

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**RAFAELA GOLTZ**

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium japonicum* EM  
SEMENTES DE SOJA COM ADITIVOS CELULARES E MÉTODO DE APLICAÇÃO  
DE FUNGICIDA**

**PONTA GROSSA**

**2021**

**RAFAELA GOLTZ**

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium japonicum* EM  
SEMENTES DE SOJA COM ADITIVOS CELULARES E MÉTODO DE APLICAÇÃO  
DE FUNGICIDA**

**Evaluation of survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean seeds with cell  
additives and fungicide application method**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentada como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná (UTFPR).

Orientador: Eduardo Bittencourt Sydney

**PONTA GROSSA**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**RAFAELA GOLTZ**

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Bradyrhizobium japonicum* EM  
SEMENTES DE SOJA COM ADITIVOS CELULARES E MÉTODO DE APLICAÇÃO  
DE FUNGICIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
apresentado como requisito para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e  
Biotecnologia na Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 13/dezembro/2021

---

Eduardo Bittencourt Sydney  
Doutor  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Simone Bowles  
Mestre  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Sabrina Ávila Rodrigues  
Doutora  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**PONTA GROSSA**

**2021**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais e irmã pelo suporte e apoio ao longo de toda minha vida.

Aos meus amigos por fazerem essa caminhada mais fácil.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney, pela assistência ao longo de toda a faculdade.

À Cropfield do Brasil pelo incentivo à pesquisa.

À Fertibio do Brasil pela disponibilidade e apoio para a execução deste trabalho.

## RESUMO

O Brasil é o líder mundial na produção e exportação de soja. Para tanto, são necessárias tecnologias que permitam maior rendimento de grãos por área e que, além disso, sejam sustentáveis. Nesse papel, podemos citar os inoculantes, que são produtos à base de bactérias responsáveis por promoverem ações benéficas às plantas, como a Fixação Biológica de Nitrogênio. A principal bactéria comercializada hoje é *Bradyrhizobium japonicum*, que tem ação simbiótica com a soja e que, por meio de nódulos formados nesse processo, disponibiliza Nitrogênio para a planta. O momento da aplicação do inoculante é essencial, visto que nesse processo pode-se acabar perdendo células viáveis, o que irá dificultar a ação do inoculante. A técnica de pré-inoculação é muito visada, pois otimiza o tempo dispensado durante a semeadura, facilitando o plantio de grandes áreas, porém pode acabar tendo ação deletéria nas células, principalmente com o uso de fungicida. O objetivo deste trabalho foi analisar diferentes tipos de aditivos celulares para prolongar o tempo de sobrevivência do *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja, bem como avaliar a influência do método de tratamento com fungicidas. O melhor aditivo para a recuperação das bactérias após 2 horas de inoculação foi a calda de trealose e a calda de sacarose obteve melhores resultados na recuperação após 24 horas. A aplicação em momentos separados do fungicida e inoculante corroborou com a literatura, obtendo os melhores resultados.

Palavras-chave: Inoculante; Pré-Inoculação; Soja.

## ABSTRACT

Brazil is the world leader in the production and export of soybean. For that, technologies are needed to allow greater grain yield per area and, in addition, are sustainable. In this role, we can mention inoculants which are products based on bacteria responsible for promoting beneficial actions to plants, such as Biological Nitrogen Fixation. The main bacteria sold today is *Bradyrhizobium japonicum*, which has a symbiotic action with soybeans and which, through nodules formed in this process, makes nitrogen available to the plant. The timing of application of the inoculant is essential, since in this process, viable cells can be lost, which will hinder the action of the inoculant. The pre-inoculation technique is much sought after, as it optimizes the time spent during sowing, facilitating the planting of large areas, but which can end up having a deleterious action on the cells, especially with the use of fungicide. The objective of this work was to analyze different types of cell additives to prolong the survival time of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean seeds, as well as to evaluate the influence of the fungicide treatment method. The best additive for the recovery of bacteria after 2 hours of inoculation was the trehalose syrup and the sucrose syrup obtained better results in the recovery after 24 hours. The application at separate times of the fungicide and inoculant corroborated the literature, obtaining the best results.

Keywords: Inoculant; Pre-inoculation; Soybean.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 - Sementes de soja após tratamento com “Cropbio Soja” e “Maxim XL” em bandeja no fluxo laminar.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2 - Bag plástico contendo as sementes de soja tratadas com “Cropbio Soja” .....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3 - Processo de lavagem das sementes de soja.....</b>	<b>22</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e dose dos produtos utilizados no trabalho .....	18
Tabela 2 - Tratamentos realizados para aumentar o tempo de sobrevivência de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em sementes de soja .....	19
Tabela 3 - Número de UFC nas placas de diluição $10^{-3}$ no período de 2 horas após a inoculação com os tratamentos com aditivos celulares .....	24
Tabela 4 - Análise estatística entre os tratamentos com aditivo celular (Programa R).....	24
Tabela 5 - Número de UFC nas placas de diluição $10^{-3}$ no período de 2 horas após a inoculação com fungicida “Maxim XL” .....	26



