



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



CAIO NASCIMENTO FERNANDES

**SOBREVIVENCIA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* e
Azospirillum brasilense APLICADAS VIA IRRIGAÇÃO (IRRINOCULAÇÃO)
NA CULTURA DA SOJA**

Botucatu

2025

CAIO NASCIMENTO FERNANDES

**SOBREVIVENCIA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* e
Azospirillum brasilense APLICADAS VIA IRRIGAÇÃO (IRRINOCULAÇÃO)
NA CULTURA DA SOJA**

Tese apresentada à Faculdade
de Ciências Agronômicas da
Unesp Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de
Doutor em Engenharia Agrícola.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos
Cury Saad

Coorientadora: Profa. Vera Lúcia
Mores Rall

Botucatu

2025

N244s Nascimento Fernandes, Caio
Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e
Azospirillum brasilense aplicadas via irrigação (irrinoculação) na
cultura da soja / Caio Nascimento Fernandes. -- Botucatu, 2025
132 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu
Orientador: João Carlos Cury Saad
Coorientadora: Vera Lúcia Mores Rall

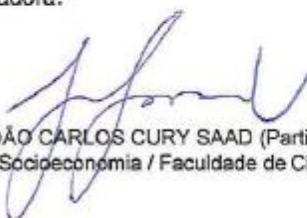
1. inoculação. 2. *Bradyrhizobium japonicum*. 3. fertirrigação. 4.
Azospirillum brasilense. 5. soja. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: SOBREVIVENCIA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* APLICADAS VIA IRRIGAÇÃO (IRRINOCULAÇÃO) NA CULTURA DA SOJA

AUTOR: CAIO NASCIMENTO FERNANDES
ORIENTADOR: JOÃO CARLOS CURY SAAD
COORIENTADORA: VERA LUCIA MORES RALL

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Agrícola, pela Comissão Examinadora:



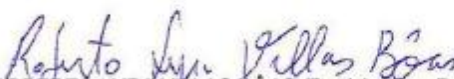
Professor Doutor JOÃO CARLOS CURY SAAD (Participação Presencial)
Engenharia Rural e Socioeconomia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu Unesp



Pós-Doutoranda ÉRIKA CAROLINA ROMÃO BONSAGLIA (Participação Presencial)
Nutrição e Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP Pirassununga



Pesquisadora Dra. CAMILA PAULA ROSSETTO PESCATORI JACON (Participação Presencial)



Prof. Titular ROBERTO LYRA VILLAS BOAS (Participação Presencial)
Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - Unesp



Professor Doutor RODRIGO MAXIMO SANCHEZ ROMAN (Participação Presencial)
Engenharia Rural e Socioeconomia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu Unesp

Botucatu, 22 de outubro de 2025.

Aos meus amados pais,
Carlos (in memoriam) e Cláudia,
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por meus pais e por guiar todas minhas decisões.

Aos meus pais, Cláudia e Carlos (in memoriam), pelo carinho, motivação e ensinamentos, fundamentais para me tornar a pessoa e profissional que sou hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Cury Saad, por toda paciência, incentivo, confiança, pelo exemplo de professor e principalmente sua amizade.

A Prof. Dr. Vera Lucia Mores Rall, pela coorientação e total suporte nas análises microbiológicas.

A Ivana Giovannetti Castilho pelo apoio fundamental nos ensaios de microbiologia, que foi essencial para parte deste trabalho e pela sua amizade.

Ao engenheiro Ricardo Rabelo, meu braço direito nesta pesquisa, por todo seu suporte e amizade fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Rodrigo Máximo Sánchez Román, coordenador do programa de pós-graduação em engenharia agrícola, por todo apoio.

Ao William Bailo, pela ajuda e amizade que será levada à muitos anos.

A Tatiane, João e Mara pela grande amizade e ajuda nas análises de campo.

A estagiária Laura por toda ajuda nesta pesquisa.

Ao Valdemiro Pitoro pela amizade e contribuição.

Ao Prof. Dr. Roberto Lyra e Camila Pescatori Jacon pela amizade e conselhos essenciais nesta jornada.

Aos funcionários das FEPE, pelo auxílio ao longo deste doutorado.

A seção técnica de pós-graduação pelo suporte.

À Ana Paula e Lucas Jónatan, pela colaboração na análise estatística.

À Faculdade de Ciências Agronômicas e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia agrícola, pela oportunidade de realização do doutorado e pela infraestrutura disponibilizada.

A todos do departamento de engenharia rural, minha segunda casa e do programa de pós-graduação em Engenharia Agrícola.

A todos do departamento de solos, minha terceira casa.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.A

Embrapa soja e a Dra. Mariangela Hungria pelas análises de contagem de rizóbios.

E a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desta pesquisa.

RESUMO

O Brasil é um dos maiores países produtores de soja (*Glycine max* (L) Merrill), suprimindo grande parte da crescente demanda global, uma vez que este grão é a base de inúmeros produtos da alimentação animal e humana. No entanto, somente o avanço no melhoramento genético das cultivares não é suficiente garantir o incremento requerido de produtividade, pois é necessário elevar a eficiência dos ambientes de produção, principalmente em relação à nutrição da cultura e em específico ao nitrogênio, exigido em grandes quantidades pela cultura e fator que pode ser severamente limitante. O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio nessa cultura é fundamental para viabilizar a produção, já que grande parte do nitrogênio demandado é fornecido pela simbiose entre a planta e a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (BJ), não requerendo nenhum gasto com fertilizantes nitrogenados. Além dessa bactéria é altamente recomendado a adição de *Azospirillum brasilense*, pois proporciona produção de fitohormônios estimulando o crescimento radicular e da parte aérea. Essas duas bactérias exigem condições mínimas para sobrevivência, que muitas vezes podem não ser atendidas pela forma de aplicação e pelas condições ambientais. Atualmente a aplicação delas é realizada via tratamento de sementes, via sulco ou via pulverização como uma alternativa, caso as duas anteriores não sejam efetivas. Essas três formas de aplicação apresentam algumas limitações, como por exemplo, incompatibilidade com produtos químicos, mistura incorreta, altas temperaturas e baixa umidade do solo no momento da aplicação, ocasionando grande mortalidade das bactérias, prejudicando o desenvolvimento e produtividade da cultura. Neste sentido, a aplicação dessas bactérias via sistema de irrigação pode ser uma alternativa, pois serão aplicadas com grande volume de água, logo o solo terá umidade adequada e sua temperatura será reduzida, proporcionando um ambiente favorável para o crescimento bacteriano. Partindo desse pressuposto, a presente pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar se a aplicação dessas bactérias via sistema de irrigação por aspersão garante maior sobrevivência e com isso proporciona efeitos positivos no desenvolvimento e produtividade da soja. A pesquisa foi conduzida em três etapas: uma em laboratório, para análise do comportamento das bactérias frente as condições ambientais encontradas em campo; em ambiente protegido e em campo. O capítulo 1 traz os ensaios em laboratório simulando as mais diversas condições

de campo que as bactérias serão submetidas. As bactérias foram submetidas a testes de pressão, passagem por bomba hidráulica, variações de pH, condições de temperatura da calda e do solo e níveis de umidade do solo. O capítulo 2 apresenta o estudo prático em ambiente protegido. Nesse estudo utilizou-se o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial $5 \times 3 + 3$, com quatro repetições, sendo o primeiro fator aplicação via irrigação de diferentes doses de BJ (0, 300, 600, 900, 1500 mL ha⁻¹), o segundo épocas de aplicação (plantio, VE e VC) e três tratamentos adicionais (N mineral, inoculação via semente e inoculação via sulco). Foram avaliados componentes biométricos, bioquímicos e nutricionais. Já no capítulo 3, é apresentado o estudo em campo. Nessa terceira fase utilizou-se delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial $4 \times 2 + 2$, com quatro repetições, sendo o primeiro fator aplicação via irrigação por aspersão de diferentes doses de BJ (0, 300, 600, 900 mL ha⁻¹), o segundo épocas de aplicação (plantio e VC) e dois tratamentos adicionais (N mineral, e inoculação via sulco). Foram avaliados componentes biométricos, bioquímicos e nutricionais. As pressões de 40, 60 e 80m.c.a, a passagem pelo rotor da bomba hidráulica, a temperatura de 35°C por 210 minutos e as variações de pH aqui testadas não causaram mortalidade das bactérias BJ. A exposição dessas bactérias em temperaturas acima de 40°C por 50 minutos causou sua mortalidade. O fator principal que interferiu diretamente na sobrevivência e multiplicação dessa bactéria foi a umidade do solo, sendo que a manutenção de níveis mais elevados é fundamental para seu estabelecimento. A aplicação da bactéria BJ via sistema de irrigação se mostrou-se viável e mais eficiente que os métodos atuais, sendo 300 mL ha⁻¹ a melhor dose, quando aplicada junto com a irrigação de germinação, porém quando aplicada posteriormente, como no estágio fenológico VC testado, recomenda-se a dose de 600 mL ha⁻¹. O método de aplicação via irrigação foi o diferencial para o aumento de produtividade da soja e aumento de eficiência das bactérias BJ, sendo que não é necessário o aumento de dose em campo, já que a mesma dose utilizada no método via sulco foi suficiente e superior a esse método quando aplicada via irrigação devido as condições favoráveis de aplicação. Este estudo é pioneiro se tratando da aplicação de BJ via irrigação por aspersão, trazendo benefícios para a agricultura brasileira proporcionando maior produtividade a partir da maior eficiência do uso dos microrganismos.

