico

Neste ensaio, os inoculantes foram avaliados pela inoculação de sementes de soja, em casa de vegetação, quanto a sua capacidade de proteger as bactérias inoculadas contra a falta de umidade.

As sementes inoculadas, separadamente, com todas as formulações inoculantes foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- Irrigação imediatamente após a inoculação e semeadura
- Irrigação cinco dias após a inoculação e semeadura

Também foram utilizados dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um deles com adição de nitrogênio, conforme descrito anteriormente.

3.4.2 Avaliação da sobrevivência dos rizóbios em sementes de soja inoculadas em solo sob condições de estresse térmico

A sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* nos inoculantes também foi avaliada em condições de temperaturas elevadas. Neste experimento, os vasos foram irrigados imediatamente após o plantio e expostos a diferentes temperaturas.

Os tratamentos avaliados foram:

- Vasos envoltos em papel alumínio e mantidos em condição de casa de vegetação com cobertura de sombrite e com aspersão de água no piso, para se obter temperaturas médias mais baixas no solo. Este tratamento foi chamado de tratamento TS.

- Vasos mantidos em condições de casa de vegetação com cobertura de sombrite e com aspersão de água no piso. Este tratamento foi chamado TT.

- Vasos mantidos em casa de vegetação fechada, sem cobertura de sombrite, e sem aspersão de água no piso, para se obter temperaturas mais elevadas no solo. Este tratamento foi chamado TCV.

Para realização destes ensaios de temperatura, utilizaram-se duas casas de vegetação. No ensaio com temperaturas altas (TCV), após 10 dias de exposição, os vasos foram transferidos para o mesmo local em que se encontravam os outros vasos, ou seja, em condição de casa de vegetação com cobertura de sombrite e aspersão de água no piso. A temperatura foi monitorada diariamente durante os primeiros 10 dias de condução do experimento, sempre entre as 12:00 e 13:00 horas, através de termômetros de vidro nos vasos e termômetros de máximas e mínimas, nas casas de vegetação.

3.5 Remoção do nitrogênio residual do solo dos vasos

Após a realização do primeiro experimento para avaliação dos inoculantes em soja em casa de vegetação, plantou-se aveia preta nos vasos que haviam sido utilizados no experimento visando-se a retirada do nitrogênio residual do solo dos vasos.

Semearam-se seis sementes de aveia em cada vaso e após três semanas da emergência das plantas, fez-se o desbaste, deixando-se apenas três plântulas por vaso. Os vasos foram irrigados de modo a manter-se o solo com 50% de sua capacidade de campo. Após 70 dias da semeadura, a aveia foi colhida cortando-se sua parte aérea e retirando-se as raízes de cada tratamento separadamente, em sacos plásticos. Sendo o solo devolvido para

os vasos, de modo a preservarem-se os tratamentos para o próximo experimento. A análise do solo, após a retirada da aveia, revelou um teor de nitrogênio mineral de 6,53 mg.Kg⁻¹ de solo.

3.6 Avaliação do desempenho dos inoculantes formulados a base de turfa e de biopolímeros na cultura de soja em solo inoculado

Após nove meses de armazenamento, os inoculantes a base de biopolímeros e o inoculante turfoso, foram novamente avaliados em experimento em casa de vegetação. Para este experimento utilizou-se o mesmo solo que havia sido usado no primeiro experimento e que havia recebido o plantio de aveia durante o inverno, repetindo-se todos os procedimentos adotados no primeiro ensaio, após 44 dias da semeadura. A análise deste solo encontra-se no apêndice 6.

3.7 Avaliação da sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* nas sementes de soja

A avaliação da sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* dos inoculantes, depois de aplicados nas sementes de soja, foi realizada em laboratório sete meses após o preparo e inoculação dos diferentes tipos de inoculantes. Para a realização deste ensaio, as sementes foram inoculadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. Posteriormente, estes tratamentos foram submetidos às temperaturas de 28 e 40 °C.

Foram preparados, desta maneira, sete repetições para cada tratamento, de modo que uma foi usada para a contagem inicial, três repetições

foram expostas a 28 °C e três foram expostas a 40 °C, correspondendo a cada período de avaliação. Depois de retirada da estufa e analisada, a amostra era descartada. Para a avaliação do número de células viáveis do inóculo, amostras aleatórias de 10 sementes foram retiradas de cada tratamento, com uma pinça flambada, logo após a inoculação (contagem inicial), após 24, 48 e 72 horas na estufa. A metodologia utilizada para preparar as diluições foi a mesma descrita no item 3.3. A taxa de mortalidade foi calculada de acordo com: $k = 1/t \cdot \log B/b$ onde, B= número original de células e b = número sobreviventes ao tempo t, segundo Freire e Jones (1963).

3.8 Análise estatística

Os ensaios em casa de vegetação foram conduzidos com um delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados com três repetições. Os resultados das avaliações de sobrevivência das estirpes nas formulações inoculantes, feitas por contagens em placas, em laboratório, após transformação logarítmica, foram submetidos à análise da variância e ao teste de Duncan a 5% de probabilidade e expressos em unidades formadoras de colônias/grama (ufc.g⁻¹) para o inoculante turfoso, ufc.mL⁻¹ para os inoculantes a base de biopolímeros e ufc/semente para as avaliações feitas em sementes. Os dados de contagens foram transformados para $\sqrt{x+1}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As combinações de biopolímeros utilizadas resultaram na criação de várias formulações inoculantes que, dependendo da concentração das gomas, originaram géis ou líquidos. Todas possibilitaram, com algumas diferenças, a sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium*, SEMIA 578 e SEMIA 5079, até a última avaliação realizada aos 360 dias após sua inoculação.

4.1 Avaliação da sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* nos inoculantes formulados

Os valores de contagens das unidades formadoras de colônias em placas, que originaram as curvas de sobrevivência das estirpes ao longo do tempo, nas diferentes formulações inoculantes, tanto em gel (Figura 1), como líquidas (Figura 2), mostraram que, em comparação com a curva de sobrevivência no inoculante turfoso, os inoculantes formulados com biopolímeros apresentaram uma redução mais lenta e gradual do número de células viáveis. Entretanto, para o inoculante turfoso observou-se uma redução mais acentuada na população de rizóbios nos primeiros 180 dias após a inoculação. Resultados semelhantes foram observados em inoculantes formulados a base de goma xantana, jataí e turfa, inoculados com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, separadamente, e armazenados por oito meses

(Denardin, 1997). A autora observou uma redução de até 100 vezes no número de UFC do inoculante turfoso em relação à concentração inicial dos formulados a base de biopolímeros e que o inoculante turfoso apresentou uma queda abrupta no número de ufc.g⁻¹ quatro meses após a inoculação, com uma redução gradual na população nos meses seguintes. Também Frankenberg et al. (1995), em estudos sobre a sobrevivência e competição entre duas estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) em inoculante turfoso, observou um aumento do número de células viáveis durante os primeiros 30 dias de crescimento e uma queda abrupta nos 60 dias seguintes, com uma redução gradual no número de ufc.g⁻¹ após os 90 dias.

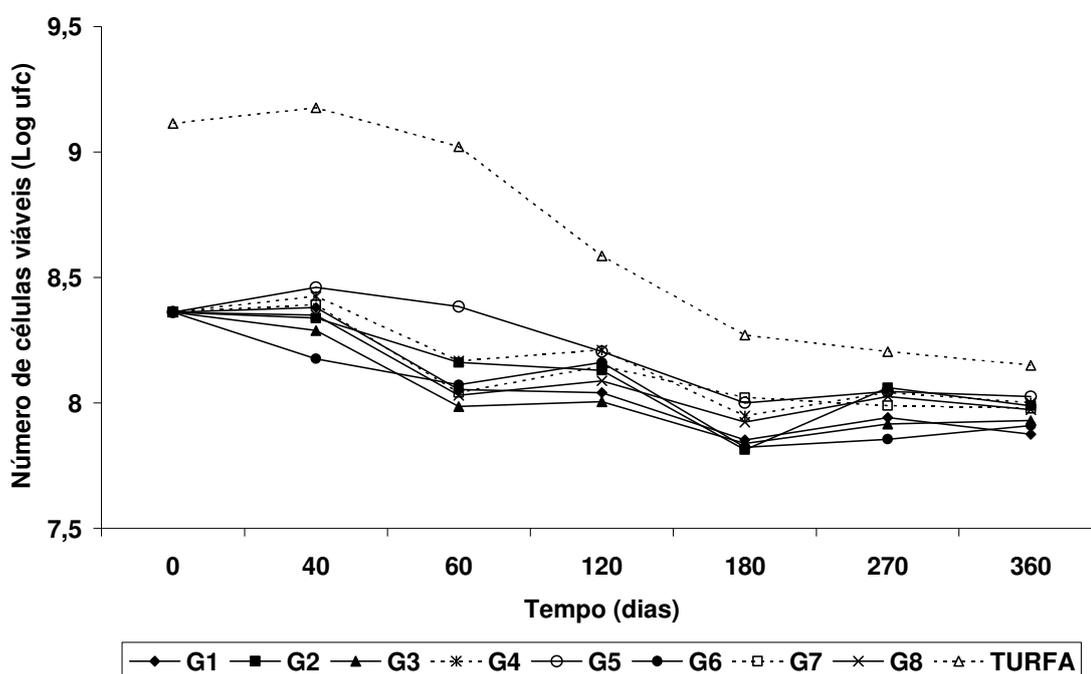


Figura 1 Sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 nos inoculantes na forma de gel comparados com o inoculante a base de turfa. Legenda: G1= xantana, + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol.

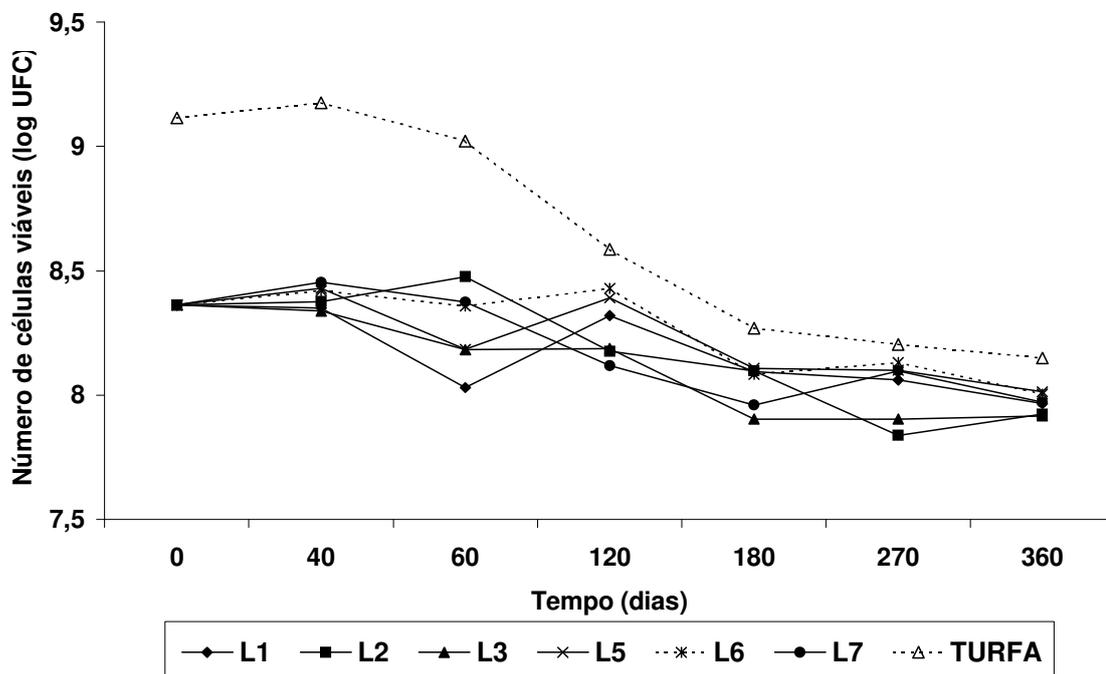


Figura 2 Sobrevivência das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5079 nos inoculantes na forma líquida, comparados com o inoculante a base de turfa. Legenda: L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água.