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 A cultura da soja</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Inoculantes agrícolas</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Legislação .....	13
2.2.2 Rizobactérias promotoras de crescimento .....	14
<u>2.2.2.1 <i>Bradyrhizobium japonicum</i></u> .....	<u>14</u>
<b>2.3 Tratamento de sementes</b> .....	<b>15</b>
2.3.1 Pré-inoculação das sementes .....	15
<u>2.3.1.1 Aditivos celulares</u> .....	<u>16</u>
<u>2.3.1.2 Utilização conjunta de fungicidas e inoculantes</u> .....	<u>16</u>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>17</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1 Aumento da sobrevivência de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em soja por aditivo celular</b> .....	<b>19</b>
<b>4.2 Método de tratamento de sementes de soja com fungicida e inoculante</b> .	<b>19</b>
<b>4.3 Aplicação nas sementes</b> .....	<b>20</b>
<b>4.4 Análise do ensaio</b> .....	<b>21</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1 Aumento da sobrevivência de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em soja por aditivo celular</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2 Método de tratamento de sementes de soja com fungicida e inoculante</b> .	<b>26</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>29</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja é uma das mais antigas culturas agrícolas do mundo. Nascida há mais de cinco mil anos, na região da Ásia, se popularizou em diversos países e hoje representa um dos principais *commodities* na economia mundial (CAMPEÃO *et al.* 2020). O Brasil é o maior produtor e exportador de soja do mundo, sendo que na safra de 2019/20 o país produziu cerca de 125 milhões de toneladas de soja (CONAB, 2020).

As tecnologias e avanços na área agrícola são essenciais para suprir a demanda mundial por alimento. A década de 1950 ficou marcada pelo intenso aperfeiçoamento da agricultura, por meio de novas máquinas, fertilizantes, pesticidas, melhoria nas sementes, entre outros fatores que levaram a ser conhecida como "Revolução Verde". Contudo, os efeitos positivos nas plantações não foram suficientes. O acúmulo de agentes químicos contribuiu para a poluição de águas subterrâneas, degradação do solo e redução da biodiversidade em diferentes ecossistemas, bem como foram observados fatores como deflorestação e emissão de gases (SANTOS *et al.*, 2021).

Com isso, novas tecnologias de produção mais sustentáveis ganharam espaço, tais como fixação biológica de nitrogênio, plantio direto e manejo integrado de pragas, que aumenta sua sustentabilidade e reduz as emissões de gases de efeito estufa (SANTOS *et al.*, 2021). No caso da soja, essas tecnologias são essenciais devido à sua alta demanda de Nitrogênio (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Dentre as formas de obtenção de nitrogênio pela soja, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a mais sustentável e consiste na simbiose com rizobactérias, que irão promover a conversão de N gasoso em compostos nitrogenados que serão absorvidos pela planta. O entendimento desse processo levou à difusão do uso de inoculantes durante o plantio, especialmente formulações a base de *Bradyrhizobium japonicum*, das estirpes SEMIA 5079 e 5080, no Brasil (BARROS-CARVALHO *et al.*, 2019).

Contudo, o uso de inoculantes requer alguns cuidados. Primeiramente, recomenda-se que a aplicação aconteça pouco antes do plantio e, quando há atraso no plantio, a re-inoculação se torna necessária, o que representa dificuldade, pelo acúmulo de serviços na época dos plantios, principalmente quando se pretende plantar em grandes áreas (EMBRAPA, 2010), dando espaço para a prática de pré-

inoculação. Para que a pré-inoculação seja eficiente, é necessário prolongar o tempo de sobrevivência do microrganismo, podendo ocorrer por meio do uso de aditivos.

Além disso, as sementes de soja necessitam da utilização de fungicidas para melhor desenvolvimento da cultivar. A utilização conjunta de inoculantes e fungicidas pode influenciar no comportamento de *B. japonicum*, reduzindo o número de células viáveis e conseqüentemente prejudicando o processo de FBN. Por isso, determinar a maneira como acontece o tratamento das sementes com agentes químicos e biológicos é imprescindível (CAMPO *et al.*, 2000).

O presente trabalho objetivou avaliar a sobrevivência *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com aditivos celulares, bem como avaliar o método de tratamento com fungicida e seu impacto no número de células viáveis.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.2 A cultura da soja

A soja (*Glycine max* [L.] Merr.) é uma das culturas mais importantes e expressivas do mundo, representando grande parte da dieta humana e animal, devido ao seu alto valor proteico, em torno de 40%. Além disso, é conhecido seu uso e estudo de seu óleo para a produção de biodiesel (HUNGRIA e MENDES, 2015). O Brasil ocupa hoje o título de maior produtor e exportador de soja no mundo. Na safra de 2019/20 o país produziu cerca de 125 milhões de toneladas de soja, com a ocupação de aproximadamente 37 milhões de hectares de área plantada, de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), apresentado em setembro de 2020. Além disso, a produtividade do plantio do grão no país é de 3.379 kg.ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2020).

O alto teor proteico da semente demanda uma alta concentração de nitrogênio para seu desenvolvimento, acima de diversas outras plantas. Para a produção de 1.000 kg de soja, com 6,5 % de N, são requeridos 80 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio. A soja pode obter esse nitrogênio de quatro fontes distintas: o solo, fixação não-biológica, fertilizantes nitrogenados e, por último, o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>). Considerando que o solo brasileiro pode fornecer, no máximo 30 kg N.ha<sup>-1</sup> e que a suplementação de nitrogênio seja feita com fertilizantes nitrogenados, a quantidade de nitrogênio utilizado deve ser 130 kg.ha<sup>-1</sup> devido a eficiência de utilização do N, proveniente de fertilizantes nitrogenados, ser em torno de 50% (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Contudo, conforme demonstrado por Peoples e Craswell (1992), a soja é capaz de obter todo nitrogênio necessário através do uso de inoculação das sementes por bactérias promovendo a fixação biológica de nitrogênio. Haja vista que a soja não é uma cultura típica do Brasil, o solo brasileiro não possui bactérias nativas fixadoras de nitrogênio capazes de nodular de modo eficaz, que justifica a produção de inoculantes de soja e sua aplicação no campo (JUNIOR *et al.*, 2019).