Palavras-Chave: soja; inoculação; *Bradyrhizobium japonicum*; fertirrigação; *Azospirillum brasilense*.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest soybean (*Glycine max* (L) Merrill) producing countries, meeting a large portion of the growing global demand, as this grain is the basis for numerous animal and human food products. However, advances in the genetic improvement of cultivars alone are not enough to guarantee the required increase in productivity. It is also necessary to increase the efficiency of production environments, particularly in relation to crop nutrition and specifically nitrogen, which the crop requires in large quantities and can be severely limiting. The use of nitrogen-fixing bacteria in this crop is essential to ensure production viability, as much of the nitrogen demanded is provided by the symbiosis between the plant and the bacterium *Bradyrhizobium japonicum* (BJ), eliminating the need for nitrogen fertilizers. In addition to this bacterium, the addition of *Azospirillum brasilense* is highly recommended, as it promotes the production of phytohormones, stimulating root and shoot growth. These two bacteria require minimum conditions for survival, which are often not met by the application method and environmental conditions. Currently, they are applied via seed treatment, in-furrow application, or spraying as an alternative if the previous two methods are ineffective. These three application methods have some limitations, such as incompatibility with chemicals, incorrect mixing, high temperatures, and low soil moisture at the time of application, resulting in high bacterial mortality and hampering crop development and productivity. Therefore, applying these bacteria via irrigation systems can be an alternative, as they are applied with a large volume of water, resulting in adequate soil moisture and a lower soil temperature, providing a favorable environment for bacterial growth. Based on this premise, this research aimed to evaluate whether the application of these bacteria via sprinkler irrigation systems guarantees greater survival and thus provides positive effects on soybean development and productivity. The research was conducted in three stages: one in the laboratory, to analyze the bacteria's behavior under field environmental conditions; the other in a protected environment; and the other in the field. Chapter 1 presents laboratory tests simulating the various field conditions to which the bacteria will be subjected. The bacteria were subjected to pressure tests, hydraulic pumping, pH variations, spray and soil temperature conditions, and soil moisture levels. Chapter 2 presents the practical study in a protected environment. This

study used a randomized block design in a 5 x 3 + 3 factorial arrangement, with four replicates. The first factor was irrigation application of different BJ doses (0, 300, 600, 900, and 1500 mL ha⁻¹), the second application timing (planting, VE, and VC), and three additional treatments (Nmineral, seed inoculation, and furrow inoculation). Biometric, biochemical, and nutritional components were evaluated. Chapter 3 presents the field study. In this third phase, a randomized block design was used in a 4 x 2 + 2 factorial scheme, with four replications, the first factor being application via sprinkler irrigation of different doses of BJ (0, 300, 600, 900 mL ha⁻¹), the second application times (planting and VC) and two additional treatments (mineral N, and inoculation via furrow). Biometric, biochemical, and nutritional components were evaluated. Pressures of 40, 60, and 80 m.c.a., passage through the hydraulic pump rotor, a temperature of 35°C for 210 minutes, and the pH variations tested here did not cause mortality of the BJ bacteria. Exposure of these bacteria to temperatures above 40°C for 50 minutes caused their mortality. The main factor that directly interfered with the survival and multiplication of this bacterium was soil moisture, with maintaining higher levels being essential for its establishment. Application of the BJ bacterium via irrigation systems proved viable and more efficient than current methods. The best dose was 300 mL ha⁻¹ when applied together with germination irrigation. However, when applied later, as in the VC phenological stage tested, a dose of 600 mL ha⁻¹ is recommended. The irrigation application method was the key to increased soybean yield and BJ bacteria efficiency. It did not require increasing the field dose, as the same dose used in the furrow method was sufficient and superior to this method when applied via irrigation due to favorable application conditions. This study is a pioneer in the application of BJ via sprinkler irrigation, benefiting Brazilian agriculture by increasing productivity through the greater efficiency of the microorganisms.

Keywords: soybean; inoculation; *Bradyrhizobium japonicum*; fertigation; *Azospirillum brasilense*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 - SOBREVIVÊNCIA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasiliense* EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO

- Figura 1 – Extrator (câmara) de Richards para ensaio de resistência dos microrganismos à pressão 34
- Figura 2 - Amostras em agitador orbital para ensaio de resistência a diferentes valores de pH..... 36
- Figura 3 - Semeadora para plantio de soja, com tanque de injeção de inoculante (em branco) e sensores de temperatura do ar e da calda para monitoramento 38
- Figura 4 - Vista do tanque de injeção de inoculantes da semeadora com sensor de temperatura (cabo branco) instalado em seu interior para monitoramento da temperatura da calda 39
- Figura 5- Temperatura interna da calda do tanque de injeção de inoculantes da semeadora, durante três dias de plantio (as setas indicam os momentos de reabastecimento). 40
- Figura 6- Temperatura interna da calda do tanque de injeção de inoculantes, da semeadora, em três dias de plantio e temperatura e umidade do ar sobre a semeadora durante o plantio 41
- Figura 7- Instalação dos sensores de temperatura, junto a semente e ao inoculante aplicado, imediatamente após o plantio para acompanhamento da temperatura do solo 43
- Figura 8 - Instalação dos sensores de temperatura do solo, do ar e da umidade relativa, imediatamente após o plantio para monitoramento contínuo..... 44
- Figura 9 - Temperatura do solo na profundidade de deposição das sementes e aplicação do inoculante, durante 72 horas, de forma contínua..... 45
- Figura 10 - Temperatura do solo na profundidade de deposição das sementes e aplicação do inoculante, temperatura e umidade do ar, durante 72 horas, de forma contínua 46
- Figura 11- Temperatura do solo medida em campo e a temperatura do solo simulada em estufa para avaliação de seu efeito nos microrganismos, durante 72 horas..... 47
- Figura 12- Vista da cuba de vidro com solo e do sensor de temperatura para simulação, em estufa, da oscilação térmica que ocorre em condições de campo, visando avaliar o comportamento dos microrganismos.... 48
- Figura 13 - Cubo de vidro com solo para simulação de um sulco de plantio para condução dos testes com os inoculantes simulando sua aplicação direta no solo 49

Figura 14 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida a simulação da oscilação térmica que ocorre no solo, em quatro momentos distintos	59
Figura 15 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida a diferentes umidades do solo em três momentos distintos.....	62

Capítulo 2 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO SIMULADA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA, VIA IRRIGAÇÃO

Figura 1 - Sulco de semeadura para aplicação dos inoculantes	79
Figura 2- Massa de grãos por planta (g planta^{-1}), em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	85
Figura 3- Índice SPAD em função do estágio fenológico e das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	88
Figura 4- Índice SPAD em função do estágio fenológico das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	89
Figura 5- Curva de absorção de nitrogênio para as cultivares BRS 184, SYN 1059 e DM 6563 – Intacta RR2 PRO de soja (OLIVEIRA JUNIOR, et al., 2016)	90

Capítulo 3 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA, VIA SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR ASPERSÃO

Figura 1 - Vista dos tensiômetros automáticos, em três profundidades, para manejo da irrigação	104
Figura 2 - Estrutura para aplicação dos tratamentos via irrigação por aspersão e ensaio de uniformidade do sistema	107
Figura 3 - Estrutura para aplicação dos tratamentos via irrigação por aspersão e sistema móvel para injeção da calda, composto por uma bomba d'água, gerador e caixa d'água	108
Figura 4 - Aplicação dos tratamentos no estágio fenológico VC	109
Figura 5 - Retirada das raízes e parte aérea com uma forma de aço para retirada do mesmo volume de todos os tratamentos.....	111

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - SOBREVIVÊNCIA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO

Tabela 1 - Quadro das misturas de produtos e microrganismos e sua dosagem	37
Tabela 2 - Combinações entre temperatura da calda e tempo de exposição do inoculante visando ensaio de sobrevivência	41
Tabela 3 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida à diferentes cargas de pressão durante 5 minutos de pressurização	51
Tabela 4 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Azospirillum brasilense</i> , submetido à diferentes pressões durante 5 minutos de pressurização.....	51
Tabela 5 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida à agitação pressurizada à 10m.c.a, em bomba hidráulica durante 3 horas.....	52
Tabela 6 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Azospirillum brasilense</i> , submetido à agitação pressurizada à 10m.c.a, em bomba hidráulica durante 3 horas.....	52
Tabela 7 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida à diferentes pH de calda durante 5 horas	53
Tabela 8 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Azospirillum brasilense</i> , submetido à diferentes pH de calda durante 5 horas	53
Tabela 9 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , em mistura com diferentes ingredientes ativos durante 5 horas e 30 minutos	54
Tabela 10 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida a temperatura de 35°C com diferentes tempos de exposição	56
Tabela 11 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida a temperatura de 40°C com diferentes tempos de exposição	56
Tabela 12 - Repetibilidade da contagem de UFC de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> no solo	57
Tabela 13 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida a simulação da oscilação térmica que ocorre no solo, em quatro momentos distintos.....	58
Tabela 14 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , submetida a diferentes umidades do solo, em três momentos distintos	61

Capítulo 2 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO SIMULADA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA, VIA IRRIGAÇÃO

Tabela 1 - Características químicas do solo corrigido antes da implantação do experimento analisado de 0 a 0,2 m de profundidade	74
Tabela 2 - Caracterização física do solo utilizado	75
Tabela 3 - Delineamento experimental.....	76
Tabela 4 - Descrição das combinações dos fatores do delineamento experimental	77
Tabela 5 - Comprimento das plantas de soja (cm), diâmetro de caule (mm), número de ramos, número de nós e número de vagens por planta aos 120 DAE, em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	83
Tabela 6 - Massa de grãos por planta (g) e produtividade (sacas/hectare) aos 120 DAE, em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	84
Tabela 7 - Massa seca da parte aérea (g/planta) e massa seca de raiz (g/planta) aos 120 DAE, em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	86
Tabela 8 - Índice SPAD nos estádios fenológicos V3, R2, R3 na parte inferior da planta, R3 na parte superior da planta, R5 na parte inferior da planta e R5 na parte superior da planta, em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria	87
Tabela 9 - Teor de nitrogênio na folha diagnose, em g/kg, no pleno florescimento, em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.....	90
Tabela 10 - Acúmulo de macro e micronutrientes na parte aérea, em g/planta, em função das doses de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> aplicada via superfície,	

simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.	91
---	----

Capítulo 3 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA, VIA SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR ASPERSÃO

Tabela 1 - Características químicas do solo corrigido antes da implantação do experimento analisado de 0 a 0,2 m de profundidade	103
Tabela 2 - Caracterização física do solo utilizado.....	103
Tabela 3 - Delineamento experimental	105
Tabela 4 - Descrição detalhada dos tratamentos.....	105
Tabela 5 - Desdobramento das interações entre doses e épocas de aplicação para o comprimento de plantas (cm), aos 125 DAE.....	113
Tabela 6 - Desdobramento das interações entre doses e épocas de aplicação para a massa de grãos por planta (g planta^{-1})	114
Tabela 7 - Desdobramento das interações entre doses e épocas de aplicação para o rendimento de grãos por planta (sacas ha^{-1})	115
Tabela 8 – Massa seca da parte aérea por planta (g planta^{-1}) em função dos tratamentos na fase de florescimento.....	120
Tabela 9 - Desdobramento das interações entre doses e épocas para o índice SPAD no estágio fenológico V4	121
Tabela 10 - Desdobramento das interações entre doses e épocas para o índice SPAD no estágio fenológico R2.....	122
Tabela 11 – Eficiência nodular (%) e acúmulo de nitrogênio (g/planta) em função dos tratamentos	122

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	23
CAPÍTULO 1 - SOBREVIVÊNCIA DAS BACTÉRIAS <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO	27
1.1 Introdução	27
1.2 Hipótese e Objetivos	29
1.3 Material e métodos	29
1.3.1. Localização e descrição, obtenção e procedência do produto.....	29
1.3.2 Análises microbiológicas	30
1.3.2.1 Meio de cultivo, técnica de semeadura e tempo de incubação	30
1.3.2.2 Preparo dos tubos de ensaio para as diluições decimais	31
1.3.2.3 Procedimento para análise microbiológica para o inoculante líquido....	31
1.3.2.4 Procedimento para análise microbiológica para os ensaios com aplicação no solo	32
1.3.3 Ensaaios	33
1.3.3.1 Sobrevivência das bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes níveis de pressão	33
1.3.3.2 Sobrevivência das bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> submetidas à agitação por bomba hidráulica .	34
1.3.3.3 Sobrevivência das bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes valores de pH de calda.....	35
1.3.3.4 Compatibilidade da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em mistura com diferentes produtos.....	36
1.3.3.5 Monitoramento da temperatura da calda do injetor de inoculante via sulco da semeadora e seu efeito na sobrevivência da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em função do tempo de exposição	38
1.3.3.6 Monitoramento da temperatura do solo após o plantio e o efeito da oscilação térmica do solo na sobrevivência da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	42
1.3.3.7 Efeito da umidade do solo na sobrevivência da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	49
1.4 Resultados e Discussão.....	50
1.4.1 Sobrevivência das bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes níveis de pressão	50
1.4.2 Sobrevivência das bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasilense</i> submetidos à agitação por bomba hidráulica .	52

1.4.3	Sobrevivência das bactérias <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Azospirillum brasiliense</i> em diferentes valores de pH de calda	53
1.4.4	Compatibilidade da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i> em mistura com diferentes produtos	54
1.4.5	Efeito da combinação temperatura e tempo na sobrevivência da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	55
1.4.6	Efeito da oscilação térmica do solo na sobrevivência da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	57
1.4.7	Efeito da umidade do solo na sobrevivência da bactéria <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	59
1.5	Considerações e recomendações gerais	62
1.6	Conclusões.....	64
	Referências	66
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO SIMULADA DAS BACTÉRIAS <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasiliense</i> NA CULTURA DA SOJA, VIA IRRIGAÇÃO.....		70
2.1	Introdução	70
2.2	Hipótese e objetivos	73
2.3	Material e Métodos.....	73
2.3.1	Localização da área de estudo.....	73
2.3.2	Descrição, obtenção e procedência dos inoculantes	74
2.3.3	Cultivar de soja, preparo do solo e condições de cultivo.....	74
2.3.4	Tratamentos e delineamento experimental	75
2.3.5	Semeadura e aplicação dos tratamentos	78
2.3.6	Tratos culturais	80
2.3.7	Avaliações morfológicas	80
2.3.7.1	Comprimento das plantas e diâmetro de caule	80
2.3.7.2	Número de ramos, número de nós e número de vagens	80
2.3.7.3	Massa de grãos por planta e produtividade	80
2.3.7.4	Massa seca de parte aérea e raiz	81
2.3.8	Avaliações bioquímicas	81
2.3.8.1	Índice SPAD	81
2.3.9	Análise química das plantas	81
2.3.9.1	Análise de nitrogênio na folha diagnose	81
2.3.9.2	Quantidade de macro e micronutrientes na parte aérea	81
2.3.10	Análise estatística.....	82
2.4	Resultados e Discussão	82

2.5 Conclusões	91
Referências.....	93
CAPÍTULO 3 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DAS BACTÉRIAS <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E <i>Azospirillum brasilense</i> NA CULTURA DA SOJA, VIA SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR ASPERSÃO	
3.1 Introdução	98
3.2 Hipótese e objetivos.....	101
3.3 Material e Métodos	101
3.3.1 Localização da área de estudo	101
3.3.2 Descrição, obtenção e procedência dos inoculantes	102
3.3.3 Cultivar de soja, preparo do solo e condições de cultivo	102
3.3.4 Tratamentos e delineamento experimental	104
3.3.5 Semeadura e aplicação dos tratamentos.....	106
3.3.6 Tratos culturais.....	109
3.3.7 Avaliações morfológicas.....	110
3.3.7.1 Comprimento das plantas	110
3.3.7.2 Massa de grãos por planta e rendimento de grãos.....	110
3.3.7.3 Massa seca de planta	110
3.3.8 Avaliações bioquímicas.....	111
3.3.8.1 Índice SPAD	111
3.3.9 Análise química das plantas.....	112
3.3.9.1 Quantidade de nitrogênio na parte aérea	112
3.3.9.2 Eficiência nodular.....	112
3.3.10 Análise estatística	112
3.4 Resultados e Discussão	113
3.5 Conclusões	123
Referências.....	124
REFERÊNCIAS	129

INTRODUÇÃO GERAL

A produção brasileira de soja (*Glycine max* (L) Merrill) é destaque global, sendo que em 2024 atingiu cerca de 147 milhões de toneladas de grãos, com perspectivas de expansão das exportações para a China, principal compradora. Com isso, é necessário ampliar a capacidade produtiva ou mesmo aumentar a eficiência produtiva, de modo a suprir a necessidade brasileira e internacional (Conab, 2024).