Entretanto, a diferença entre os valores de contagem do número inicial de células viáveis e os menores valores após 180 dias de avaliação, dos inoculantes turfoso, G2 (Figura 1) e L3 (Figura 2) não foi significativa pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Esta observação demonstra que, apesar de ter ocorrido uma redução da viabilidade das células de rizóbio nos inoculantes, mais acentuada para o inoculante turfoso, todas as formulações inoculantes possuem as características necessárias para manter a sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* por um ano após o preparo e inoculação.

O pH dos inoculantes a base de biopolímeros permaneceu praticamente estável durante o período de avaliação, entretanto o pH do

inoculante a base de turfa aumentou de seu valor inicial de pH= 5,40, para um pH= 6,56 após 360 dias da inoculação (Apêndice 7).

4.2 Aderência das formulações em sementes de soja

A capacidade de aderência das formulações inoculantes nas sementes é considerada em função do número de células viáveis de rizóbios por semente. Os resultados mostram que as formulações inoculantes apresentaram uma boa aderência na superfície das sementes de soja (Figura 3). Observou-se que as sementes inoculadas com as formulações inoculantes estudadas apresentavam mais de 10^5 células de rizóbios por semente, indicando uma boa aderência das formulações. No caso das sementes inoculadas com o inoculante turfoso, estas foram previamente recobertas com substância adesiva (carboximetilcelulose a 0,5 %), aumentando a aderência do inoculante turfoso.

As formulações inoculantes na forma líquida possibilitaram a aderência de 10^6 células por semente (Figura 3), semelhante à quantidade de células de rizóbios aderidas com o inoculante turfoso. No entanto, as sementes inoculadas com as formulações na forma de gel apresentaram um menor número de células por semente, entre 10^5 e 10^6 , provavelmente devido à perda de parte do inoculante por aderência nas paredes do saco plástico, pois todas as formulações em gel possibilitaram a sobrevivência dos rizóbios em população de cerca de 10^8 células por grama, até a avaliação aos 360 dias de armazenamento (Figura 1). Estes resultados mostram também, que a aplicação sobre a semente do produto inoculante em formulações líquidas é facilitada.

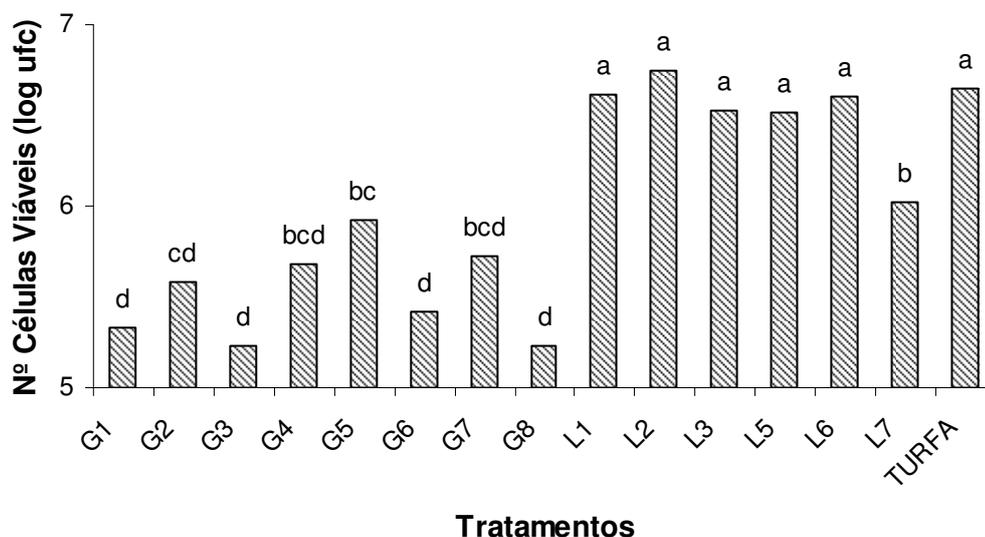


Figura 3 Número de células viáveis aderidas na superfície das sementes de soja inoculadas com as diferentes formulações inoculantes. Obs.: Médias seguidas por números iguais na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água.

Os maiores valores para número de células de rizóbios aderidos nas sementes foram observados para as formulações líquidas L1, L2, L3, L5 e L6 e para o inoculante turfoso (Figura 3), sendo superiores às formulações em gel e à formulação líquida L7 (composta da mistura de goma arábica, pva, pvp e água). Como o número de células viáveis de rizóbios na formulação L7 não era menor do que as demais formulações líquidas (Figura 2), provavelmente aderiu menos às sementes por apresentar um teor baixo de goma arábica (1,2 %), já que ela geralmente é usada como adesivo em concentrações que variam de 15 a 40 % (Deaker et al., 2004).

Entretanto, os resultados do número de células aderidas por semente inoculada com as formulações G5, L1, L2, L3, L5, L6, L7 e Turfa, mais de 600.000 (6×10^5) células viáveis por semente, mostram que estes inoculantes ainda estariam de acordo com as recomendações do número de células necessário e adequado para uma efetiva nodulação na planta (Reunião de Pesquisa da Soja da Região Sul, 2004).

4.3 Avaliação da sobrevivência dos rizóbios em sementes de soja inoculadas em solo sob condições de estresse hídrico

Os efeitos do estresse hídrico sobre as sementes inoculadas com as diferentes formulações inoculantes foram diferentes para o primeiro e o segundo cultivo em função das variações climáticas que ocorreram no período, sendo o primeiro cultivo realizado em um verão mais quente e seco.

4.3.1 Avaliação em solo de primeiro cultivo

O número de nódulos radiculares formados em plantas, inoculadas com as diferentes formulações, e cultivadas em solo de campo nativo, sem histórico de plantio de soja e que apresentava um teor de nitrogênio de $18,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ foi bastante reduzido (Tabela 2). Provavelmente, isto se deveu ao efeito inibidor sobre a nodulação do teor de nitrogênio mineral encontrado no solo. O nitrogênio do solo é o principal inibidor da simbiose em leguminosas, pois concentrações elevadas de amônia ou nitrato reduzem significativamente o número de nódulos, a massa de nódulos e o total de nitrogênio fixado (Ferguson & Mathesius, 2003; Gan et al., 2004).

Durante a condução deste experimento, observou-se um período de ocorrência de temperaturas médias elevadas (Apêndice 9) e baixa umidade relativa do ar, o que influenciou na germinação das sementes nos vasos, além da falta de irrigação durante os cinco dias iniciais. Isto causou forte impacto, com redução no número e no desenvolvimento das plantas, ficando alguns vasos com apenas uma planta.

Os tratamentos submetidos a estresse hídrico, com irrigação efetuada cinco dias após a semeadura, apresentaram um atraso na germinação das sementes, em comparação com o tratamento que foi irrigado no momento da semeadura. Por este motivo, as plantas submetidas ao estresse hídrico foram coletadas uma semana após as demais.

Em geral, a produção de matéria seca da parte aérea das plantas de todos os tratamentos submetidos ao estresse hídrico, ausência de irrigação até cinco dias após a semeadura, foi reduzida em comparação com a matéria seca formada pelas plantas dos tratamentos irrigados desde a semeadura (Tabela 2).

As plantas que apresentaram redução significativa na produção de massa seca da parte aérea, devido ao efeito do estresse hídrico, foram aquelas inoculadas com as formulações G5, G6, G3 e G1 (Tabela 2), sendo menor do que a produzida pelas plantas inoculadas com as mesmas formulações, porém com irrigação desde a semeadura. No entanto, não diferiram, na produção de matéria seca, do tratamento que recebeu a adição de nitrogênio ($100 \text{ Kg de N.ha}^{-1}$) e irrigação, provavelmente devido ao teor de nitrogênio mineral presente no solo ($18,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$).

Na condição de solo irrigado no momento da semeadura, as plantas inoculadas com as formulações L6 e G7 apresentaram maior número de nódulos do que as plantas inoculadas com as formulações turfa, G1, G3, G6, L2 e L5 (Tabela 2).

O estresse hídrico também causou uma redução da massa de nódulos formados nas plantas inoculadas com todas as formulações inoculantes, exceto nas plantas inoculadas com turfa (Tabela 2). Neste tratamento, embora o estresse hídrico tenha causado uma redução de 48% na massa de nódulos, em relação a produzida pelas plantas irrigadas desde a semeadura, não se observou diferença significativa.

Tais resultados mostram que ocorreu um efeito prejudicial generalizado do estresse hídrico sobre a nodulação. Segundo Walsh (1995), a combinação de fatores, como o calor e a falta de água, afetam a planta, a sobrevivência e o crescimento dos rizóbios no solo e são fatores prejudiciais para uma efetiva nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas.

Embora estes resultados mostrem um efeito drástico do estresse hídrico, não pode ser descartada, para os tratamentos inoculados com as formulações em gel, uma redução do número de células de rizóbios aderidas na semente devido às dificuldades de inoculação com formulações inoculantes com géis muito firmes (Figura 3). Obs.: Neste experimento, o tratamento com a formulação L3 foi perdido por falha na germinação das sementes (Tabela 2).

Tabela 2 Massa da parte aérea, número de nódulos, massa de nódulos de por planta de soja cultivada em vasos com solo de primeiro cultivo e submetida à irrigação na semeadura ou cinco dias após, a partir de sementes inoculadas com os diferentes inoculantes. (Médias de três repetições).

Estresse hídrico	Tratamentos	Massa da parte aérea (g)	Número de nódulos	Massa de nódulos (mg)
Irrigado	T+N	1,64 efgh	-	-
	Turfa	2,02 abcdefg	12,0 defg	27,4 defg
	G1	2,10 abcdefg	12,0 defg	34,2 bcde
	G2	2,22 abcde	15,0 bcde	40,3 abcd
	G3	2,40 a	9,2 efgh	29,6 cdef
	G4	2,33 ab	18,5 abc	41,6 abc
	G5	2,38 a	19,0 abc	43,4 ab
	G6	2,22 abcde	14,7 cde	49,0 a
	G7	2,17 abcdef	22,2 ab	48,0 a
	G8	2,33 ab	15,2 bcde	43,9 ab
	L1	2,05 abcdefg	16,8 bcd	39,1 abcd
	L2	2,22 abcde	13,2 cdef	41,0 abc
	L5	2,30 abcd	13,8 cde	40,5 abcd
	L6	2,31 abc	24,3 a	48,5 a
L7	2,14 abcdefg	17,7 abcd	47,7 ab	
T-N	1,97 abcdefgh	-	-	
Irrigado após 5 dias	T+N	1,63 efgh	-	-
	Turfa	1,74 bcdefgh	3,6 j	14,4 ghij
	G1	1,35 h	6,8 ghij	15,7 ghij
	G2	1,61 efgh	4,5 hij	11,6 hij
	G3	1,36 h	3,8 ij	15,6 ghij
	G4	1,78 bcdefgh	6,3 hij	23,1 efgh
	G5	1,41 gh	3,8 hij	7,2 ij
	G6	1,38 h	4,2 hij	12,8 hij
	G7	1,59 fgh	7,7 fghij	15,3 ghij
	G8	1,73 cdefgh	4,7 hij	20,3 fgih
	L1	1,61 efgh	6,5 hij	11,9 hij
	L2	1,74 bcdefgh	6,2 hij	17,8 fgih
	L5	2,44 a	8,3 fgih	10,0 hij
	L6	1,80 bcdefgh	5,8 hij	13,4 hij
L7	1,69 defgh	3,5 j	2,9 j	
T-N	1,61 efgh	-	-	

Obs.: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água; T+N = 100 Kg de N.ha⁻¹ ; T-N = sem nitrogênio.