## 2.2 Inoculantes agrícolas

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o inoculante é o produto que contém microrganismos com atuação favoráveis ao crescimento de plantas. No Brasil, a grande parte dos inoculantes são compostos por rizobactérias fixadoras de nitrogênio (MELO, 2013).

Os primeiros estudos com bactérias fixadoras de nitrogênio foram conduzidos no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), na década de 1920. Logo em seguida, na década de 1930, os primeiros inoculantes foram produzidos e distribuídos para agricultores brasileiros interessados no cultivo de soja (JUNIOR *et al.* 2019). Hoje, as indústrias de inoculantes entregam ao mercado produtor brasileiro mais de 80 milhões de doses anualmente, sendo a principal cultura inoculada a soja, com cerca de 87% do total de doses (HUNGRIA e NOGUEIRA, 2018)

Durante anos o inoculante turfoso foi muito utilizado, mas na década passada foi possível observar uma tendência em se utilizar o inoculante líquido (SILVA, 2009). Isso devido à facilidade de aplicação, bem como a facilidade de esterilização do meio de cultura onde estarão os microrganismos, evitando presença de contaminantes. O bom desempenho de inoculante não turfoso depende das moléculas protetoras dos rizóbios presentes nas formulações, já que a turfa oferece proteção física e nutricional à bactéria (SILVA, 2009; HUNGRIA *et al.*, 2007).

A utilização de inoculantes a base de rizóbios e sua consequente ação de fixação biológica de nitrogênio em soja, proporcionou, no ano de 2006, uma economia de 7 bilhões na economia brasileira (JUNIOR, 2019) A produção de soja naquele ano foi de aproximadamente 52 milhões de toneladas, menos da metade da produção de 2019, o que indica a importância da inoculação na economia atual (IBGE, 2007).

### 2.2.1 Legislação

A Instrução Normativa N° 13, de 25 de março de 2001, preconiza uma concentração mínima de  $1,0 \times 10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC) por mL ou grama de produto, garantida até a data de validade, que deve ser no mínimo de 6 meses. Além disso, exige ausência de microrganismos não identificados na diluição  $10^{-5}$ , para produtos com bactérias fixadoras de nitrogênio para simbiose com

leguminosas. O órgão responsável pela fiscalização da qualidade dos inoculantes é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

### 2.2.2 Rizobactérias promotoras de crescimento

A rizosfera é a zona do solo ao redor da raiz que se encontra sob influência imediata do sistema radicular, assim as bactérias que se associam às plantas e colonizam as raízes são chamadas de rizobactérias. Dentre elas, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) se destacam por beneficiarem o crescimento de culturas agrícolas por diversas rotas (OLIVEIRA, 2009; SURESHBABU, 2016). As RPCPs quando aplicadas ao solo, em formulações simples ou misturas de inoculantes, podem causar diferentes efeitos no desenvolvimento das plantas, tais como, aumentar a germinação das sementes, a emergência das plântulas e beneficiar o crescimento das mesmas. Os gêneros de RPCPs que mais se destacam são *Rizhobium*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (LAZZARETTI e BETTIOL, 1997; ARAÚJO, 2008).

Essas bactérias podem ainda serem diazotróficas, ou seja, utilizam o nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) como fonte de N. Sob condição de limitação de nitrogênio mineral, as bactérias conhecidas como rizóbios formam nódulos simbióticos nas raízes de leguminosas, e são capazes de fornecer nitrogênio para a planta hospedeira. A conversão do nitrogênio gasoso em compostos nitrogenados orgânicos ocorre devido a essas bactérias possuírem a enzima nitrogenase, capaz de romper a tripla ligação da molécula de  $N_2$  para em seguida ser reduzida em  $NH_3$  que será convertida em íon amônio ( $NH_4^+$ ), ficando disponível para ser assimilado pelas plantas (SHULER e KARGI, 2001).

#### 2.2.2.1 *Bradyrhizobium japonicum*

Um dos exemplos mais comuns de simbiose para Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é a interação soja e bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. Essas bactérias são bastonetes Gram-negativos de tamanho 0,5-0,9 por 1,2-3,0  $\mu m$  e apresentam movimentação por flagelo subpolar ou polar. Além disso, apresentam o oxigênio como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória, não esporulam e têm

crescimento lento, com um tempo de geração de aproximadamente 7 a 13 horas (LIMA *et al.*, 2005; BIZARRO, 2008).

Dentre as espécies do gênero, o *B. japonicum* é amplamente utilizado na formulação de inoculantes para promover a fixação biológica de nitrogênio, sendo capaz de suprir todas as necessidades da soja em relação à molécula (DA SILVA, 2011). No Brasil, as duas estirpes de *B. japonicum* recomendadas para a produção comercial de inoculantes são a SEMIA 5079 e SEMIA 5080, utilizadas intensamente desde 1992. A ação simbiótica das duas estirpes se difere, enquanto a SEMIA 5079 apresenta alta capacidade de nodulação e capacidade saprófita no solo, a SEMIA 5080 tem alta eficiência na fixação de N<sub>2</sub>, explicando a comercialização de inoculantes com a mistura das duas estirpes (BARROS-CARVALHO *et al.*, 2019).