A busca por maiores rendimentos na cultura da soja exige o uso de práticas agrícolas que proporcionem um ambiente de produção favorável para seu máximo desenvolvimento. Dentre os nutrientes demandados, o nitrogênio é um dos que a cultura exige em maiores quantidades. Calcula-se que para produzir uma tonelada de soja, necessita-se de cerca de 80kg de nitrogênio (Hungria, Mendes E Campo, 2007; Hungria *et al.*, 2020; Hungria *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2020). A produção brasileira seria inviabilizada caso o suprimento dessa quantidade de nitrogênio (N) fosse feito exclusivamente via fertilizantes minerais, já que a demanda de N fica entre 240 e 480kg de N por hectare. Na cultura da soja, toda necessidade de N é suprida via simbiose utilizando bactérias fixadoras de nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos principais alicerces na produção da soja, garantindo vantagens à agricultura e ao meio ambiente, visto que elimina a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados, reduz os impactos ambientais e garante a sustentabilidade do sistema de produção (Telles *et al.*, 2023; Costa, 2023). A FBN ocorre devido à simbiose das bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e as plantas de soja, originando nódulos nas raízes. As bactérias captam o nitrogênio da atmosfera e através da enzima nitrogenase o reduz em amônia. Posteriormente, converte a amônia em compostos nitrogenados para absorção das plantas; em troca a planta fornece nutrientes para sobrevivência das bactérias (Prando *et al.* 2022; Hungria; Nogueira, 2020, Hungria; Nogueira, 2022; Hungria *et al.*, 2015). Hungria e Nogueira (2022) relatam que em decorrência do uso das bactérias fixadoras de nitrogênio, economizou-se cerca de 17 bilhões de dólares por ano e houve redução da emissão de mais de 200 milhões de toneladas de gases do efeito estufa.

O processo de aplicação dessas bactérias é chamado de inoculação. Essa aplicação pode ser feita via semente, onde o inoculante é misturado às sementes de deve ser aplicado no prazo máximo de 24h. Essa forma vem caindo em desuso devido

à dificuldade de mistura dos inoculantes e também à menor eficiência, pois fica em contato direto com fungicidas e inseticidas. A forma mais adotada é via sulco de plantio, onde o inoculante é injetado, no momento do plantio, na abertura do sulco da semeadora para deposição da semente (Zibiane *et al.*, 2023; Hungria *et al.*, 2007; Vieira Neto *et al.*, 2008). Outra forma de aplicação que vem sendo testada é via pulverização, empregada apenas quando ocorre algum problema com a inoculação via sulco ou sendo um reforço para aumentar a nodulação (Zibiane *et al.*, 2023; Zilli *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2022).

Além da bactéria *Bradyrhizobium*, são utilizados outros microrganismos no momento do plantio, cada um trazendo um benefício diferente para a cultura. A aplicação de *Azospirillum brasilense* em conjunto com o *Bradyrhizobium* mostrou-se muito eficiente, visto que o *Azospirillum* tem capacidade de produção de fitormônios estimulando a formação de raízes, o que proporciona maior exploração por água e nutrientes e pode incrementar a infecção pelo *Bradyrhizobium*. Essa prática é denominada co-inoculação e deve ser realizada todos os anos para garantir o potencial produtivo dada a especificidade das bactérias (Hungria *et al.*, 2020; Hungria e Nogueira, 2020; Santos *et al.*, 2019; Silveira, 2021; Hungria *et al.*, 2015).

A cultura da soja tem alta demanda por N, que atinge um pico no estágio R2 (floração) e se estende até o final do R5 (enchimento de grãos), porém em R5 a FBN tem uma queda significativa, o que pode afetar a produtividade da cultura (Hungria *et al.*, 2020; Hungria e Nogueira, 2020) devido à idade dos nódulos. Uma forma que vem sendo testada para minimizar esse efeito é a inoculação adicional no meio do ciclo como reforço da inoculação de plantio, visando à formação de novos nódulos para fornecimento de nitrogênio nas fases de pico de demanda da cultura (Sousa *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2022; Hungria *et al.*, 2020; Hungria e Nogueira, 2020).

Pesquisas mostram que a inoculação adicional como reforço promove maior formação de nódulos radiculares e aumenta o crescimento radicular (Moretti *et al.*, 2020; Rondina *et al.*, 2020; Hungria *et al.*, 2015; Rego *et al.*, 2018; Deak *et al.*, 2019). No entanto, esses resultados ainda não estão consolidados, visto que algumas pesquisas indicaram que essa reaplicação não proporcionou ganhos (Fipke *et al.*, 2020; Galindo *et al.*, 2017; Zuffo *et al.*, 2020).

O processo de nodulação é influenciado por fatores ambientais e do solo, como temperatura, pH, umidade, fertilidade, matéria orgânica e salinidade (Hungria *et al.*, 2017; Ohyama *et al.*, 2017; Ronner *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 1996; Sadowski, 2005;

Zhang *et al.*, 2011). A temperatura ideal do solo para sobrevivência das bactérias e para que a nodulação ocorra é de 25 °C. Temperaturas amenas, inferiores a 15 °C, causam redução da atividade ou até mesmo inibição das bactérias. Já temperaturas acima de 30–35 °C podem causar a inviabilidade das bactérias e reduzir a nodulação (Sadowski, 2005; Zhang *et al.*, 1996; Prando *et al.*, 2022; Galletti *et al.*, 1971; Figueiredo *et al.*, 1995).

A aplicação de inoculantes via semente requer cuidado adicional devido ao contato das bactérias com produtos químicos. A aplicação de herbicidas para controle de plantas daninhas também pode interferir na nodulação. Arruda *et al.* (2001) avaliaram doses de sulfentrazone na nodulação e concluíram que há redução na nodulação com o aumento da dose do ingrediente ativo. Outro fator a ser considerado é o pH do solo. O pH ideal para eficiência das bactérias é em torno de 6,5. Solos ácidos prejudicam o desenvolvimento radicular, a infecção e o crescimento da bactéria (Silva *et al.*, 2002; Hungria e Vargas, 2000).

A umidade do solo é um importante fator na nodulação da soja e no processo da FBN. O estresse hídrico afeta diretamente a atividade da enzima nitrogenase, dificulta o processo de fixação de nitrogênio e diminui a produção da leghemoglobina (Hungria e Vargas, 2000; King e Purcell, 2005; Sinclair *et al.*, 2007; Sadowski, 2005). A falta de água pode influenciar na sobrevivência das bactérias no solo e em sua multiplicação, o que impacta diretamente o processo de nodulação e fixação biológica de N.

A aplicação de microrganismos, no caso as bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, via irrigação por aspersão pode ser o diferencial para garantir a sua sobrevivência e multiplicação, e por consequência sua infecção nas plantas, proporcionando maior produtividade com a mesma base tecnológica. Isso pois a técnica da irrigação permite garantir níveis adequados de umidade do solo, reduz a temperatura do solo e proporciona um microclima favorável para o desenvolvimento das culturas e dos microrganismos.

Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivos avaliar a aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* via sistema de irrigação por aspersão na cultura da soja e avaliar a sobrevivência dessas bactérias em diversas condições de campo, simuladas em laboratório e gerar uma recomendação de aplicação visando garantir o máximo potencial dessas bactérias.

Hipóteses

A primeira hipótese deste trabalho é que as bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* apresentam grande mortalidade nas condições atuais de aplicação no campo, mesmo em sulco de semeadura. A segunda hipótese é que a aplicação dessas bactérias via sistema de irrigação por aspersão é mais eficiente que os métodos atuais, proporcionando maior sobrevivência das bactérias devido as condições favoráveis que a irrigação promove e com isso elevar o rendimento de grãos. A terceira hipótese é que a combinação entre dose de *Bradyrhizobium* e época de aplicação via irrigação interfere no processo de nodulação e por consequência na produtividade da cultura.