4.3.2 Avaliação em solo de segundo cultivo

Avaliando-se o desempenho dos inoculantes, submetidos ao estresse hídrico, em solo que já havia sido cultivado com soja e com aveia, verificou-se um aumento no número de nódulos (Tabela 3) nas plantas do segundo cultivo de soja, em relação aos valores observados em solo de primeiro cultivo, provavelmente, devido à redução do teor de nitrogênio mineral do solo ($6,53 \text{ mg.Kg}^{-1}$). Durante o período de condução deste experimento, verificaram-se também temperaturas médias do solo (Apêndice 10) e do ambiente mais baixas em relação aos valores observados no primeiro cultivo (Apêndice 8).

Os efeitos do estresse hídrico não foram muito claramente evidenciados neste experimento (Tabela 3). Provavelmente devido à ocorrência de temperaturas mais amenas no período de condução do experimento (Apêndice 11). Embora sem razão aparente, a produção de matéria seca das plantas inoculadas com a formulação inoculante G7 submetidas a estresse hídrico foi superior ao produzido pelas plantas inoculadas com a mesma formulação e que receberam irrigação logo após a semeadura. A produção de matéria seca das plantas inoculadas com formulação inoculante turfosa foi inferior aos demais tratamentos exceto ao produzido pelas plantas inoculadas com as formulações G1, G4, G7 e L6, com irrigação, e G1 e G2, com irrigação cinco dias após a semeadura e dos tratamentos controle sem adição de nitrogênio com e sem irrigação logo após a semeadura.

Analisando-se o efeito do estresse hídrico sobre a nodulação das plantas inoculadas com as diferentes formulações (Tabela 3), observa-se que, apesar

Tabela 3 Massa da parte aérea, número de nódulos, massa de nódulos de plantas de soja cultivadas em vasos com solo de segundo cultivo e submetidas à irrigação na semeadura ou cinco dias após, a partir de sementes inoculadas com os diferentes inoculantes. (Médias de 3 repetições).

Estresse hídrico	Tratamentos	Massa da parte aérea (g)	Número de nódulos	Massa de nódulos (mg)
Irrigado	T+N	4,57 abcdef	-	-
	Turfa	3,35 gh	54,7 abcd	176,4 bcdef
	G1	3,67 fgh	67,7 abc	175,1 bcdef
	G2	4,37 abcdef	36,7 defghij	131,3 fg
	G3	4,24 abcdef	49,3 bcdefg	197,4 abcdef
	G4	3,89 defgh	38,3 defghij	147,9 cdef
	G5	4,58 abcdef	66,0 abc	192,9 abcdef
	G6	4,32 abcdef	34,0 defghij	156,3 bcdef
	G7	3,89 defgh	73,7 ab	204,6 abcdef
	G8	4,19 abcdef	41,3 defghij	163,2 bcdef
	L1	4,74 abcd	76,3 a	238,1 ab
	L3	4,84 ab	54,3 abcde	274,4 a
	L5	4,63 abcde	45,3 cdefg	225,6 abcd
	L6	3,87 defgh	44,7 cdefgh	174,0 bcdef
	L7	4,53 abcdef	51,7 abcdef	205,3 abcdef
T-N	4,03 bcdefg	-	-	
Irrigado após 5 dias	T+N	4,58 abcdef	-	-
	Turfa	3,20 h	19,7 j	63,8 g
	G1	3,73 efgh	20,7 ij	136,5 efg
	G2	3,88 defgh	37,0 defghij	154,7 bcdef
	G3	4,26 abcdef	32,3 defghij	165,7 bcdef
	G4	4,44 abcdef	33,3 defghij	222,3 abcde
	G5	4,94 a	40,0 defghij	202,2 abcdef
	G6	4,42 abcdef	24,0 hij	172,1 bcdef
	G7	4,94 a	32,0 defghij	207,0 abcdef
	G8	4,53 abcdef	31,3 efghij	177,1 bcdef
	L1	4,69 abcd	37,3 defghij	178,6 bcdef
	L3	4,83 abc	34,7 defghij	223,3 abcd
	L5	4,40 abcdef	28,0 ghij	206,6 abcdef
	L6	4,62 abcde	43,0 cdefgh	233,2 abc
	L7	4,32 abcdef	31,0 fghij	143,3 def
T-N	3,92 cdefg	-	-	

Obs.: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água; T+N = 100 Kg de N.ha⁻¹; T-N = sem nitrogênio.

de o número de nódulos formados ter sido maior do que o observado no experimento em solo de primeiro cultivo (Tabela 2) houve uma redução do número de nódulos causada pelo estresse hídrico. A nodulação das plantas inoculadas com as formulações L1, G1, G5, G7 e turfa foram afetadas pelo estresse hídrico com redução de 49 a 36%.

As demais formulações não diferiram quanto ao número de nódulos formados, nas duas condições de irrigação, o que pode estar relacionado com a capacidade para proteção dos rizóbios contra o dessecamento.

Quanto à massa de nódulos produzidos (Tabela 3), apenas a nodulação das plantas inoculadas com a formulação inoculante turfoso foi afetada pelo estresse hídrico, indicando que nas condições de realização do experimento, todas as formulações inoculantes com mistura de biopolímeros apresentaram efeito protetor maior do que a formulação com turfa. Estes resultados foram diferentes dos ocorridos no primeiro cultivo, para as formulações L1, G5, G7 e turfa indicando que estas formulações, não proporcionaram uma boa proteção às bactérias inoculadas frente ao estresse hídrico. Obs.: Neste experimento, o tratamento com a formulação L2 foi perdido por falha na germinação das sementes (Tabela 3).

4.4 Avaliação da viabilidade dos rizóbios dos inoculantes em sementes de soja no solo sob condições de estresse térmico

O monitoramento da variação da temperatura ambiente e no solo dos vasos comprovou que houve diferenças entre as duas casas de vegetação utilizadas nos experimentos, com efeitos claramente visíveis no desenvolvimento das plantas expostas às diferentes condições térmicas.

4.4.1 Monitoramento da temperatura do solo nos vasos de primeiro cultivo

Na casa de vegetação com cobertura de sombrite e aspersão de água no piso, a temperatura ambiente interna variou de 16 °C a 36 °C (Apêndice 9), possibilitando temperaturas médias no solo dos vasos do tratamento TS (envoltos em papel alumínio) de 28 °C e nos vasos do tratamento TT (sem papel alumínio) de 30 °C, nos primeiros dez dias do experimento.

Em outra casa de vegetação, com o tratamento TCV, que não possuía cobertura de sombrite, nem aspersão de água no piso, ocorreu uma variação de temperatura ambiente interna entre 20 °C e 50 °C (Apêndice 9), possibilitando a obtenção de uma temperatura média no solo dos vasos de cerca de 38 °C nos primeiros dez dias de condução do experimento. A variação na temperatura do solo nos vasos, durante os dez primeiros dias de cultivo, é mostrada na Figura 4.

4.4.2 Avaliação da inoculação com as diferentes formulações, em vasos com solo de primeiro cultivo submetidos a estresse de térmico

Em geral, as plantas que cresceram em solo com temperatura mais elevada, tratamento TCV (temperatura média de 38°C), independente do tipo de formulação com que foram inoculadas, apresentaram desenvolvimento prejudicado e menor produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 4) do que os demais tratamentos, exceto as plantas inoculadas com as formulações G7 e G2.

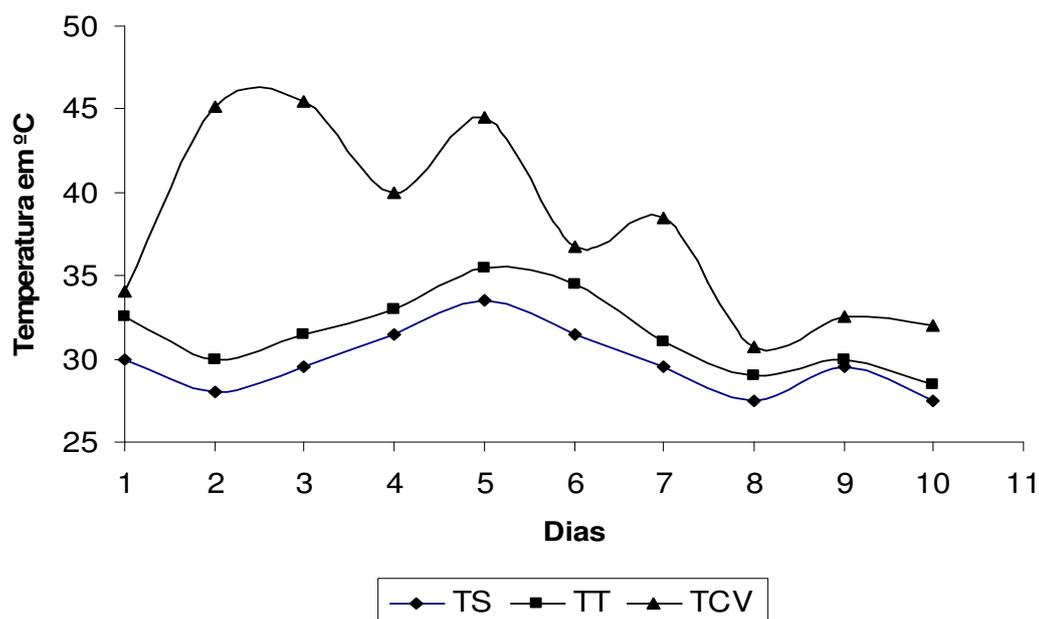


Figura 4 Variação da temperatura do solo nos vasos submetidos a estresse térmico durante os primeiros 10 dias após a inoculação e plantio em solo de primeiro cultivo. Legenda: TS= vasos em casa de vegetação, aspersão de água e revestidos com papel alumínio; TT = vasos em casa e vegetação com aspersão de água; TCV = vasos em casa de vegetação fechada e sem aspersão de água.

A produção de matéria seca das plantas inoculadas com a formulação G7 (tratamento TCV), somente foi inferior ao obtido pelas plantas inoculadas com as formulações G1, G2, G8, L6, L7, submetidas ao tratamento TT (temperatura média de 30°C) e das inoculadas com turfa (tratamento TS com temperatura média de 28°C). Já para as plantas inoculadas com a formulação G2, a produção de matéria seca da parte aérea não foi diferente da obtida para os tratamentos inoculados com as formulações L1 e do controle sem adição de nitrogênio, do tratamento TS, e da obtida nas plantas do controle sem adição de nitrogênio, do tratamento TT. O número de nódulos obtido nas plantas inoculadas, em todos os tratamentos, não foi muito elevado, comparado ao experimento de primeiro cultivo (Tabela 4), provavelmente

refletindo o efeito inibidor à nodulação do teor de nitrogênio mineral em solo de primeiro cultivo.