## 2.3 Tratamento de sementes

O tratamento das sementes acontece em sua maioria pelo método *on farm*, também conhecido como tratamento na fazenda, no momento da semeadura. Um dos primeiros equipamentos utilizados foi o tambor giratório com eixo excêntrico, que não oferecia uma mistura homogênea. Com a evolução da tecnologia de aplicação sobre o tratamento químico de sementes surgiram, há alguns anos, as máquinas de tratamento acionadas por energia elétrica ou na tomada de potência de tratores, nas quais um sistema de rosca sem fim realiza a mistura da semente com os produtos e os inoculantes, que ficam em reservatórios individuais (HENNING *et al.*, 2010).

### 2.3.1 Pré-inoculação das sementes

Na maior parte dos casos, a inoculação acontece durante a semeadura, o que reduz a eficiência do processo, devido ao tempo e mão-de-obra despendidos para inocular as sementes. Para tanto, a prática de pré-inoculação tem se tornado muito desejada, visto que otimiza a semeadura. Essa prática deve manter a viabilidade bacteriana pelo maior tempo possível, já que a eficiência do inoculante vai depender do número de células viáveis desde a sua fabricação até o uso pelo agricultor. A recomendação pela legislação brasileira é de que resulte em um mínimo de 160.000 células.semente<sup>-1</sup> até o prazo final de validade do produto (HUNGRIA *et al.*, 2020; HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

### 2.3.1.1 Aditivos celulares

Devido à suscetibilidade do inoculante a fatores externos durante a inoculação, recomenda-se o uso de produtos para auxiliar a manutenção das bactérias por um período de tempo maior. Os aditivos promovem a proteção das células da ação de fungicidas utilizados em tratamentos de sementes de soja, possibilitando inocular as sementes imediatamente após o tratamento, mesmo quando a semeadura for realizada após algumas horas. Além disso, devido à sua fórmula incluir a presença de açúcares, fornece substrato para a sobrevivência do inóculo durante o período de tempo que antecede a simbiose (FRIZZO, 2018; FIPKE, 2015).

### 2.3.1.2 Utilização conjunta de fungicidas e inoculantes

Além da absorção do nitrogênio pela planta, existem outros fatores a serem considerados para um plantio saudável e de alto rendimento de soja. Essa cultivar é muito influenciada pelo ataque de fungos, tornando inevitável o uso de fungicidas. A utilização desses é necessária para evitar a disseminação de fitopatógenos, e a infecção prematura das plantas, já que a infecção e disseminação desse patógeno é muito rápida, fazendo com que a planta diminua seu potencial produtivo e consequentemente tenha queda na produtividade da lavoura (RIBEIRO *et al.*, 2019; BUENO; MEYER; DE SOUZA, 2003). Assim, durante o tratamento das sementes deve-se também atentar a aplicação conjunta destes com os inoculantes, pois a ação do fungicida pode impactar diretamente na sobrevivência dos rizóbios, bem como na nodulação, devido à redução no número de células viáveis na semente (CAMPO e HUNGRIA, 2000; FERREIRA *et al.*, 2003).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* inoculado em semente de soja.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Validar a metodologia de recuperação de rizóbios em sementes do MAPA;
- Avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja sem tratamento;
- Avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com aditivos para proteção celular;
- Avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja submetidas a tratamento com fungicida “Maxim XL”;
- Avaliar a sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em relação ao método de aplicação do fungicida.

## 4 METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram testados os efeitos de ativos celulares (4.1) e o método de aplicação do fungicida (4.2) ambos aplicados conforme descritos no item 4.3 e analisados conforme o item 4.4.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade da indústria de inoculantes agrícolas Fertibio do Brasil®, localizada em Ponta Grossa - PR.

As concentrações utilizadas de cada um dos produtos, bem como sua composição estão indicadas a seguir na Tabela 1:

**Tabela 1 - Composição e dose dos produtos utilizados no trabalho**

Produto	Composição	Dose
Cropbio Soja	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5079 + <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SEMIA 5080	2 mL.kg sem <sup>-1</sup>
Maxim XL	Fludioxonil (2,5%) + Metalaxyl-M (1%) + Ingredientes inertes (97%)	1 mL.kg sem <sup>-1</sup>
Pro-Longer Seeder	Umectantes + Carboidratos + Conteúdo orgânico	0,5 mL.kg sem <sup>-1</sup>
Calda de Sacarose	Sacarose (10%) + água	6 mL.kg sem <sup>-1</sup>
Calda de Trealose	Trealose (10%) + água	6 mL.kg sem <sup>-1</sup>

**Fonte: Autoria própria (2021)**

O aditivo celular “Pro-Longer Seeder” está em fase de testes pela empresa Cropfield do Brasil.

Foi realizada a análise do inoculante seguindo a metodologia oficial do MAPA, para verificar o número de UFC.mL<sup>-1</sup> assegurada pelo fabricante, bem como a possível presença de microrganismos contaminantes de acordo com a Portaria SNDA nº31 de 08 de junho de 1982.

#### 4.1 Aumento da sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em soja por aditivo celular

Para essa etapa, foram testados o aditivo celular “Pro-Longer Seeder”, calda de sacarose, calda de trealose e inoculante “Cropbio Soja”, com garantia de  $5 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, conforme tabela 2, nas concentrações indicadas acima (Tabela 1). A metodologia da aplicação dos tratamentos se encontra descrita no item 4.3.