CAPÍTULO 1

SOBREVIVÊNCIA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* EM CONDIÇÕES SIMULADAS DE CAMPO

Caio Nascimento Fernandes^a, Ivana Giovannetti Castilho^b, João Carlos Cury Saad^a e Vera Lucia Mores Rall^b

^aDepartamento de Engenharia Rural e Socioeconomia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

^bDepartamento de Genética, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente: Caio Nascimento Fernandes (caionfernandes@hotmail.com)

1.1 Introdução

O emprego das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na agricultura brasileira proporciona muitos benefícios fitotécnicos e econômicos para as culturas. A coinoculação, termo adotado quando se utilizam essas duas bactérias conjuntamente, representa uma das inovações biotecnológicas mais importantes na agricultura, especialmente para a cultura da soja. A seleção das bactérias do gênero *Bradyrhizobium* é um caso de sucesso para a soja, graças à relação quase perfeita da simbiose entre planta e bactéria, sendo extremamente importante para a viabilidade do seu cultivo no Brasil. A simbiose resulta na formação de nódulos radiculares com os quais a planta protege e nutre as bactérias. Em contrapartida, as bactérias capturam o nitrogênio atmosférico e o convertem em compostos assimiláveis pela planta hospedeira.

A bactéria *Bradyrhizobium japonicum* é responsável por realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN na soja substitui toda a adubação nitrogenada,

proporcionando uma economia de cerca de 17 bilhões de dólares por ano, com benefícios também ambientais. A eliminação do uso de fertilizantes nitrogenados reduz a emissão de mais de 200 milhões de toneladas de gases do efeito estufa (Hungria e Nogueira, 2022; Hungria e Nogueira, 2019). Com isso, a soja brasileira se torna mais sustentável e competitiva no mercado externo (Telles *et al.*, 2023).

As bactérias do gênero *Bradyrhizobium* possuem crescimento relativamente lento, com tempo de geração de 7 a 13 horas. Não são esporuladas, possuem a forma de bacilo, são aeróbias e gram-negativas. A temperatura ótima para sua multiplicação está entre 25 e 30 °C, em meio de cultura Yeast-Manitol-Agar (YMA). Suas colônias são circulares, opacas, convexas, com textura granular, e seu tamanho dificilmente ultrapassa um milímetro de diâmetro em um período de incubação de cinco a sete dias (Willems, 2006; Sahgal e Johri, 2003; Holt *et al.*, 1994; Somasegaran e Hoben, 1994).

Já o *Azospirillum brasilense* é empregado em diversas culturas, como milho, arroz, trigo e soja. Essa bactéria também pode realizar a FBN, porém de forma muito modesta comparada com a *Bradyrhizobium*, sendo insuficiente para atender às demandas das culturas. Entretanto, o maior benefício proporcionado por essas bactérias é a produção de fitormônios, que promove o crescimento vegetal e, principalmente, o crescimento radicular (Barbosa *et al.*, 2021; Rondina *et al.*, 2020; Hungria *et al.*, 2020; Hungria e Nogueira, 2020; Silveira, 2021), favorecendo a absorção de água e nutrientes pela melhor exploração do solo e também o processo de nodulação, por haver maior quantidade de raízes disponíveis para nodular.

O *Azospirillum brasilense* é uma bactéria gram-negativa, diazotrófica, de vida livre ou associada às raízes das plantas (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000). Possui tempo de geração de aproximadamente 3 horas, não é esporulada, possui formato de cisto e estrutura espiralada. Suas colônias são brancas e opacas (Procopio *et al.*, 2011; Alexandre, 2015; Lamm e Neyra, 2011). Possui grande potencial de adaptação ao meio em que está inserida (Cassán *et al.*, 2020; Maroniche *et al.*, 2017).

É fundamental a presença dessas bactérias nos ambientes de produção; porém, sua sobrevivência e estabelecimento são muito influenciados por fatores edafoclimáticos (Campo *et al.*, 2009; Zilli *et al.*, 2009). Fatores ambientais e do solo, como temperatura, pH, umidade, fertilidade, matéria orgânica e salinidade (Hungria *et al.*, 2017; Ohyama

et al., 2017; Ronner *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 1996; Sadowski, 2005; Zhang *et al.*, 2011), afetam diretamente essas bactérias. Portanto, é necessário o avanço em estudos que caracterizem o seu comportamento nas condições usuais em que são aplicadas, visando extrair o máximo potencial dessas bactérias.

1.2 Hipótese e Objetivos

A hipótese deste trabalho é que os microrganismos *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* apresentam grande mortalidade nas condições atuais de aplicação no campo, até mesmo via sulco de semeadura.

Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a sobrevivência dos microrganismos *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em diversas condições de campo, simuladas em laboratório e gerar uma recomendação de aplicação visando garantir o máximo potencial dessas bactérias.

1.3 Material e métodos

1.3.1. Localização e descrição, obtenção e procedência do produto

Os ensaios ocorreram no Departamento de Engenharia Rural e Socioeconomia da Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, campus de Botucatu – SP. As análises microbiológicas foram realizadas no Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu – SP.

Os produtos comerciais utilizados, denominados RHIZOTROP 2 e AZOTROP, possuem concentração mínima de 7×10^9 unidade formadora de colônia (UFC)/mL de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) e 2×10^8 UFC/mL de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), respectivamente. A dosagem recomendada para cultura da soja é de 300 mL por hectare no tratamento via sulco para o RHIZOTROP 2 e 300 mL por hectare em área total para o AZOTROP. O produto foi obtido da empresa Biotrop, com sede em Vinhedo, SP, Brasil.

1.3.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas seguiram as metodologias propostas no Manual de análises de bioinsumos (FERREIRA, NOGUEIRA e HUNGRIA, 2024). Para alguns ensaios foi necessário adaptar a metodologia proposta.

Alguns ensaios foram realizados apenas com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* devido ao custo elevado das análises microbiológicas e pelo fato dessa bactéria ser a mais importante para a soja, já que ela é responsável pela fixação biológica de nitrogênio.

1.3.2.1 Meio de cultivo, técnica de semeadura e tempo de incubação

O meio de cultivo utilizado para o crescimento da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* foi o Yeast-Manitol-Agar (YMA) (Brasil, 2010, 2018). Este meio foi preparado adicionando-se 0,5 g/L de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 0,2 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,1 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 5,0 g/L de manitol, 0,4 g/L de extrato de levedura, 10 mL de solução vermelho congo 0,25%, 13,5 g/L de ágar e 1000 mL de água deionizada (HUNGRIA et al., 2016).

Foi utilizada a técnica de semeadura por espalhamento, conhecida como “spread plate”, que consistiu em distribuir a suspensão de microrganismos sobre a superfície do meio de cultura sólido, utilizando uma alça de Drigalski. As amostras ficaram incubadas entre 7 e 8 dias, em estufa com temperatura de 28 °C (Ferreira, Nogueira e Hungria, 2024).

Já para o *Azospirillum brasilense*, utilizou-se o meio de cultivo Plate Count Ágar (PCA), adquirido da fabricante Merck Millipore. Foram dissolvidos 23,5 g do meio em 1000 mL de água deionizada. Também se utilizou a técnica de semeadura por espalhamento, com alça de Drigalski. As amostras ficaram incubadas por cinco dias, em estufa com temperatura de 30 °C (Ferreira, Nogueira e Hungria, 2024).

Ambos os meios foram dissolvidos em um Erlenmeyer de 1000 mL e esterilizados em autoclave à 121°C, durante 20 minutos. Posterior à esterilização, os meios foram vertidos em placas de petri descartáveis, estéreis, e após solidificação

as placas foram dispostas em sacos plásticos e guardadas em posição invertida, em geladeira.

1.3.2.2 Preparo dos tubos de ensaio para as diluições decimais

Para as análises microbiológicas, foi necessário realizar a diluição seriada decimal para permitir a contagem das UFCs nas placas de Petri. A primeira etapa foi preparar a solução fisiológica 0,85% que consiste em 0,85g de NaCl (cloreto de sódio) para cada 100mL de água deionizada. Foram adicionadas 9 mL dessa solução em tubos de ensaio, através de um dispensador manual. Em seguida, os tubos foram fechados com algodão hidrofóbico e autoclavados a 121°C por 20 minutos para esterilização.

1.3.2.3 Procedimento para análise microbiológica para o inoculante líquido

O procedimento descrito a seguir foi aplicado em todos os ensaios com o inoculante líquido, sendo mencionado como análise microbiológica para contagem de UFC baseada em Ferreira, Nogueira e Hungria (2024).

O primeiro passo foi realizar a diluição seriada decimal, em que foi retirada uma alíquota de 1 mL da amostra a ser analisada e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica 0,85% esterilizada (descrito no item 1.2.2.2), a fim de formar a diluição 10^{-1} . Da diluição 10^{-1} retirou-se uma alíquota de 1 mL e adicionou-se em outro tubo de ensaio formando a diluição 10^{-2} . Tal procedimento foi realizado sucessivamente até atingir a diluição 10^{-7} . Foram preparadas duas series de diluição, ou duas análises, sendo que o resultado foi a média das duas series de diluição.