Os resultados obtidos também mostram que, em geral, o aumento da temperatura do solo provocou uma diminuição no número de nódulos formados nas raízes das plantas inoculadas independente da formulação utilizada. Os valores de número de nódulos radiculares obtidos em solos com pouca variação na temperatura média (tratamento TS e TT) não diferiram para nenhuma formulação inoculante utilizada. No entanto, a temperatura elevada do solo, média de 38°C (tratamento TCV), provocou uma forte redução no número de nódulos, que ficou abaixo de dez nódulos por planta, em todas as plantas inoculadas. No entanto, o número de nódulos formados nas plantas inoculadas com a formulação G1 (tratamento TCV), não diferiu dos valores obtidos pelas plantas inoculadas com a mesma formulação (G1) em temperaturas médias de 28°C (tratamento TS). O mesmo pode ser observado com os resultados obtidos com a inoculação com a formulação L1 (tratamento TCV), que não diferiram dos obtidos com a inoculação da mesma formulação em temperaturas médias de solo de 30°C (tratamento TT). Aparentemente, estas formulações foram capazes de exercer algum efeito protetor aos rizóbios contra altas temperaturas em solo de primeiro cultivo. A massa de nódulos secos produzidos pelas plantas inoculadas com as diferentes formulações (Tabela 4), pode-se observar que a temperatura mais elevada no solo, tratamento TCV, teve um efeito drástico, produzindo resultados inferiores a todos os demais tratamentos. Isto indica que as temperaturas elevadas do solo não apenas reduziram o número de nódulos como induziram a formação de nódulos com menor massa.

Tabela 4 Massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos por planta de soja, inoculada com as diferentes formulações, cultivadas em vasos com solo de primeiro cultivo em estresse de temperatura em casa de vegetação. (Médias de 3 repetições).

Estresse de temperatura	Tratamentos	Massa da parte aérea (g)	Número de nódulos	Massa de nódulos (mg)
TS	T+N	2,03 abcd	-	-
	Turfa	2,32 ab	20,5 abc	60,1 a
	G1	2,25 abcd	13,2 cdef	47,4 abcde
	G2	2,23 abcd	16,8 abcd	43,4 bcdef
	G4	2,23 abcd	21,7 abc	54,4 abc
	G5	2,23 abcd	11,8 defg	48,2 abcde
	G6	2,21 abcd	15,5 bcd	42,7 bcdefg
	G7	2,10 abcd	20,3 abc	44,4 bcdef
	G8	2,17 abcd	16,5 abcd	49,7 abcde
	L1	1,99 bcde	16,0 bcd	52,8 abc
	L2	2,07 abcd	20,7 abc	48,7 abcde
	L3	2,18 abcd	22,7 ab	55,5 ab
	L5	2,11 abcd	15,0 bcd	37,6 efg
	L6	2,18 abcd	18,0 abcd	43,1 bcdef
	L7	2,25 abcd	16,3 abcd	45,1 bcdef
T-N	1,91 cdef	-	-	
TT	T+N	2,14 abcd	-	-
	Turfa	2,05 abcd	18,2 abcd	48,1 abcde
	G1	2,37 a	18,5 abcd	49,8 abcde
	G2	2,35 ab	18,7 abcd	52,1 abcd
	G4	2,13 abcd	17,5 abcd	43,3 bcdef
	G5	2,11 abcd	20,0 abcd	51,3 abcde
	G6	2,16 abcd	14,7 bcde	37,4 efg
	G7	2,14 abcd	25,5 a	38,9 defg
	G8	2,28 abc	16,3 abcd	43,8 bcdef
	L1	2,15 abcd	14,7 bcde	42,5 bcdefg
	L2	2,06 abcd	17,3 abcd	33,2 fg
	L3	2,03 abcd	20,8 abc	49,5 abcde
	L5	2,19 abcd	14,0 bcdef	42,7 bcdefg
	L6	2,33 ab	19,3 abcd	41,3 cdefg
	L7	2,32 ab	14,5 bcdef	29,7 g
T-N	1,99 bcde	-	-	

Tabela 4 - Continuação...

Estresse de temperatura	Tratamentos	Massa da parte aérea (g)	Número de nódulos	Massa de nódulos (mg)
TCV	T+N	1,39 ghi	-	-
	Turfa	1,42 ghi	7,2 ghij	1,8 h
	G1	1,28 hij	8,3 efgh	8,3 h
	G2	1,68 efg	3,5 jkl	1,2 h
	G4	1,04 j	4,0 hijkl	1,5 h
	G5	1,42 ghi	6,5 ghijk	6,5 h
	G6	1,15 ij	3,5 jkl	2,3 h
	G7	1,89 def	6,5 ghijk	7,3 h
	G8	1,53 ghi	6,0 ghijk	7,8 h
	L1	1,41 ghi	8,3 efgh	6,3 h
	L2	1,34 ghij	3,5 jkl	1,7 h
	L3	1,34 ghij	2,5 kl	1,6 h
	L5	1,13 ij	1,5 l	1,3 h
	L6	1,26 hij	1,2 l	1,0 h
	L7	1,24 hij	2,8 jkl	1,4 h
T-N	1,39 ghi	-	-	

Obs.: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água; T+N = 100 Kg de N.ha⁻¹ ; T-N = sem nitrogênio.

Observa-se também que as plantas inoculadas com as formulações líquidas L2 e L7, em temperatura média de solo de 30°C, tratamento TT, produziram menor massa de nódulos em relação ao produzido pelas plantas inoculadas com as mesmas formulações em solo com temperatura média de 28°C, tratamento TS. Estes resultados estão de acordo com indicações, encontradas na literatura que indicam temperaturas entre 25 °C e 35 °C como as ideais para o processo de fixação biológica de nitrogênio (Norris & Date, 1976). Além disso, a exposição a temperaturas acima de 35 °C pode levar algumas estirpes a perderem a capacidade de infecção (Somasegaran et al.,

1984). Temperaturas acima de 39 °C também inibem a formação de raízes nas plantas, reduzindo o número de sítios de infecção, a aderência das bactérias às raízes, a formação dos nódulos e o desenvolvimento dos bacteróides (Gibson, 1971; Vincent, 1980).

4.4.3 Monitoramento da temperatura do solo nos vasos de segundo cultivo

No segundo cultivo realizado, as variações na temperatura do solo foram mais amenas (Figura 5). Na casa de vegetação com cobertura de sombrite e aspersão de água no piso, a temperatura ambiente interna variou de 9 °C a 32 °C, possibilitando temperaturas médias de 26 °C no solo dos vasos do tratamento TS (envoltos em papel alumínio) e de 27 °C nos vasos do tratamento TT (sem papel alumínio), nos primeiros dez dias do experimento.

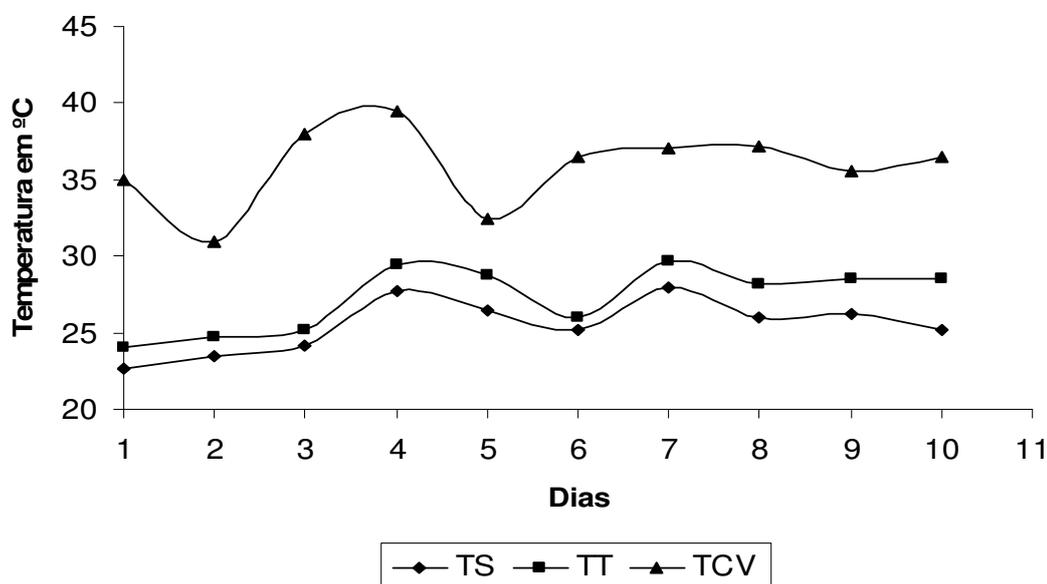


Figura 5 Variação da temperatura do solo nos vasos submetidos a estresse térmico durante os primeiros 10 dias após a inoculação e plantio em solo de segundo cultivo. Legenda: TS = vasos em casa de vegetação, aspersão de água e revestidos com papel alumínio; TT = vasos em casa de vegetação com aspersão de água; TCV = vasos em casa de vegetação fechada e sem aspersão de água.

A outra casa de vegetação que não possuía cobertura de sombrite nem aspersão de água no piso (tratamento TCV) apresentou uma variação de temperatura ambiente interna mínima de 11 °C e máxima de 42 °C, possibilitando a obtenção de uma temperatura média no solo do vaso de 36 °C nos primeiros dez dias de condução do experimento (Figura 5). Obs.: Neste experimento, o tratamento com a formulação G3 foi perdido por falha na germinação das sementes (Tabela 4).

4.4.4 Avaliação da inoculação com as diferentes formulações, em vasos com solo de segundo cultivo submetidos a estresse de térmico

A produção de matéria seca das plantas, crescidas em solo de segundo cultivo (Tabela 5) e inoculadas com as diferentes formulações inoculantes, não foi muito afetada pelas diferentes temperaturas médias no solo, como ocorreu nos experimentos em solo de primeiro cultivo (Tabela 4). No entanto, as plantas inoculadas com as formulações líquidas L1 e L5, em solo com temperatura média de 36°C (tratamento TCV), produziram menor quantidade de matéria seca do que aquelas inoculadas com as mesmas formulações em solo com temperatura média de 26°C (tratamento TS).

Avaliando-se o efeito da temperatura do solo de segundo cultivo sobre o número de nódulos radiculares (Tabela 5) formados nas plantas inoculadas com as diferentes formulações, observa-se que ocorreu uma redução no número de nódulos formados nas plantas inoculadas com as formulações L3 e L7, em solo com temperatura média de 36°C, tratamento TCV, em relação ao produzido em plantas inoculadas com as mesmas formulações em solo com temperatura média de 26°C (tratamento TS).

Tabela 5 Massa da parte aérea, número de nódulos e massa de nódulos de plantas de soja, inoculadas com as diferentes formulações inoculantes, cultivadas em vasos com solo de segundo cultivo e submetidas a estresse de temperatura em casa de vegetação. (Médias de 3 repetições).