**Tabela 2 - Tratamentos realizados para aumentar o tempo de sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja**

Tratamento	
1	Cropbio Soja
2	Cropbio Soja + Pro-Longer
3	Cropbio Soja + Calda de Sacarose
4	Cropbio Soja + Calda de Trealose

**Fonte: Autoria própria (2021)**

Também foi testada a concentração de 4 mL.kg semente<sup>-1</sup> de inoculante para avaliar o desempenho de uma maior concentração na pré-inoculação.

A calda de sacarose foi preparada na concentração indicada acima e autoclavada durante 15 minutos a 121°C. Já a calda de trealose não foi autoclavada, apenas filtrada antes de ser utilizada.

#### 4.2 Método de tratamento de sementes de soja com fungicida e inoculante

Já para determinar a eficácia do tipo de tratamento utilizando fungicida, as sementes foram tratadas com fungicida “Maxim XL” de duas formas distintas, seguindo as concentrações descritas na Tabela 1. No tratamento 1, as sementes foram tratadas com fungicida, conforme item 4.3, e após duas horas foi realizada a inoculação com “Cropbio Soja”. Já o tratamento 2 foi feito com a aplicação da calda preparada com inoculante e fungicida, nas concentrações indicadas.

### 4.3 Aplicação nas sementes

Primeiramente, foi feita a assepsia das sementes de acordo com a metodologia do MAPA: mergulhadas em álcool 95% durante 30 a 60 segundos, logo após permaneceram durante 4 a 5 minutos no hipoclorito de sódio 5%, e em seguida enxaguadas com água esterilizada. As sementes foram deixadas em bandejas no fluxo laminar com luz UV por aproximadamente 12 horas.

Decorrido esse tempo, as sementes receberam os tratamentos acima indicados, no item 4.1 e 4.2. Para cada um, seguiu-se a recomendação do fabricante (Tabela 1) e completou-se com água o volume para a concentração de 6 mL.kg sem.-1, que é indicado como volume máximo tolerado de solução aquosa, para que não ocorram danos à semente, podendo afetar sua qualidade física e fisiológica (EMBRAPA SOJA, 2005).

As sementes foram transferidas da forma para bags plásticos para receber o tratamento. Após completa homogeneização, as mesmas eram deixadas na bandeja durante 2h, conforme figura 1, e decorrido esse tempo eram armazenadas nos bags plásticos novamente até o tempo para cada análise (Figura 2).

**Figura 1 - Sementes de soja após tratamento com “Cropbio Soja” e “Maxim XL” em bandeja no fluxo laminar**



Fonte: Aatoria própria (2021)

**Figura 2 - Bag plástico contendo as sementes de soja tratadas com “Cropbio Soja”**



**Fonte: Autoria própria (2021)**

#### **4.4 Análise do ensaio**

A sobrevivência do microrganismo nas sementes foi avaliada de acordo com a metodologia de diluição seriada do MAPA, de acordo com as metodologias e especificações que constam das Instruções Normativas no. 30 de 12 de dezembro de 2010 e no. 13, de 24 de março de 2011 (MAPA, 2010, 2011a,b). Foram tomadas amostras em três períodos de tempo após a aplicação dos produtos nas sementes: 2, 24, 48 horas e para cada um dos tratamentos foram realizadas quatro análises da sobrevivência da bactéria (A, B, C e D).

Para cada análise, 100 sementes de soja tratadas foram colocadas em Erlenmeyer, com 100 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%), adicionado de 1% de Tween 80. A mistura ficou em agitação em *shaker* a 110 RPM por 20 minutos (Figura 3), sendo considerada então, a diluição 100. Foi realizada a diluição seriada até 10<sup>-4</sup>. Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> e 10<sup>-4</sup> foram inoculadas em placas de Petri, em três repetições. A solução foi espalhada utilizando alça de Drigalski em meio YMA Fertibio® (Yeast Mannitol Agar). Após o período de absorção das alíquotas

inoculadas as placas foram encaminhadas para uma estufa bacteriológica para incubação a 30°C, por um período de 7 a 10 dias.

A avaliação do crescimento está apresentada em Unidades Formadoras de Colônias por semente (UFC.sem.<sup>-1</sup>), considerando a contagem das placas que continham entre 10 e 300 UFC, dado pela seguinte equação:

$$\text{UFC.sem.}^{-1} = \text{n}^{\circ} \text{ de UFC contadas na placa} \times \text{diluição na qual foi feita a contagem} \times 10 \text{ (fator de correção)}$$

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do Teste de Tukey para os aditivos celulares e Teste t de Student para os tratamentos com fungicida, no programa R 4.1.1 (R Core Team, 2021).

**Figura 3 - Processo de lavagem das sementes de soja**



Fonte: Autoria própria (2021)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O inoculante “Cropbio Soja” utilizado no ensaio apresentou a concentração de  $2,38 \times 10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, ausência de microrganismos contaminantes na diluição  $10^{-5}$  e presença das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080, atendendo às garantias declaradas.

A recuperação de *Bradyrhizobium japonicum* nas sementes de soja sem tratamento foi de  $2,70 \times 10^5$  UFC.sem<sup>-1</sup> decorridas 2 horas da inoculação, com a dose indicada pelo fabricante (2 mL.Kg<sup>-1</sup>). Para a inoculação com o dobro de volume (4 mL.Kg<sup>-1</sup>), o número de células foi de  $4,0 \times 10^6$  UFC.sem<sup>-1</sup>, no mesmo período de tempo. De acordo com Hungria *et al.* (2017), devem ser recuperadas de 80-100 mil células no momento da semeadura para que ocorra uma boa nodulação na soja, assim, esses tratamentos estiveram acima do limite. Nas análises com 24 e 48 horas após a inoculação, não houve contagem de células viáveis.