O segundo passo foi realizar a semeadura das placas contendo o meio de cultura específico para o microrganismo (YMA para o *Bradyrhizobium japonicum* e PCA para *Azospirillum brasilense*), utilizando duas placas distintas para cada diluição a ser plaqueada. Com o auxílio de uma pipeta regulável, foi semeado 100 µL de cada uma das diluições sobre a superfície do meio de culturas nas placas de petri, em duplicata.

O inóculo foi espalhado na superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa de acordo com o tempo e temperatura específicos para cada microrganismo.

Finalizado o tempo de incubação, foi realizada a contagem das colônias, considerando a diluição que apresentou entre 30 e 300 UFC. Outro critério adotado foi uma variação máxima de 30% de contagem entre a duplicata, caso a variação fosse maior a contagem era desconsiderada.

1.3.2.4 Procedimento para análise microbiológica para os ensaios com aplicação no solo

O procedimento aqui descrito foi realizado para todos os ensaios com aplicação do inoculante no solo, quando citado que foi realizada a análise microbiológica para contagem de UFC nos ensaios com o solo. Os procedimentos foram baseados e adaptados de Ferreira, Nogueira e Hungria (2024), visto que não há uma metodologia específica.

O primeiro passo foi realizar a diluição seriada decimal. O solo presente na cuba de vidro foi colocado em um béquer de 500 mL esterilizado e nele adicionou-se 50 mL de solução fisiológica 0,85% esterilizada (descrito no item 1.2.2.2), para formar a diluição 10^{-1} . Logo após, foi colocado em um agitador orbital, durante 20 minutos, com rotação de 150 rpm (rotações por minuto). Em seguida, retirou-se, com auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 1 mL da suspensão que foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução fisiológica, formando a diluição 10^{-2} . Do tubo com a diluição 10^{-2} , retirou-se 1 mL com uma ponteira nova e esterilizada e transferiu-se para outro frasco contendo 9 mL de solução fisiológica a fim de formar a diluição 10^{-3} , e assim, sucessivamente. Foram preparadas duas séries de diluição, ou duas análises, sendo que o resultado foi a média das duas séries de diluição.

O segundo passo foi realizar a semeadura das placas contendo o meio de cultura específico para o microrganismo (YMA para o *Bradyrhizobium japonicum* e PCA para *Azospirillum brasilense*), utilizando duas placas distintas para cada diluição a ser plaqueada. Com uma pipeta regulável, foi semeado 100 µL de cada uma das diluições sobre o meio de cultura nas placas de petri, em duplicata.

O inóculo foi espalhado na superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski esterilizada. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa de acordo com o tempo e temperatura específicos para cada microrganismo.

Finalizado o tempo de incubação, foi realizada a contagem das colônias, considerando a diluição que apresentou entre 30 e 300 UFC. Outro critério adotado foi uma variação máxima de 30% de contagem entre a duplicata, caso a variação fosse maior a contagem era desconsiderada.

1.3.3 Ensaio

1.3.3.1 Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em diferentes níveis de pressão

Foram testados três níveis de carga de pressão, 40, 60 e 80 mca, valores comuns de serem encontradas em sistemas de irrigação. Para realização do ensaio adicionou-se 60mL de inoculante, previamente homogeneizado em embalagem lacrada, em um coletor universal estéril e este foi colocado, aberto, dentro da câmara de Richards higienizada, ligada a um compressor de ar para pressurização (Figura 1). As amostras permaneceram pressurizadas por um período de cinco minutos para cada nível de pressão. Cada ensaio foi realizado de forma individual para cada bactéria visando evitar contaminações. Após o término dos ensaios, realizou-se a análise microbiológica para contagem das UFCs que resistiram a pressão.

Figura 1 – Extrator (câmara) de Richards para ensaio de resistência dos microrganismos à pressão



1.3.3.2 Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* submetidas à agitação por bomba hidráulica

No processo de injeção do inoculante, a calda (inoculante + água) deve permanecer em constante agitação para que o produto não decante no tanque. Este teste simulou a agitação da calda tal qual seria feita em campo, para assim determinar se o impacto mecânico das bactérias no rotor, que fica em alta rotação, causaria sua mortalidade. Para isso, uma bomba hidráulica com rotor fechado foi instalada em um tanque com capacidade de 25 litros. Todo o sistema foi higienizado com álcool 70% e água deionizada.

No tanque foram adicionados 20 litros de água deionizada, 1,12 L do inoculante Rhizotrop 2 para o ensaio com a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* e 1,0 L do inoculante Azotrop para o ensaio com a bactéria *Azospirillum brasilense*. A calda ficou em agitação constante, sob uma carga de pressão de 10 mca durante três horas e seis minutos. O tempo de agitação foi determinado para que toda a calda passasse pela bomba 180 vezes, simulando o que acontece em campo, porém em um tempo maior. A vazão da agitação em campo é menor o que leva um maior tempo de operação, porém o número de vezes que a calda passa pela bomba é o mesmo que o simulado.

Finalizado o processo de agitação, foi retirada uma amostra de 80 mL do tanque e realizada a análise microbiológica para contagem das UFCs que resistiram à passagem pela bomba hidráulica.

1.3.3.3 Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em diferentes valores de pH de calda

As bactérias possuem uma faixa de pH ótimo para sobrevivência e desenvolvimento. O pH dos inoculantes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em armazenamento é de 7,3 e 5,7, respectivamente. A água de irrigação possui uma variabilidade de pH em função da sua origem, com isso foram testados dois valores distintos para cada bactéria. Para o *Bradyrhizobium japonicum* foram testados os valores de pH 6,0 e 8,0. Já para o *Azospirillum brasilense* testou-se os valores de pH 7,0 e 8,0.

Para elevar o pH até o valor desejado utilizou-se uma solução 1 normal de hidróxido de sódio.

Para realização do ensaio adicionou-se 60 mL de inoculante, previamente homogeneizado em embalagem lacrada, em um coletor universal estéril e foi adicionada, através de um conta gotas, solução 1 normal de hidróxido de sódio para elevar o pH e solução de 1 normal de ácido fosfórico para reduzir o pH quando necessário. Os coletores foram colocados em um agitador orbital em baixa rotação para evitar decantação e garantir uma mistura uniforme (Figura 2).

As amostras permaneceram com o pH alterado por um período de cinco horas até ser realizada a análise microbiológica para contagem das UFCs que resistiram à modificação do pH.

Figura 2 - Amostras em agitador orbital para ensaio de resistência a diferentes valores de pH



1.3.3.4 Compatibilidade da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em mistura com diferentes produtos

Em campo, a aplicação da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* pode ser feita em conjunto com produtos químicos e biológicos. Essa mistura pode ser prejudicial para a bactéria, causando mortalidade e por consequência redução de seu efeito nas plantas. Foi realizado um levantamento, nas áreas produtoras de soja, dos ingredientes ativos mais utilizados em conjunto com a aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* no sulco de plantio, resultando nas misturas testadas neste trabalho (Tabela 1).

Tabela 1 - Quadro das misturas de produtos e microrganismos e sua dosagem

Tratamento	Mistura	Dose do produto em mistura
T1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (BJ) + nematicida/fungicida sistêmico do grupo químico Benzamida Piramida* (1)	BJ: 300 mL ha ⁻¹ ; Nematicida químico: 300 mL ha ⁻¹
T2	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + nematicida microbiológico** (Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis e Paecilomyces lilacinus) (2)	BJ: 300 mL ha ⁻¹ ; Nematicida microbiológico: 75 g/ha
T3	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + 1 + 2	BJ: 300 mL ha ⁻¹ ; Nematicida químico: 300 mL/ha; Nematicida microbiológico: 75 g/ha
T4	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> + Fertilizante mineral a base de cobalto, molibdênio e níquel***	BJ: 300 mL ha ⁻¹ ; Fertilizante: 250 mL ha ⁻¹

* nematicida/fungicida sistêmico do grupo químico Benzamida Piramida (FLUOPIRAM - 500g/L); ** nematicida microbiológico (Bacillus licheniformis, cepa ATCC 12713 (mínimo de 9,0 x 10⁹ UFC/g) - 200 g/kg; Bacillus subtilis, cepa ATCC 6051 (mínimo de 9,0 x 10⁹ UFC/g) - 200 g/kg, e Paecilomyces lilacinus (Purpureocillium lilacinum), cepa: CPQBA 040-11 DRM 10 (mínimo de 9,0 x 10⁸ UFC/g) - 200 g/kg); *** Fertilizante mineral a base de Cobalto – 1% (fonte: sulfato de cobalto), Molibdênio – 12% (fonte: molibdato de sódio) e Níquel – 0,5% (fonte: quelato de níquel), densidade 1,42.