Estresse de temperatura	Tratamentos	Massa da parte aérea (g)	Número de nódulos	Massa de nódulos (mg)
TS	T+N	4,03 defghijk	-	-
	Turfa	4,13 defghijk	49,3 abc	161 defghijk
	G1	4,28 bcdefghij	54,3 ab	160 defghijk
	G2	3,83 fghijkl	46,7 abcd	175 bcdefghij
	G3	3,63 jkl	43,3 abcde	167 cdefghij
	G4	4,74 abcdefg	39,7 abcde	170 bcdefghij
	G5	4,25 cdefghij	48,0 abcd	139 efghijkl
	G6	4,44 abcdefghij	43,0 abcde	151 defghijk
	G7	4,41 abcdefghij	46,3 abcd	137 fghijkl
	G8	3,70 hijkl	41,0 abcde	145 defghijk
	L1	4,56 abcdefghi	39,0 abcde	174 bcdefghij
	L2	4,39 abcdefghij	32,7 cdef	127 hijkl
	L3	4,64 abcdefg	48,7 abc	167 cdefghij
	L5	4,31 abcdefghij	43,0 abcde	156 defghijk
	L6	3,76 ghijkl	47,0 abcd	193 bcdefgh
	L7	4,56 abcdefghi	42,0 abcde	164 cdefghij
	T-N	3,93 efghijk	-	-
TT	T+N	3,96 efghijk	-	-
	Turfa	4,18 defghijk	40,7 abcde	180 bcdefghij
	G1	4,29 bcdefghij	41,3 abcde	158 defghijk
	G2	4,75 abcdef	40,7 abcde	148 defghijk
	G3	4,01 defghijk	38,3 bcdef	160 defghijk
	G4	3,85 fghijkl	44,3 abcd	192 bcdefgh
	G5	4,11 defghijk	44,7 abcd	148 defghijk
	G6	5,01 abc	51,0 abc	137 fghijkl
	G7	5,09 ab	53,7 ab	172 bcdefghij
	G8	4,35 bcdefghij	43,0 abcde	202 abcdef
	L1	4,29 bcdefghij	43,0 abcde	158 defghijk
	L2	4,71 abcdefg	48,7 abc	192 bcdefgh
	L3	4,56 abcdefghi	41,7 abcde	190 bcdefgh
	L5	3,67 hijkl	45,0 abcd	211 abcd
	L6	4,34 bcdefghij	41,0 abcde	206 abcd
	L7	4,76 abcdef	32,0 cdef	94 kl
	T-N	4,33 bcdefghij	-	-

Tabela 5 – Continuação...

Estresse de temperatura	Tratamentos	Massa da parte aérea (g)	Número de nódulos	Massa de nódulos (mg)
TCV	T+N	4,78 abcde	-	-
	Turfa	4,10 defghijk	61,0 a	186 bcdefghi
	G1	4,13 defghijk	46,0 abcd	190 bcdefgh
	G2	3,77 ghijkl	44,7 abcd	205 abcde
	G3	4,78 abcde	40,7 abcde	115 jkl
	G4	3,76 ghijkl	51,0 abc	134 ghijkl
	G5	4,62 abcdefgh	41,3 abcde	227 abc
	G6	5,24 a	23,0 f	135 fghijkl
	G7	4,93 abcd	43,7 abcd	261 a
	G8	4,73 abcdefg	40,7 abcde	234 ab
	L1	3,42 jkl	46,7 abcd	198 bcdefg
	L2	4,31 bcdefghijk	29,0 def	133 ghijkl
	L3	4,08 defghijk	25,3 ef	79 lm
	L5	3,07 l	31,7 cdef	155 defghijk
	L6	4,20 cdefghij	33,3 cdef	120 ijkl
	L7	4,50 abcdefghij	24,7 f	32 m
	T-N	4,63 abcdefgh	-	-

Obs.: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água; T+N = 100 Kg de N.ha⁻¹ ; T-N = sem nitrogênio.

O mesmo foi observado em plantas inoculadas com a formulação G6, em solo do tratamento TCV, em relação ao produzido por plantas inoculadas com a mesma formulação em solos dos tratamentos TS e TT. As plantas inoculadas com esta formulação, no tratamento TCV, apresentaram quase o mesmo número de nódulos do que as plantas inoculadas com as formulações L3 e L7. No entanto, observa-se que a massa de nódulos e a produção de matéria seca das plantas inoculadas com a formulação G6 não sofreram redução, submetidas à temperatura elevada no solo, como ocorreu com as plantas inoculadas com as formulações L3 e L7. Aparentemente a

mistura de goma xantana, jataí, PVP e meio glicerol, da formulação do gel G6, ofereceu maior efeito protetor para as células dos rizóbios.

Ao contrário do observado no experimento em solo de primeiro cultivo (Tabela 4), não se verificou uma redução generalizada, em função da temperatura e do teor de nitrogênio do solo, na massa de nódulos (Tabela 5) produzida pelas plantas inoculadas com as diferentes formulações. A temperatura mais elevada do solo, tratamento TCV, reduziu a massa de nódulos produzida pelas plantas inoculadas com as formulações L3, L6 e L7 (Tabela 5), em relação ao obtido pelas plantas inoculadas com as mesmas formulações em solos com temperaturas médias de 26 a 27 °C, tratamentos TS e TT, respectivamente.

Resultado semelhante foi observado com as plantas inoculadas com a formulação líquida L7 em experimento com solo de primeiro cultivo (Tabela 4). Aparentemente, esta formulação inoculante não apresenta efeito protetor contra a temperatura para os rizóbios. Observa-se que esta formulação não apresenta na sua formulação goma xantana, nem goma jataí ou goma guar, constituindo-se de uma mistura do polímero natural goma arábica, em baixa concentração, e dos polímeros sintéticos PVP e PVA.

As diferenças observadas na sobrevivência das células dos rizóbios em temperaturas elevadas podem estar relacionadas com o tipo de goma utilizada e sua maior ou menor capacidade de reter água e suspender nutrientes em formas disponíveis para o crescimento do rizóbio, conferindo proteção às bactérias inoculadas nas sementes (Smith, 1987).

4.5 Avaliação da sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* inoculadas em sementes de soja

A avaliação da sobrevivência das estirpes inoculadas sobre sementes de soja, realizada sete meses após a preparação das formulações inoculantes, em temperaturas de 28 e 40°C por até 72 Horas, mostrou que as formulações inoculantes apresentaram diferenças quanto ao efeito protetor contra a temperatura (Figuras 6 e 7).

4.5.1 Avaliação na temperatura de 28 °C

O armazenamento por diferentes períodos na temperatura de 28°C não causou diferenças significativas na sobrevivência das células dos rizóbios das formulações inoculantes (Figura 6). Nesta temperatura, os fatores que poderiam reduzir a sobrevivência do rizóbio seriam a dessecação e o efeito tóxico de exudatos das sementes sobre as estirpes inoculadas (Roughley et al., 1995), no entanto, tais efeitos não foram observados neste trabalho.

Os inoculantes na forma de gel proporcionaram a aderência de mais de 10^5 células por semente e os líquidos, bem como o turfoso, apresentaram contagens acima de 10^6 células por semente após sete meses de sua preparação.

Para melhorar a aderência do inoculante turfoso foi utilizada uma solução adesiva (carboximetilcelulose a 0,5 %) o que permitiu a obtenção de número de células aderidas semelhante aos inoculantes na forma líquida (Figura 6).

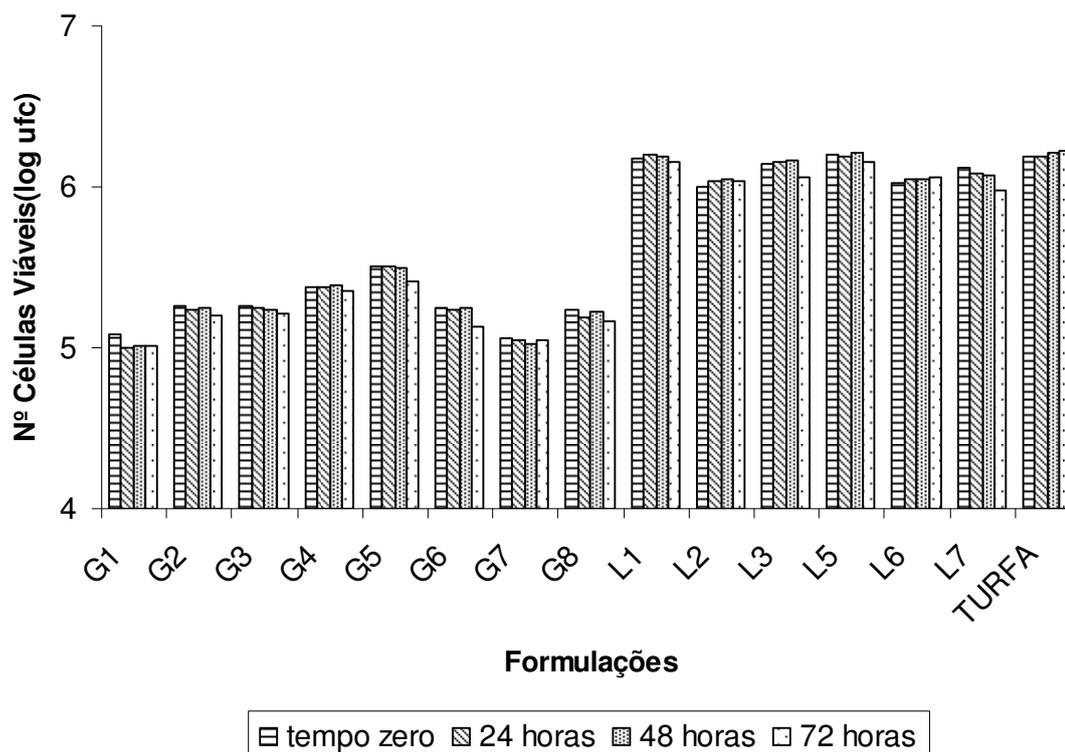


Figura 6 Avaliação do número de células viáveis após inoculação em sementes de soja e armazenamento na temperatura de 28 °C por 24, 48 e 72 horas e comparadas com a contagem inicial. Legenda: G1= xantana +pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água.

4.5.2 Avaliação na temperatura de 40 °C:

Na avaliação realizada nas sementes armazenadas a 40 °C verificaram-se as maiores diferenças na sobrevivência das estirpes inoculadas nas sementes de soja, quando mantidas nesta temperatura por até 72 horas (Figura 7).

Nas primeiras 24 horas de exposição à temperatura de 40 °C, os inoculantes não apresentaram redução significativa no número de células

viáveis (Figura 7). Após 48 horas, apenas as formulações L1, L2, L3 e L5 tiveram uma redução importante no número de ufc/semente mostrando pouco efeito protetor para as células dos rizóbios.