### 5.1 Aumento da sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em soja por aditivo celular

A Tabela 3 apresenta a contagem do número de UFC de *Bradyrhizobium japonicum* nas placas da diluição  $10^{-3}$  com diferentes tratamentos utilizando aditivos celulares, de todas as repetições. O tratamento com calda de trealose foi superior aos demais tratamentos na recuperação de células após 2 horas da inoculação, obtendo um valor 2,4 vezes maior que a aplicação do inoculante puro. No que se segue, o adjuvante celular “Pro-Longer Seeder” obteve um valor 2,3 vezes maior. De acordo com a Tabela 4, é possível observar que os tratamentos com calda de trealose e adjuvante celular tiveram semelhança estatística entre si, num nível de confiança de 5%, enquanto o tratamento com calda de sacarose e inoculante puro se assemelham estatisticamente.

**Tabela 3 - Número de UFC nas placas de diluição  $10^{-3}$  no período de 2 horas após a inoculação com os tratamentos com aditivos celulares**

2 horas			
Tratamento	REP	UFC	UFC.mL <sup>-1</sup>
Inoculante	A	28	$2,70 \times 10^5$
	B	23	
	C	30	
	D	27	
Inoculante + Pro-Longer	A	71	$6,20 \times 10^5$
	B	64	
	C	50	
	D	62	
Inoculante + Calda de Sacarose	A	15	$2,80 \times 10^5$
	B	38	
	C	31	
	D	28	
Inoculante + Calda de Trealose	A	66	$6,60 \times 10^5$
	B	68	
	C	74	
	D	57	

**Fonte: Autoria própria (2021)**

**Tabela 4 - Análise estatística entre os tratamentos com aditivo celular (Programa R)**

Tratamento	UFC.sem <sup>-1</sup>
Inoculante + Calda de Trealose	6,60E+05 a
Inoculante + Pro-Longer	6,20E+05 a
Inoculante + Calda de Sacarose	2,80E+05 b
Inoculante	2,70E+05 b

(1) Dados seguidos da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

**Fonte: Autoria própria (2021)**



O tratamento com calda de sacarose apresentou recuperação de células viáveis após 24 horas da inoculação, com  $4,9 \times 10^5$  UFC.sem<sup>-1</sup>. No momento da recuperação com 2 horas, esse tratamento não diferiu estatisticamente do inoculante puro, obtendo o valor de recuperação muito semelhante. Contudo, dentre todos os tratamentos, foi o único em que houve recuperação após decorrido um dia da inoculação. Bueno e colaboradores (2003) ao testarem o efeito de fungicidas sobre a ação de inoculantes, relataram a recuperação da testemunha (inoculante puro turfoso) até 96 horas de após tratamento, com o uso de solução açucarada (sacarose) a 10% como adesivo.

O melhor desempenho da sacarose pode ser explicado pela sua constituição. A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, enquanto a trealose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose. No momento da inoculação até as 2 horas da primeira análise, a bactéria consome mais facilmente o açúcar disponível pela trealose, por ser formado por duas moléculas de glicose, findando rapidamente com essa fonte de carbono. Já a sacarose, por apresentar a molécula de frutose que pode ser mais dificilmente degradada por *Bradyrhizobium japonicum*, faz uma degradação mais lenta da molécula e conseqüentemente, esse consumo desacelerado mantém o metabolismo celular por mais tempo, haja vista a recuperação da bactéria após 24 horas.

Isso acontece devido à ausência do transportador ABC da frutose nas estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Os transportadores ABC são responsáveis pela translocação de diversas variedades de substratos pela membrana, variando de íons a macromoléculas, através do ligamento e hidrólise do ATP. Contudo, há no genoma proteínas que realizam funções similares, podendo realizar de forma menos eficiente o consumo da molécula (SIQUEIRA, 2013).

Já o adjuvante celular “Pro-Longer Seeder” é formado por carboidratos e umectantes. O adjuvante é definido um como produto utilizado em mistura com produtos formulados para melhorar a sua aplicação (BRASIL, 2002). As principais vantagens do uso dos adjuvantes estão relacionadas à alteração das propriedades da solução, aumento de eficácia biológica, exercendo também ganhos no desempenho da operação (CUNHA et al., 2010). De acordo com o presente trabalho, pode-se destacar sua efetividade para o aumento do número de células viáveis no processo de inoculação, decorridas 2 horas do procedimento, devido aos açúcares presentes na composição.

Uma forma de otimizar a pré-inoculação das sementes de soja, é a utilização da SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*), na composição do inoculante. Marks *et al.* (2008) ao testar a ação de fungicidas sobre *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 5019 e SEMIA 5079) obteve valores *in vitro* para recuperação dos rizóbios de  $3,12 \times 10^5$  UFC.sem<sup>-1</sup> após 4 horas de inoculação. Além disso, obteve  $1,87 \times 10^5$  UFC.sem<sup>-1</sup> com 24 horas e  $4,61 \times 10^4$  UFC.sem<sup>-1</sup> após 48 horas de inoculação. Em ambos os trabalhos mencionados, as estirpes testadas foram SEMIA 5019 (*Bradyrhizobium elkanii*) e SEMIA 5079 (*Bradyrhizobium japonicum*).