Para a realização do ensaio adicionou-se os produtos de cada tratamento, proporcionalmente ao volume, em um coletor universal estéril. Em seguida foi adicionado 60 mL de inoculante, previamente homogeneizado em embalagem lacrada e realizou-se a mistura dos produtos. Os coletores com os produtos e inoculante foram colocados em um agitador orbital em baixa rotação para evitar decantação e garantir uniformidade. Após agitação durante cinco horas e trinta minutos, foi realizada a análise microbiológica para contagem das UFCs que resistiram à mistura dos ingredientes ativos.

1.3.3.5 Monitoramento da temperatura da calda do injetor de inoculante via sulco da semeadora e seu efeito na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em função do tempo de exposição

É fundamental conhecer a temperatura que as bactérias permanecem dentro do tanque de injeção nas semeadoras durante o plantio, visto que ela pode influenciar na sobrevivência das bactérias. Para isso, foram selecionados um sensor de temperatura a prova d'água e um sensor de temperatura/umidade do ar conectados a um microcontrolador para gravação dos dados. O sensor a prova d'água foi inserido dentro do tanque de injeção da semeadora e o sensor de temperatura e umidade do ar foi instalado em um abrigo meteorológico na parte externa da semeadora, ao lado do tanque de injeção (Figuras 3 e 4). Os dados foram coletados desde o início do plantio, no começo da manhã, até o final da tarde, momento em que se encerravam as atividades de campo. Os dados foram coletados durante cinco dias, a cada 5 minutos, em uma área comercial produtora de soja, no mês de novembro (Figura 5).

Figura 3 - Semeadora para plantio de soja, com tanque de injeção de inoculante (em branco) e sensores de temperatura do ar e da calda para monitoramento

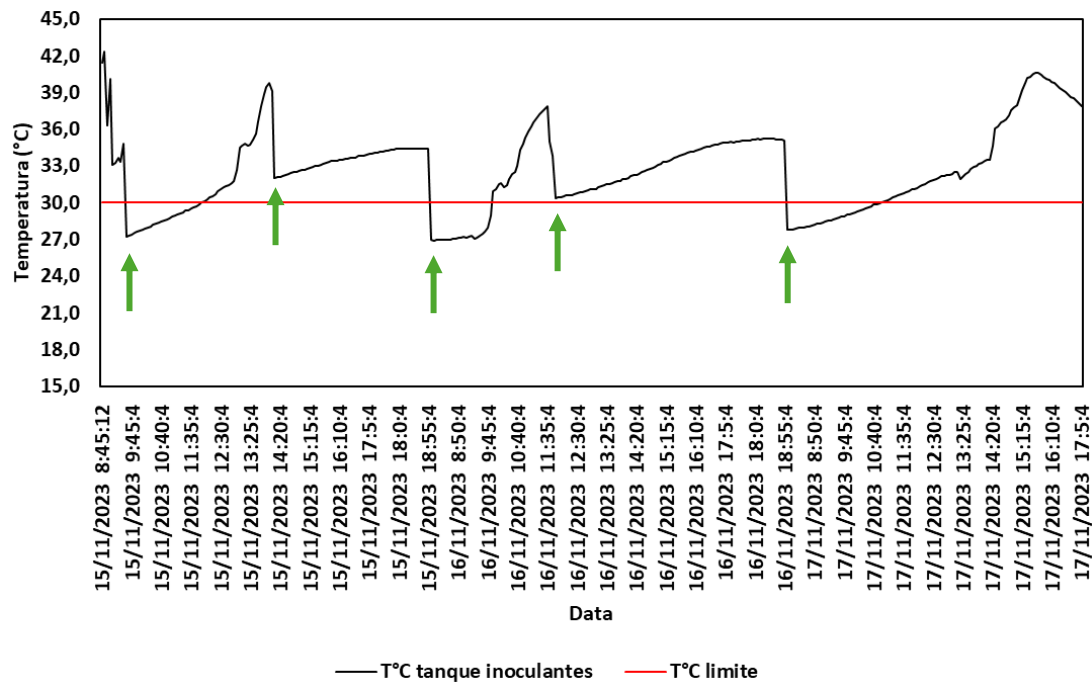


Figura 4 - Vista do tanque de injeção de inoculantes da semeadora com sensor de temperatura (cabo branco) instalado em seu interior para monitoramento da temperatura da calda



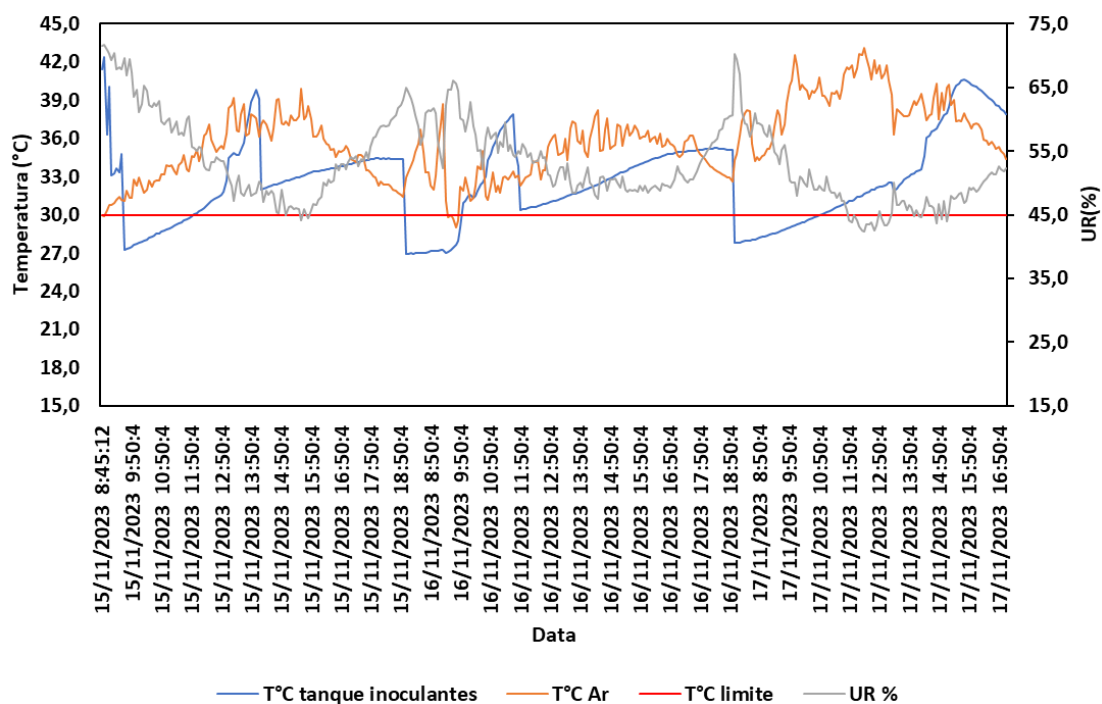
A Figura 5 traz os valores da temperatura na parte interna do tanque de injeção de inoculante da semeadora. A linha vermelha indica a temperatura limite para manutenção das bactérias. As setas indicam os momentos em que o tanque foi reabastecido. Verifica-se que a temperatura ficou em grande parte do tempo acima do limite, principalmente quando o volume do tanque está baixo (proximo do reabastecimento). Em dois momentos de reabastecimento a temperatura já iniciou acima do limite. Isso ocorreu devido ao tanque de água ficar em espera no campo, exposto ao sol. Os demais reabastecimentos iniciaram abaixo da temperatura limite pois o tanque estava cheio ou foi reabastecido com água fresca.

Figura 5- Temperatura interna da calda do tanque de injeção de inoculantes da semeadora, durante três dias de plantio (as setas indicam os momentos de reabastecimento).



A Figura 6 utiliza dados da Figura 5 e inclui outros dados obtidos de sensores temperatura e umidade do ar instalados na parte externa da semeadora. É possível notar uma correlação entre a temperatura da calda e a temperatura do ar, com a temperatura da calda seguindo a tendência da temperatura do ar.

Figura 6- Temperatura interna da calda do tanque de injeção de inoculantes, da semeadora, em três dias de plantio e temperatura e umidade do ar sobre a semeadora durante o plantio



A partir desses dados obtidos em campo, foram estabelecidas as combinações entre temperatura e tempo de exposição, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Combinações entre temperatura da calda e tempo de exposição do inoculante visando ensaio de sobrevivência

Temperatura da calda (°C)	Tempo de exposição (minutos)
35 °C	35
35 °C	70
35 °C	140
35 °C	210
40 °C	25
40 °C	50
40 °C	75

Para realização do ensaio adicionou-se 500 mL de inoculante, previamente homogeneizado em embalagem lacrada, em dois Erlenmeyer esterilizados em autoclave à 121°C por 20 minutos. Os dois recipientes foram mantidos sob agitação dentro de uma estufa com a temperatura programada e, em um deles, foi instalado um sensor de temperatura para monitoramento durante o ensaio. Quando o tempo de cada teste era atingido, uma alíquota de 60 mL era retirada e depositada em um coletor universal estéril.