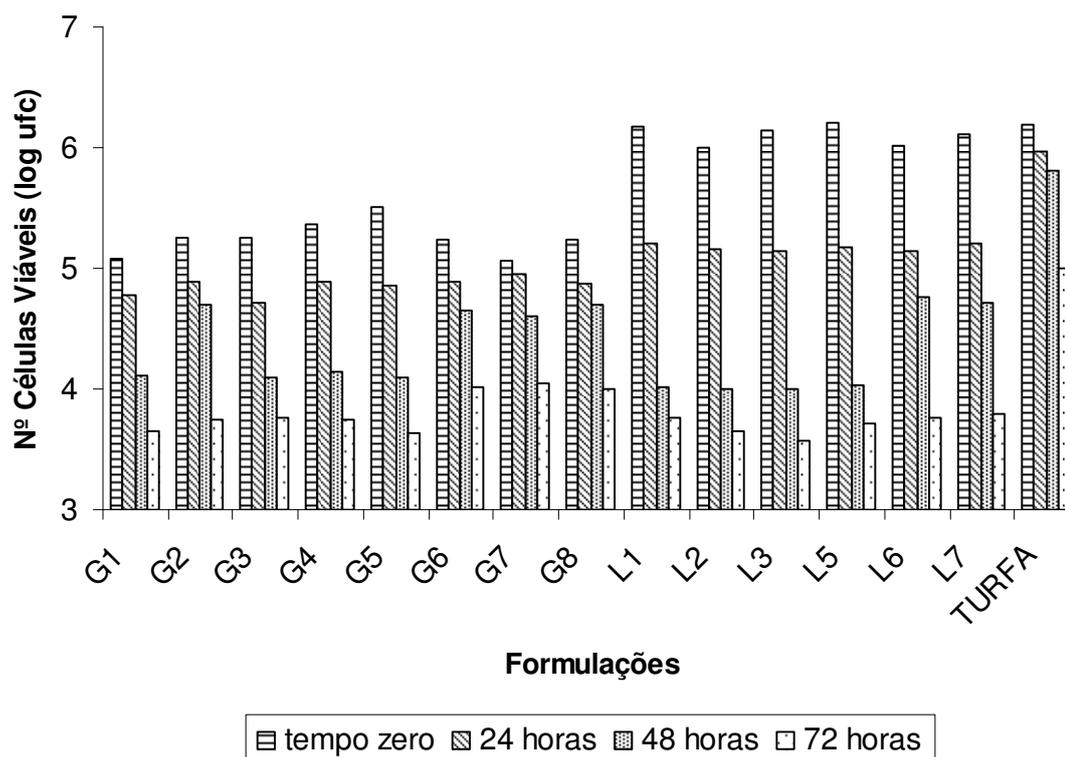


Figura 7 Avaliação da sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* das formulações após inoculação em sementes de soja e armazenadas à temperatura de 40 °C por 24, 48 e 72 horas e comparadas com a contagem inicial. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água.

Na terceira amostragem, em 72 horas, observa-se que a redução do número de células viáveis foi significativa em todas as formulações, exceto nos inoculantes em gel G6, G7, G8 e em turfa, o que indica que estes tratamentos

proporcionaram maior proteção ao rizóbio (Figura 7). Estes resultados indicam que estas formulações poderiam proteger as células dos rizóbios nas sementes inoculadas colocadas no solo.

No solo, as estirpes de rizóbio têm que sobreviver ao estresse imposto pela semente, temperatura e dessecação. No caso de *Bradyrhizobium japonicum*, cerca de 10% das estirpes podem se multiplicar a 38 °C e cerca de 70% têm temperaturas máximas permissíveis na faixa de 35,2 a 36,7 °C (Munévar & Wollum, 1981).

Estudando a sobrevivência de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii, inoculadas com turfa em sementes de trevo vesiculoso e sob estresse de temperatura e dessecação, Trotman & Weaver, (2000) observaram redução no número de células viáveis em taxas de 0,5 logaritmo após quatro dias de incubação a 37 °C e 100 % de umidade relativa.

Os efeitos sobre as estirpes inoculadas foram menores nas formulações G6, G7, G8 e turfa, provavelmente, pelo fato de que estas formulações em gel têm maior quantidade de goma, o que ajuda a manter um maior teor de umidade, aumentando a capacidade de sobrevivência das bactérias inoculadas. O inoculante turfoso pode ter protegido a sobrevivência das bactérias por ter uma estrutura porosa e micro-particulada, com maior retenção de água.

4.5.3 Taxa de Mortalidade a 40 °C:

A taxa de mortalidade (Figura 8) é um índice que reflete a intensidade da redução do número de células viáveis nas formulações inoculantes e foi calculada para a condição de armazenamento em temperatura de 40 °C por 72

horas. Em geral as formulações inoculantes líquidas, L1, L2, L3, L5, L6 e L7, foram as que apresentaram as maiores taxas de mortalidade em armazenamento a 40°C por 72 horas. Entre as formulações inoculantes em gel, a formulação G5 foi a que apresentou a maior taxa de mortalidade.

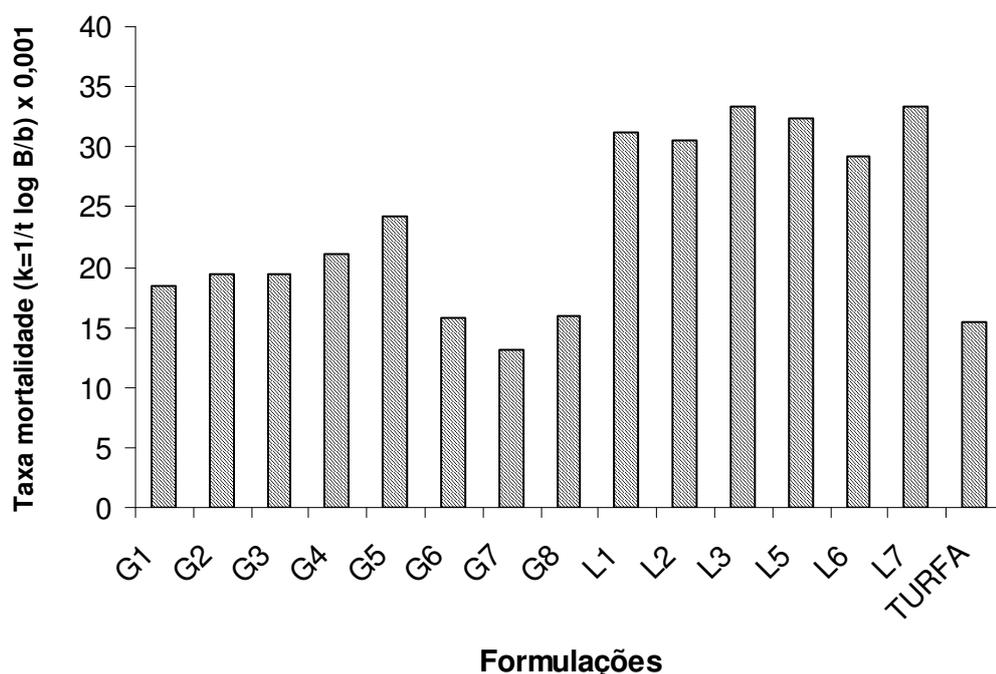


Figura 8 Taxa de mortalidade calculada para o número de células viáveis de *Bradyrhizobium*, aderidas a sementes de soja e armazenadas na temperatura de 40 °C por 72 horas. Legenda: G1= xantana + pvp + água; G2= xantana + guar + água; G3= xantana + jataí + água; G4= xantana + guar + pvp + água; G5= arábica + jataí + pva + água; G6= xantana + jataí + pvp + meio glicerol; G7= xantana + jataí + pvp + água; G8= xantana + guar + meio glicerol; L1= xantana + arábica + água; L2= xantana + meio glicerol; L3= xantana + água; L5= xantana + pvp + meio glicerol; L6= xantana + cmc + pvp + água; L7= arábica + pva + pvp + água.

As formulações inoculantes em gel G6, G7, G8 e em Turfa apresentaram as menores taxas de mortalidade após 72 horas a 40 °C (Figura 8), indicando que possuem maior capacidade de proteção às bactérias

inoculadas, quando submetidas a temperaturas elevadas. Provavelmente esta capacidade protetora está relacionada à maior capacidade da formulação em reter umidade.

Em um estudo de sobrevivência de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em sementes e esferas de vidro, Vincent et al. (1962), concluíram que a dessecação é a principal causa da baixa sobrevivência de estirpes de rizóbio nas sementes e ocorre em duas fases distintas: nas primeiras 24 horas, ocorre um rápido declínio no número de células viáveis, que coincide com uma rápida perda de água. Após este período, a perda de água e, conseqüentemente, a taxa de mortalidade ficam mais reduzidas e, segundo este mesmo estudo, a célula sobrevive melhor a 100 %, do que a 60 % de umidade.

Freire e Jones (1963), em um estudo sobre a influência da temperatura e perda de umidade na longevidade de inoculantes, concluíram que a perda de umidade no inoculante foi a causa do aumento da taxa de mortalidade das células de *Bradyrhizobium japonicum* inoculadas em turfa.

Os resultados deste estudo demonstram que a combinação de diferentes tipos de polímeros como xantana, jataí, guar, arábica, cmc, pvp e pva, possibilitou a formulação de inoculantes com longo tempo de vida de estocagem, mantendo as características de efetividade e infectividade dos rizóbios e com boa capacidade para proteger as células vivas contra fatores ambientais adversos como a temperatura elevada e a dessecação.

5 CONCLUSÕES

Com os dados obtidos na presente pesquisa, chegou-se as seguintes conclusões:

1) As misturas de biopolímeros, contendo goma xantana, goma jataí e goma guar, podem ser utilizadas como suportes para a formulação de inoculantes para leguminosas.

2) As misturas que originaram inoculantes líquidos possibilitaram maior aderência nas sementes do que as misturas em géis, mas proporcionaram menor proteção às estirpes de *Bradyrhizobium* frente ao estresse hídrico e altas temperaturas nos ensaios em casa de vegetação.

3) Em geral, as formulações que originaram inoculantes em géis, contendo goma xantana e guar ou xantana e jataí, com pvp ou glicerol, proporcionaram maior proteção aos rizóbios contra as condições de dessecação e temperatura elevada.

4) Os inoculantes formulados a base de biopolímeros, tanto quanto o inoculante a base de turfa, foram capazes de manter as estirpes de *Bradyrhizobium* durante o período de um ano sem perdas significativas na sobrevivência das células e produzir efetiva nodulação, quando inoculados em sementes de soja, em casa de vegetação e em condições normais de cultivo.

5) Os rizóbios das formulações G5, L1 e L7, que continham goma arábica, foram afetados pelo estresse hídrico e pelas temperaturas elevadas, reduzindo o número de nódulos formados.

6) Dentre as formulações líquidas, as que continham xantana e glicerol (L2) e com adição de pvp (L5) e a formulação que continha xantana, cmc e pvp (L6), foram as mais promissoras para a formulação de inoculantes para soja.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTIERI, C.; SIMIGAGLIA, M.; CORBO, M.R.; BUONOCORE, G.G.; FALCONE, P.; DEL NOBILE, M.A. Use of entrapped microorganisms as biological oxygen scavengers in food packaging applications. **Food Technology**, Chicago, v. 37, p. 9 -15, 2004.
- AMARGER, N. Microbiologic aspects of legume root nodule bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.28, p. 61 - 66, 2003.
- AMIET-CHARPENTER, C.; GADILLE, P.; BENOIT, J.P. Microencapsulation of rhizobacteria by spray-drying: formulation and survival studies. **Journal of Microencapsulation**, Bethesda, v. 15, p. 639 - 659, 1998.
- BOZDEMIR, O. A.; TUTAS, M. Plasticiser effect on water vapour permeability properties of locust bean gum-based edible films. **Turkey Journal of Chemistry**, Tübitak, v. 27, p. 773 - 782, 2003.
- BROCKWELL, J. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, p.143 -180, 1995.
- BUSHBY, H.V.A.; MARSHALL, K.C. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on dissection. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 9, p. 143 - 147, 1977.
- CÂMARA, G.M.S. Inoculação das sementes de soja. In: CÂMARA, G.M.S. **Soja: tecnologia de produção**. Piracicaba: [s.n.], 1998. p. 278-293.
- CARTROUX, G. Trends in rhizobial inoculant production and use. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 230, p. 21 - 30, 2001.
- CASTAÑEDA, A.R. **Utilização de aditivos em inoculantes a base de turfa não estéril de *Bradyrhizobium japonicum* estirpe semia 587**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1989. 125p. (Dissertação de Mestrado).
- CHO, M.J.; HARPER, J.E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentrations in wild-type and nodulation-mutant soybean roots. **Plant Physiology**, Melbourne, v. 95, p. 435 - 441, 1991.

- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3^a Ed. Passo Fundo: SBSC/NRS, 1995. 224p.
- COTTRELL, I.W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.19, p.117 -131, 1978.
- DARD, P.J.; WILDON, D.C. Nodulation and nitrogen fixation by *Vigna sinensis* and *Vicia autopurpurea*: The influence of concentration, form and site of application of combined nitrogen. **Australian Journal of Agricultural Research**, East Melbourne, v.21, p. 45 - 56, 1970.
- DAEKER, R.; ROUGHLEY, J.R.; KENNEDY, I. Legume seed inoculation technology - a review. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, p. 1275 - 1288, 2004.
- DENARDIN, N. D. **Avaliação de polímeros para a formulação de inoculantes com *Bradyrhizobium japonicum***. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1997. 100 p. (Tese de Doutorado).
- DeMERLIS, C.C.; SCHONEKER, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, p. 319 -326, 2003.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 17, p. 25 - 39, 2003.
- ELEGBA, M.S.; RENNIE, R.J. Effect of different inoculant adhesive agents on rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene-reducing) activity of soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill). **Canadian Journal of Soil Science**, Ontario, v. 64, p. 631 - 636, 1984.
- FERGUSON, B.J.; MATHESIUS, U. Signaling interactions during nodule development. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 22, p. 47 - 72, 2003.
- FRANKENBERG, C.L.C.; FREIRE, J.R.J.; THOMAS, R.W.S.P. Growth and competition between two strains of *Bradyrhizobium japonicum* in broth and in peat-based inoculant: dinitrogen fixation efficiency and competition for nodulation sites. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, vol. 26, nº 3, p. 211- 218, 1995.
- FREIRE, J.R.; JONES, S.H. Influência da temperatura de armazenagem e da perda de humidade na longevidade dos inoculantes de leguminosas. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre.1963. vol. 6, nº 2, p. 84-93.
- GALLETI, P. et al. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Rio de Janeiro. 1971. v. 6, p.1-8.

- GAN, Y.; STULEN, I.; KEULEN, H.; KUIPER, P.J.C. Low concentrations of nitrate and ammonium stimulate nodulation and N_2 fixation while inhibiting specific nodulation (nodule DW g^{-1} root dry weight) and specific N_2 fixation (N_2 fixation g^{-1} root dry weight) in soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 258, p. 281 - 292, 2004.
- GANTER, J.L.M.S.; REICHER, F. Water soluble galactomannans from seeds of mimosaceae spp. **Bioresource technology**, Edimburg, v. 68, p. 55 -62. 1999.
- GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.M. **Adição de montmorilonita e polivinilpirrolidona em substrato turfoso para produção de inoculantes para leguminosas**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1993.159 p. (Tese de Doutorado).
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS J.A.; GÓMEZ. E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, Ontario, v 18, p. 549 -579, 2000.
- GARTI, N. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress ? **Colloids and Surfaces**, Jerusalem, v. 152, p. 125 - 146, 1999.
- GIBSON, A.H. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. **Plant Soil**, Dordrecht, p. 139-152, 1971.
- GILLER, K.E.; WILSON, K.J. Nitrogen fixation in tropical cropping systems, Wallingford, UK: **CAB**, 1993. 313 p.
- GOMEZ, M.; SILVA, N.; HARTMANN, A.; SAGARDOY, M.; CARTROUX, G. Evaluation of commercial soybean inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 13, p. 167 -173, 1997.
- GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen-fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 93 -106, 2000.
- GUERIN, V. et al. Proteolysis and nitrogen fixation in faba-bean (*Vicia faba*) nodules under water stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.82, p. 360 - 366, 1991.
- GULDEN, R.H.; VESSEY, J.K. Low concentrations of ammonium inhibit specific nodulation (nodule number g^{-1} root DW) in soybean (*Glycine max*(L.) Merr. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 198, p.127-136, 1997.
- GUO, R. Effect of four nitrogen compounds on nodulation and nitrogen fixation in faba bean, white lupin and medic plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne v.19, p.501 - 508, 1992.

- IMSANDE, J. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 37, p. 348 - 355, 1986.
- JAWSON, D.J.; FRANZLUEBBERS, A.J.; BERG, R. *Bradyrhizobium japonicum* survival in and soybean inoculation with fluid gels. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 3, p. 617 - 622, 1989.
- JONES, F.R.; TISDALE, W.B. Effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 22, p.17 - 27, 1921.
- JOSELEAU, J.; ULLMAN, G. Biochemical evidence for the site of formation of gum Arabic in *Acacia senegal*. **Phytochemistry**, Halle v. 29, p. 3401 -3405, 1990.
- KEYSER, H.H. et al. Rhizobial ecology and technology. In: METTING, F.B. (Ed) **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**, New York: Marcel Decker, 1992. p. 205 - 226.
- KIOSSEOGLOU, A.; PAPALAMPROU, E.; MAKRI, E.; DAXASTAKIS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Functionality of medium weight xanthan gum produced by *xantomonas campestris* ATCC 1395 in batch culture. **Food Tecnology**, Chicago, v. 36, p. 425 - 430, 2003.
- LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. **Anais do I Encontro Latinoamericano sobre Plantio Direto na Pequena Propriedade**, IAPAR, Ponta Grossa, p.29-62, 1993.
- LIPS, A.; CAMPBELL, I.J.; PELAN, E.G. Agregation mechanisms in food colloids and the role of biopolymers. **Food polymers, gels and colloids**. Cambridge, v. 2, p. 1 - 21, 1991.
- LITTER, M. **Farmacologia**. 3^a ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1964, p.1495.
- LORDA, G.S.; BALATTI, A.P. Designing media. In BALATTI, A.P.; FREIRE, J.R.J. **Legume inoculants: selection and characterization of strains: production, use and management**. New York : [s.n], 1996.
- LOWENDORFF, H.S. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v.4, p. 87-124, 1981.
- MILES, A. A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of hygiene**. Cambridge, v. 38, p. 732 - 749, 1938.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO, **Portaria nº 36 de 3 de Agosto de 2004 - Anexo I**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 153 de 10 de agosto de 2004.

- MONTAÑEZ, A.; DANSO, S.K.A.; HARDSON, G. The effect of temperature on nodulation and nitrogen fixation by five *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 2, p. 165-174, 1995.
- MUGNIER, J.; JUNG, G. Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 108 - 114, 1985.
- MUNÉVAR, F.; WOLLUM, A.G. Effect of high root temperature and Rhizobium strain on nodulation, nitrogen fixation, and growth of soybeans. **Soil Science Society of America Journal**, Madison v.45, p.1113 -1120, 1981.
- NAZIH, N.; WEAVER, R.W. Numbers of clover Rhizobia needed for crown nodulation and early growth of clover in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 17, p. 121-124, 1994.
- NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology, In: SHAW, N.H.; BRYAN, W.W., (Eds.) **Tropical pasture research: principles and methods**. Hurley: Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crop, 1976. p. 134 –174.
- OBARTON, M.; ROLLIER, M.; Soybean inoculants: production and quality control. **Plant and Soil**, Dordrecht, p. 1174 -1189, 1970.
- OLSEN, P. E.; RICE, W.A.; BORDELEAU, L. M.; DEMIDOFF, A. H.; COLLINS M.M. Levels and identities of nonrhizobial microorganisms found in commercial legume inoculants made with nonsterile peat carrier. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 72 - 75, 1996.
- OSMAN, M.E.; WILLIAMS, P.A.; MENZIES, A.R.; PHILLIPS, G.O. Characterization of commercial samples of gum arabic. **Journal of Food Chemistry**, Barking, v. 41, p. 71 - 77, 1993.
- OSTROVIDOVA, G.U.; MAKEEV, A.V.; SHAMTSIAN, M.M. Polyfunctional film coatings for medical use. **Materials Science & Engineering**, Washington, v. 23, p. 545 - 550, 2003.
- PARKER, A.; GUNNING. P.A.; ROBINS, M.M. How does xanthan stabilize salad dressing ? **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 9, n.4, p. 33 - 342, 1995.
- PANKHURST, C.E.; SPRENT, J.I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogen and respiratory activities of turgid and water-stressed soybean and field bean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 27, p.1 - 9, 1976.
- PINTO, G.L.; SANABRIA, M.M. Structural features of the polysaccharide gum from *Acacia glomerulosa*. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, p. 461 - 467, 2001.
- REDDY, T.T.; TAMMISHETTI, S. Free radical degradation of guar gum. **Polymer Degradation and Stability**, New York, v. 86, p. 455 - 459, 2004.

- REUNIÃO DE PESQUISA DA SOJA DA REGIÃO SUL, 32., 2004, Passo Fundo, RS. **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina**. 2004/2005. Passo Fundo, RS, Embrapa - Trigo, 2004.
- ROUGHLEY, R.J. Legume inoculants: their technology and application. In: BECK, D. P.; MATERON, L.A. (Eds). **Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture**. Dordrecht, v. 2, p. 259 - 268, 1988.
- ROUGHLEY, R.J.; SIMANUNGKALIT, R.D.M.; GEMELL, L.G.; HARTLEY, E.J.; CAIN, P. Growth and survival of root-nodule bacteria in legume inoculants stored at high temperatures. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, nº 4-5, p. 707-712, 1995.
- SANZ, T.; FERNÁNDEZ, M.A.; SALVADOR, A.; MUÑOZ, J.; FIZMAN, S.M. Thermogelation properties of methylcellulose and their effect on a batter formula. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 19, p. 141 - 147, 2005.
- SENEVIRATNE, G.; VAN HOLM, L.H.J.; EKANAYAKE, E.M.H.G.S. Agronomic benefits of rhizobial inoculant use over nitrogen fertilizer application in tropical soybean. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 68, p. 199 -203, 2000.
- SINGLETON, P.; THIES, B.B. Useful models to predict response to legume inoculation. **Biological Nitrogen Fixation and Sustainability Agriculture**, Chichester, UK : J. Wiley and Sons, 1992. p. 245 - 256.
- SMITH, R. Production and quality control of inoculants. In: Elkan, G.H. (Ed) **Symbiotic nitrogen fixation technology**. Marcel Dekker Inc., New York, 1987, p. 391- 411.
- SOMASEGARAN, P.; REYES, V.G.; HOBEN, H.J. The influence of high temperature on the growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat inoculants during preparation and storage, and distribution. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 30, p. 23 - 30, 1984.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.
- SPRENT, J.I. Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stress. In: NUTMAN, P.S. (Ed) **Symbiotic nitrogen fixation**. Cambridge, Univ. Press, 1976. p. 405 - 420.
- STAMFORD, N. et al. Fixação do N₂ e matéria seca do caupi em dois solos de semi-árido brasileiro submetido à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 14, p. 283-290, 1990.
- STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Oxford, v.7, p.1 - 23, 1988.