## 5.2 Método de tratamento de sementes de soja com fungicida e inoculante

Os resultados das contagens em placas em cada repetição no período de 2h após a inoculação estão apresentados na Tabela 5. O tratamento 1 apresentou valores mais elevados de UFC.sem<sup>-1</sup> do que o tratamento 2. Os tratamentos diferem entre si com um nível de significância de 5% de acordo com o teste t de student, apresentando um P-valor de 0,001.

**Tabela 5 - Número de UFC nas placas de diluição  $10^{-3}$  no período de 2 horas após a inoculação com fungicida “Maxim XL”**

Tratamento	2 horas		
	REP	UFC	UFC.mL <sup>-1</sup>
Inoculação após 2 horas da aplicação do fungicida	A	44	$4,60 \times 10^5$
	B	47	
	C	46	
	D	46	
Inoculação da calda de fungicida + inoculante	A	38	$3,70 \times 10^5$
	B	34	
	C	39	
	D	37	

Fonte: Aatoria própria (2021)

A recomendação é para que a inoculação aconteça após a aplicação do fungicida e micronutrientes que serão utilizados nas sementes, com o objetivo de

garantir boas cobertura e aderência dos fungicidas e dos micronutrientes às sementes, diminuindo, assim, efeitos tóxicos sobre as células do bradirrizóbio (GOULART, 1998). Isso pode ser confirmado com os resultados acima descritos, quando ocorre a aplicação direta do inoculante juntamente com o fungicida, o número de células viáveis diminui quando comparado com inoculação após o tratamento com o fungicida.

No tratamento *on farm*, a calda contendo fungicidas e demais tratamento se encontra em um repositório e o inoculante se encontra separadamente. Durante o processo de tratamento dessas sementes, os químicos são aplicados primeiramente, contudo, logo em seguida a inoculação é feita. Marks *et al.* (2008) ao comparar tratamentos com fungicidas, protetor celular e inoculante observou que o fungicida “Maxim XL” foi o que apresentou maior compatibilidade para recuperação de bactérias em sementes dentre os fungicidas testados. No presente trabalho, constatou-se que a aplicação em conjunto do fungicida “Maxim XL” com inoculante causa um efeito deletério na bactéria se comparado com a inoculação após 2 horas, cabendo identificar essa janela de aplicação para encontrar o tempo exato quando a interação fungicida-inoculante não se torna tóxica à bactéria.

## 6 CONCLUSÃO

As vantagens e benefícios dos inoculantes já são conhecidos há muito tempo, principalmente a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* para produção de soja. Contudo, cabe ressaltar a importância de se praticar o manejo adequado do tratamento das sementes, para que não ocorra a perda de eficiência do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio pelos rizóbios.

A metodologia de recuperação de rizóbios em sementes de soja do MAPA é uma maneira eficiente de contabilizar o número de células viáveis que irão estar disponíveis para realizar suas funções na planta, auxiliando a entender a ação de outros produtos utilizados na semeadura. A aplicação de aditivos celulares é benéfica para a recuperação de bactérias de sementes de soja, devendo atender as fontes de carbono utilizadas e o consumo dessas pelos microrganismos para promover um maior tempo de pré-inoculação. A calda de trealose obteve melhor resultado dentre os estudados para a recuperação em 2 horas após a inoculação, obtendo valores 2,4 vezes maiores que o inoculante puro. Já a calda de sacarose foi superior aos demais para a recuperação após 24 horas de inoculação. Quanto ao método de aplicação do fungicida, corroborando com a literatura, a aplicação dos agentes químicos deve acontecer antes da inoculação, cabendo a testes posteriores investigar a janela de aplicação do inoculante, bem como aumentar a gama de fungicidas testados.

Os resultados aqui descritos são testes preliminares em escala laboratorial, mas que ajudam a compreender resultados observados em campo.

## REFERÊNCIAS

- ARAUJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p.456-462, 2008.
- BARROS-CARVALHO, G. *et al.* Brazilian-adapted soybean Bradyrhizobium strains uncover IS elements with potential impact on biological nitrogen fixation. **FEMS microbiology letters**, 2019.
- BIZARRO, M. J. **Simbiose e variabilidade de estirpes de Bradyrhizobium associadas à cultura da soja em diferentes manejos do solo**. 2008.
- BRASIL. **Instrução Normativa SDA nº13 de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União, 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>>. Acesso em: 03 ago. 2021.
- BRASIL. **Decreto n. 4.074**, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao/arquivos-de-legislacao/decreto-4074-2002-decreto-dos-agrotoxicos/view>. Acesso em: 04 dez. 2021.
- BUENO, C. J.; MEYER, M. C.; DE SOUZA, N. L. Efeito de fungicidas na sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* (Semia 5019 e Semia 5079) e na nodulação da soja. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 231-235, 2003.
- CAMPEÃO, P. *et al.* Mercado Internacional de Commodities: uma análise da participação do Brasil no mercado mundial de soja entre 2008 e 2019. **Desenvolvimento em Questão**, v. 18, n. 51, p.76-92, 2020.
- CAMPO, J. R.; HUNGRIA, M. Compatibilidade de uso de inoculantes e fungicidas no tratamento de sementes de soja. Londrina: **Embrapa Soja**, 2000. 32p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 26).
- CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. Acomp. safra bras. grãos, v. 7 - Safra 2019/20 - **Décimo segundo levantamento**, Brasília, p. 1-33, setembro 2020.
- COSTA, M. R. *et al.* Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**. 2013, v. 39, n. 3, pp. 186-192. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-54052013000300007>>. Acesso em: 28 de jul 2021.

CUNHA, J.P.A.R.; PERES, T.C.M. Influência de pontas de pulverização e adjuvante no controle químico da ferrugem asiática da soja. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 32, n. 4, p.597-602, 2010.

DA SILVA, A. F. et al. Doses de inoculante e nitrogênio na semeadura da soja em área de primeiro cultivo. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 3, 2011.

DA SILVA, M. F. **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura de cana-de-açúcar**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

EMBRAPA SOJA. Tecnologias de produção de soja - Paraná, 2006. Londrina: **Embrapa Soja**, 2005. 208 p.

EMBRAPA - Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2011. - Londrina: **Embrapa Soja: Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste**, 2010. 255p.

FERREIRA, J.S. *et al.* Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. *Agronomia*, **Seropédica**, v.37, n.2, p.6-12, 2003.

FILHO, J. M.; SILVA, C. H. S.; DE SOUZA, J. E. B. Desempenho agrônomico e produtividade da cultura de soja com a co-inoculação de *Bradyrhizobium* E *Azospirillum brasilense*. **Ipê Agronomic Journal**, v. 2, n. 2, p. 46-57, 2018.

FIPKE, G. M. *et al.* **Co-inoculação e pré-inoculação de sementes em soja**. 2015. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5150>> Acesso em: 03 dez. 2021.

FRIZZO, B. **Nodulação da soja sob diferentes tratamentos químicos de sementes**. 2018. Disponível em: <<https://rd.uffs.edu.br/handle/prefix/4491>> Acesso em: 03 dez. 2021.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de soja com fungicidas: recomendações técnicas. **Embrapa Agropecuária Oeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1998.

HENNING, F. A. ET AL. CHEMICAL COMPOSITION AND RESERVE MOBILIZATION IN SOYBEAN SEEDS WITH HIGH AND LOW VIGOR. *BRAGANTIA*, V. 69, N. 3, P. 727-734, 2010.

HUNGRIA, M. *et al.* Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions. **Agronomy Journal**, v.109, n. 3, p. 1-7, 2017.

HUNGRIA, M. *et al.* Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2020.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a

competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2007.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: BRUIJN, F. (ed.). *Biological Nitrogen Fixation*. **John Wiley & Sons**, New Jersey, 2015. p. 1005-1019.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Estágio da aplicação de inoculantes no país: do tratamento industrial de sementes à aplicação foliar. In: **Embrapa Soja-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 16., LATINAMERICAN WORKSHOP OF PGPR, 4., RELARE, 19., 2018, Foz do Iguaçu. Anais. [Brasília, DF]: Embrapa, 2018. resumo., 2018.

IBGE. **Soja bate novo recorde de produção em 2006**. [S./], 19 jul. 2007. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/13329-asi-soja-bate-novo-recorde-de-producao-em-2006>. Acesso em: 18 ago. 2021.

JUNIOR, J. J. S. *et al.* Impacto Econômico dos Inoculantes na Soja: Uma Análise Insumo-Produto. **Revista de Estudos Sociais**, v. 21, n. 42, p. 99-121, 2019.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agrícola**, 54, 89-96. 1997.

LIMA, A. S. *et al.* Diversidade Fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p. 1095-1104, 2005.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 30**, de 12/11/2010

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa Nº 13**, de 24/03/20011

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. ANEXO à In SDA 13, de 25/03/2011b. **Protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionado ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/guia-de-servicos/arquivos/arquivos-bebidas-vinhos-e-derivados/protocolo-oficial-para-avaliacao-da-viabilidade-e-eficiencia-agronomica-de-cepas-inoculantes-e-tecnologias-relacionados-ao-processo-de-fixacao-biologica-do-nitrogenio-em-leguminosas.pdf/view>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MARKS, B.B. **Avaliação da Sobrevivência de bradirrizóbios em sementes de soja tratadas com fungicidas, protetor celular “Power” e o inoculante “nitragin optimize”**. UFRGS. Porto Alegre. Monografia de Graduação em Ciências Biológicas. 36f. 2008.

MELO, B. G. M. **Estudo sobre o uso de inoculante no cultivo de feijão em Curitibaanos**. 2013.

OLIVEIRA, Z. M. **Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de cana-de-açúcar sob fertilização orgânica e/ou convencional**. 2009. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and soil**, v. 141, n. 1, p. 13-39, 1992.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2021.

RIBEIRO, L. A. E. *et al.* Viabilidade Econômica Do Uso De Fungicidas No Controle Da Ferrugem Asiática Da Soja. **Ipê Agronomic Journal**, v. 3, n. 2, p. 35-43, 2019.

SANTOS, M.S. *et al.* The Challenge of Combining High Yields with Environmentally Friendly Bioproducts: A Review on the Compatibility of Pesticides with Microbial Inoculants. **Agronomy** **2021**, 11, 870. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050870>

SEDIYAMA, C. A. Z. **Tratamento antecipado de sementes de soja com fungicida, protetor celular e inoculante**. 2012.

SILVA, M. F. *et al.* **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura de cana-de-açúcar**. 2009.

SIQUEIRA, A. F. Genômica estrutural e papel dos transportadores ABC em *Bradyrhizobium japonicum* Estirpes CPAC 15 e CPAC 7. **Embrapa Soja-Tese/dissertação (ALICE)**, 2013.

SHULER, M. I.; KARGI, F. Bioprocess engineering: Basic concepts. 2 ed. Upper Saddle River: **Prentice Hall PTR**, 2001.

SURESHBABU, K. *et al.* Amazing multiple function properties of plant growth promoting rhizobacteria in rhizosphere soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 661-683, 2016.