- SVENNING, M.M. et al. Differential rates of inhibition of N₂ fixation by sustained low concentrations of NH₄⁺ and NO₃⁻ in northern ecotypes of white clover (*Trifolium repens* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v. 47, p. 729 -738, 1996.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995.174 p.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Modeling symbiotic performance of introduced Rhizobia in the field by use of indices of indigenous population size and nitrogen status of the soil. **Applied Environmental and Microbiology**, Washington, v. 57, p. 29 -37, 1991.
- TROTMAN, A.P.; WEAVER, R.W. Survival of rhizobia on arrowleaf clover seeds under stresses of seed-coat toxins, heat and desiccation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 218, p. 43-47, 2000.
- URLACHER, B.; NOBLE, O. Xanthan gum. Thickening and gelling agent for food. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 38, p. 284-311, 1999.
- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. Phaseolus vulgaris cultivar and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.19, p.91-101, 1988.
- VENKATESWARLU, B. et al. Effects of water deficit on N₂(C₂H₂) fixation in cowpea and groundnut. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 114, p. 69 -74, 1989.
- VINCENT, J.M.; THOMPSON, J.A.; DONOVAN, K.O. Death of root nodule bacteria on drying. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 13, p. 258 - 270, 1962.
- VINCENT, J.M. Factors controlling the legume - *Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W.E.; ORME-JOHNSON, W.H. (Eds.) **Nitrogen Fixation: vol II: Symbiotic Associations and Cyanobacteria**. Baltimore, MD: University Park Press, 1980. p.103 -129.
- VOSS, M. Inoculação de rizóbio no sulco de semeadura para soja, em um campo nativo, no norte do Rio Grande do Sul. Passo Fundo: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: **EMBRAPA**, 2002. (Comunicado Técnico, 108).
- YARDIN, M.R.; KENNEDY, I.R.; THIES, J.E. Development of high quality carrier materials for field delivery of key microorganisms used as bio-fertilisers and bio-pesticides. **Radiation Physics and Chemistry**, Washington, v. 57, p. 565 - 568, 2000.
- WALSH, K.B. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 637 - 655, 1995.

- WALKER, D.W.; MILLER, J.R. Influence of water stress on nitrogen fixation in cowpea. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.111, p. 451 - 458, 1986.
- WANCHOO, R.K.; SHARMA, P.K. Viscometric study on the compatibility of some water-soluble polymer-polymer mixtures. **European Polymer Journal**, Coventry, v. 39, p. 1481 - 1490, 2003.
- WANG, S.P.; STACEY, G. Ammonia regulation of nod genes in *Bradyrhizobium japonicum*, **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 223, p. 329 - 331, 1990.
- WOJTASZEK, P. et al. Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of the intact white lupin (*Lupinus albus* L.) plants. **Journal of Plant Physiology**, London, v. 142, p. 689 - 694, 1993.
- ZOHURIAAN, M.J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, Oxford, v. 23, p. 575 - 579, 2004.

7 APÊNDICES

APÊNDICE 1 Características físico-químicas da turfa utilizada como veículo para elaboração da formulação inoculante turfosa.

Determinações	Valores
Umidade a 75 °C %	15,00
pH (amostra "in natura")	5,40
Carbono orgânico - %	23,00
Nitrogênio (TKN) - %	0,58
Fósforo total - %	0,01
Potássio total - %	0,04
Cálcio total - %	1,40
Magnésio total - %	0,43
Enxofre total - %	0,09
Cobre total - %	1,00
Zinco total – mg/kg	68,00
Ferro total - %	0,12
Sódio total – mg/kg	106,00
Manganês total – mg/kg	524,00
Boro total – mg/kg	3,00

Obs.: Análise realizada no laboratório de Análises de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Tedesco et al., 1995).

APÊNDICE 2 Meio de cultivo extrato de levedura-manitol - LMAV
(Somasegaram & Hoben, 1994).

Manitol	10,0 g
K ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de levedura	0,5 g
Vermelho congo *	10 mL
Água destilada	1000 mL

Obs.: Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15 g de agar por litro de meio.

* Solução a 250 mg de vermelho congo em 100 mL de água destilada.

APÊNDICE 3 Meio de cultivo extrato de levedura-glicerol (Lorda & Balatti, 1996).

Glicerol	10,0 mL
K ₂ HPO ₄ (solução a 5%)	10,0 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O (solução a 2 %)	10,0 mL
NaCl (solução a 1%)	10,0 mL
CaCl ₂ (solução a 2%)	10,0 mL
FeCl ₂ (solução a 0,1%)	10,0 mL
Extrato de levedura	0,40 g
Água destilada ou deionizada q.s.p	1000 mL
pH	6,80

Obs.: Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15 g de ágar por litro de meio.

APÊNDICE 4 Meio de cultivo agar-glicose-peptona (Somasegaram & Hoben, 1994)

Glicose	5,0 g
Peptona	10,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

Obs.: Adicionar 10 mL de Púrpura de Bromocresol a 1% em etanol ao meio de cultura e ajustar para pH = 6,8.

APÊNDICE 5 Análise do solo utilizado no experimento de primeiro cultivo

Determinações	Valores		
	amostra 1	amostra 2	
Argila %	26	22	
pH (água)	6,0	6,2	
índice SMP	6,7	6,6	
P mg/dm ³	9,0	8,1	
K mg/dm ³	149	155	
M.O %	2,7	2,7	
Al cmol _c /dm ³	0,0	0,0	
Ca cmol _c /dm ³	3,2	3,8	
Mg cmol _c /dm ³	1,8	2,1	
Al + H cmol _c /dm ³	2,0	2,2	
CTC cmol _c /dm ³	7,3	8,5	
% sat da CTC	Bases	73	74
	Al	0,0	0,0
	Ca/Mg	1,8	1,8
Relações	Ca/K	8	10
	Mg/K	4,7	5
S mg/dm ³	13	13	
Zn mg/dm ³	1,7	1,6	
Cu mg/dm ³	1,8	1,3	
B mg/dm ³	0,5	0,4	
Mn mg/dm ³	2	2	

Obs.: Análise realizada no laboratório de Análise de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Tedesco et al., 1995).

APÊNDICE 6 Análise do solo utilizado no experimento de segundo cultivo

Determinações	Valores	
	amostra 1	
Argila %	22	
pH (água)	6,3	
índice SMP	6,8	
P mg/dm ³	6,2	
K mg/dm ³	67	
M.O %	2,4	
Al cmol _c /dm ³	0,0	
Ca cmol _c /dm ³	4,6	
Mg cmol _c /dm ³	2,6	
Al + H cmol _c /dm ³	1,7	
CTC cmol _c /dm ³	9,1	
% sat da CTC	Bases	81
	Al	0,0
	Ca/Mg	1,8
Relações	Ca/K	27
	Mg/K	15

Obs.: Análise realizada no laboratório de Análise de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Tedesco et al., 1995).

APÊNDICE 7 Valores de pH dos inoculantes formulados a base de biopolímeros e de turfa, ao longo de 12 meses de estocagem em condições de ambiente.

Inoculantes Formulados	Período de estocagem (dias)							
	inicial	40	60	120	180	270	360	Média
G1	6,90	6,98	6,96	7,00	7,05	7,15	7,10	7,02
G2	7,00	7,01	7,00	7,12	7,16	7,10	7,15	7,07
G3	7,05	7,02	7,04	7,10	7,11	7,15	7,12	7,08
G4	6,95	6,96	6,99	6,98	7,14	7,10	7,10	7,03
G5	6,90	6,96	6,91	6,90	6,92	6,91	6,95	6,92
G6	6,90	6,85	6,90	7,00	7,10	7,12	7,10	7,01
G7	6,98	6,90	6,99	7,05	7,00	7,14	7,10	7,02
G8	7,01	7,00	6,98	7,03	7,00	7,00	7,05	7,01
L1	6,90	6,93	6,93	6,96	6,95	6,99	7,00	6,95
L2	6,90	7,01	7,00	6,99	7,05	7,08	7,14	7,02
L3	7,02	7,01	7,05	6,99	7,10	7,14	7,16	7,06
L5	6,96	7,00	7,08	7,10	7,15	7,15	7,10	7,09
L6	6,98	7,02	7,05	7,10	7,13	7,17	7,15	7,08
L7	7,00	7,05	7,10	7,10	7,15	7,10	7,14	7,09
Turfa	5,40	6,48	6,65	6,70	6,86	6,90	6,96	6,56

Obs.: Médias de três repetições.

APÊNDICE 8 Valores de temperaturas do solo nos vasos de primeiro cultivo, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura.

Dias	TS	TT	TCV
1	30,0 °C	32,5 °C	34,0 °C
2	28,0 °C	30,0 °C	45,2 °C
3	29,5 °C	31,5 °C	45,5 °C
4	31,5 °C	33,0 °C	40,0 °C
5	33,5 °C	35,5 °C	44,5 °C
6	31,5 °C	34,5 °C	36,7 °C
7	29,5 °C	31,0 °C	38,5 °C
8	27,5 °C	29,0 °C	30,7 °C
9	29,5 °C	30,0 °C	32,5 °C
10	27,5 °C	28,5 °C	32,0 °C

Obs.: Médias de quatro repetições.

TS = tratamento com os vasos revestidos com papel alumínio em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TT = tratamento com os vasos em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TCV= tratamento com os vasos em casa de vegetação fechada e sem cobertura de sombrite

APÊNDICE 9 Variação da temperatura ambiente nas casas de vegetação, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura nos vasos de primeiro cultivo.

Dias	TS e TT		TCV	
	mínima	máxima	mínima	máxima
1	29 °C	34 °C	32 °C	37 °C
2	22 °C	30 °C	22 °C	50 °C
3	22 °C	32 °C	22 °C	50 °C
4	20 °C	36 °C	22 °C	42 °C
5	21 °C	36 °C	22 °C	46 °C
6	20 °C	35 °C	21 °C	38 °C
7	19 °C	36 °C	21 °C	39 °C
8	18 °C	33 °C	20 °C	41 °C
9	16 °C	33 °C	20 °C	32 °C
10	17 °C	34 °C	20 °C	32 °C

TS = tratamento com os vasos revestidos com papel alumínio em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TT = tratamento com os vasos em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TCV= tratamento com os vasos em casa de vegetação fechada e sem cobertura de sombrite

APÊNDICE 10 Valores de temperatura do solo nos vasos de segundo cultivo, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura

Dias	TS	TT	TCV
1	22,7 °C	24,0 °C	35,0 °C
2	23,5 °C	24,7 °C	31,0 °C
3	24,2 °C	25,2 °C	38,0 °C
4	27,7 °C	29,5 °C	39,5 °C
5	26,5 °C	28,7 °C	32,5 °C
6	25,2 °C	26,0 °C	36,5 °C
7	28,0 °C	29,7 °C	37,0 °C
8	26,0 °C	28,2 °C	37,2 °C
9	26,2 °C	28,5 °C	35,5 °C
10	25,2 °C	28,5 °C	36,5 °C

Obs.: Médias de quatro repetições.

TS = tratamento com os vasos revestidos com papel alumínio em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TT = tratamento com os vasos em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TCV= tratamento com os vasos em casa de vegetação fechada e sem cobertura de sombrite

APÊNDICE 11 Variação da temperatura ambiente nas casas de vegetação, durante os primeiros 10 dias após a inoculação e semeadura nos vasos de segundo cultivo.

Dias	TS e TT		TCV	
	mínima	máxima	mínima	máxima
1	11 °C	25 °C	11 °C	35 °C
2	10 °C	26 °C	11 °C	33 °C
3	9 °C	26 °C	11 °C	37 °C
4	13 °C	29 °C	12 °C	42 °C
5	14 °C	32 °C	14 °C	39 °C
6	15 °C	26 °C	15 °C	38 °C
7	14 °C	31 °C	15 °C	37 °C
8	17 °C	28 °C	17 °C	38 °C
9	17 °C	31 °C	15 °C	39 °C
10	14 °C	31 °C	14 °C	39 °C

TS = tratamento com os vasos revestidos com papel alumínio em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TT = tratamento com os vasos em casa de vegetação e cobertura de sombrite

TCV= tratamento com os vasos em casa de vegetação fechada e sem cobertura de sombrite.