Finalizado o ensaio, foi realizada a análise microbiológica para contagem das UFCs que resistiram aos testes.

1.3.3.6 Monitoramento da temperatura do solo após o plantio e o efeito da oscilação térmica do solo na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*

Após aplicação das bactérias, o solo será o substrato para multiplicação das mesmas, logo ele deve prover as melhores condições para sobrevivência e multiplicação. As bactérias são aplicadas na mesma profundidade que as sementes, em torno de 3 a 5cm. Nessa profundidade a temperatura do solo apresenta grandes variações dependendo do preparo do solo feito para o plantio, textura do solo, volume de cobertura vegetal, condições climáticas entre outras, já que é uma porção muito superficial.

Neste ensaio buscou-se monitorar a temperatura do solo durante três dias, desde o momento do plantio/aplicação dos inoculantes. Para isso, foram instalados sete sensores de temperatura a prova d'água (modelo DS18B20) e um sensor de temperatura e umidade do ar (modelo DHT 22) conectados a um microcontrolador para gravação dos dados. Antes da instalação em campo, todos os sensores foram calibrados com um sensor de referência da Campbell Scientific (modelo SHT 35). Os sensores a prova d'água foram colocados junto à semente no solo, cada um em uma linha de plantio diferente, logo após a passagem da semeadora, em sete posições distintas (Figuras 7 e 8). A uma distância de 6 metros, foi colocado o sensor de temperatura e umidade do ar para monitoramento do clima. Os dados foram coletados a cada 5 minutos e gravados em cartão de memória.

Este ensaio foi realizado em uma área comercial produtora de soja, no mês de novembro, época de safra. O solo é caracterizado com textura arenosa. O plantio da soja foi realizado após a colheita do feijão em plantio direto. Nota-se que há pouca presença de palha devido a colheita do feijão deixar pouca palha para cobertura do solo.

Figura 7- Instalação dos sensores de temperatura, junto a semente e ao inoculante aplicado, imediatamente após o plantio para acompanhamento da temperatura do solo

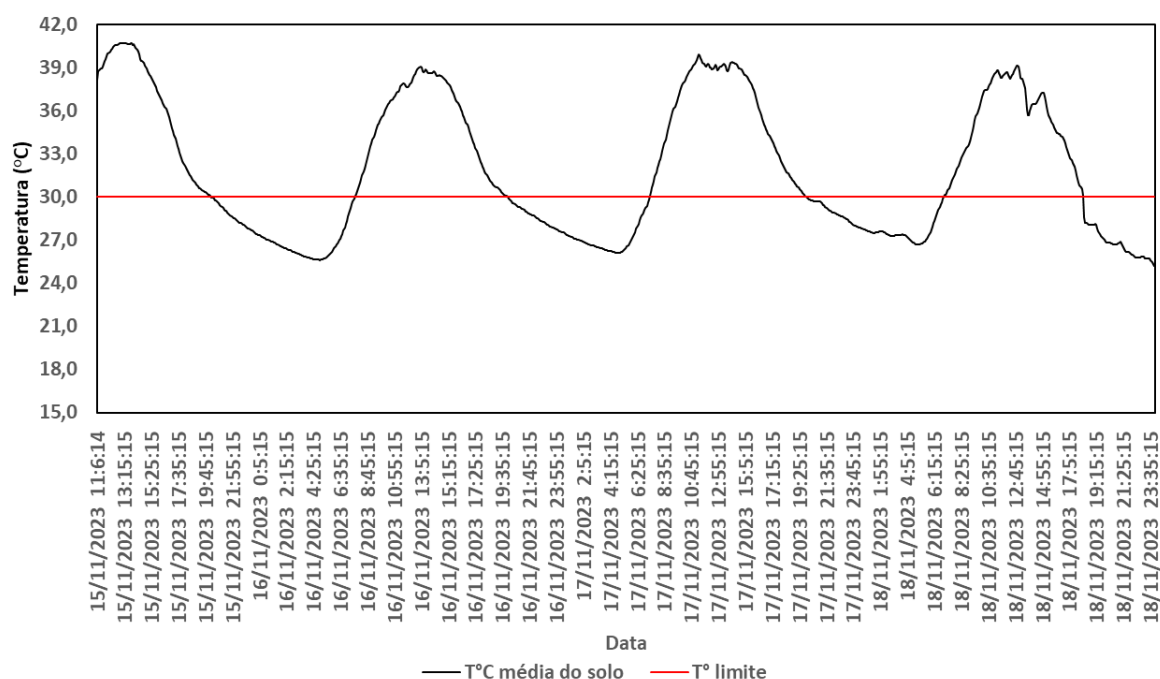


Figura 8 - Instalação dos sensores de temperatura do solo, do ar e da umidade relativa, imediatamente após o plantio para monitoramento contínuo



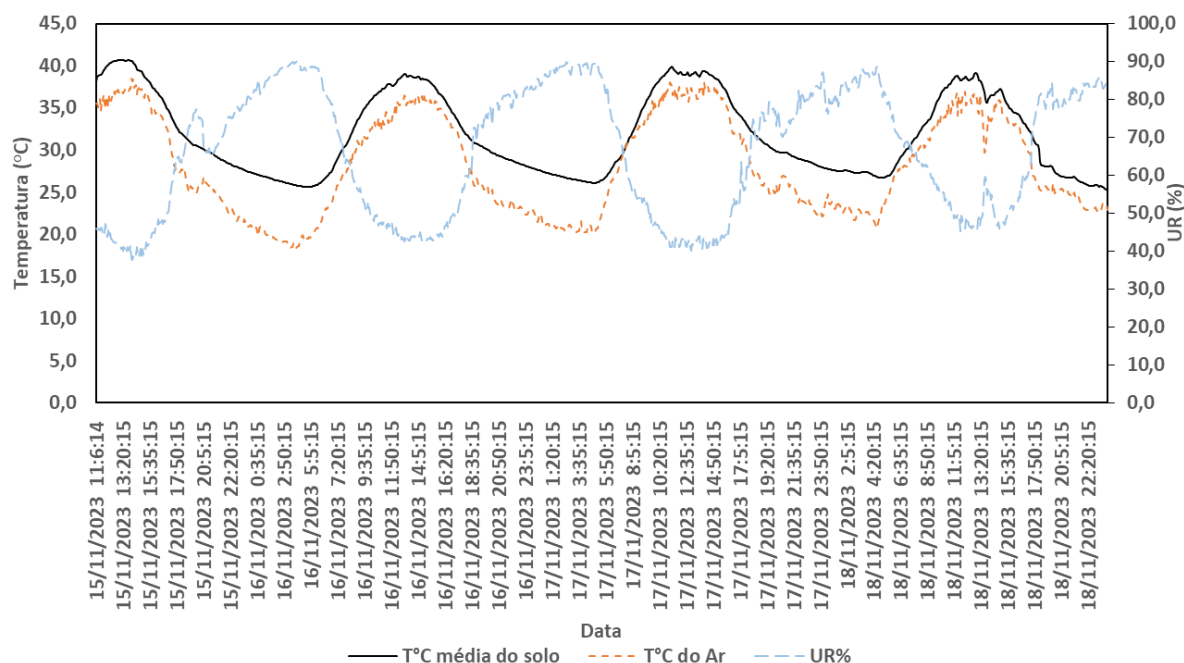
A Figura 9 apresenta a temperatura do solo monitorada a cada cinco minutos, durante 72 horas, na profundidade de aplicação dos inoculantes. A linha vermelha indica a temperatura limite para manutenção e multiplicação das bactérias. Nota-se que durante o dia a temperatura ficou acima dos 30°C e atingiu picos de 40°C, muito superior ao recomendado.

Figura 9 - Temperatura do solo na profundidade de deposição das sementes e aplicação do inoculante, durante 72 horas, de forma contínua



A Figura 10 inclui os dados de temperatura e umidade do ar próximo aos sensores de solo. A temperatura do solo ficou acima da temperatura do ar em todos os momentos e acompanhou seu comportamento de aquecimento e resfriamento. Pode-se ressaltar que no período noturno a temperatura bem acima da do ar, reforçando a característica de que o solo armazena grande quantidade de energia e a libera de forma lenta. Nesse caso por ser um solo arenoso a absorção de energia na forma de calor é ainda mais rápida e intensa.

Figura 10 - Temperatura do solo na profundidade de deposição das sementes e aplicação do inoculante, temperatura e umidade do ar, durante 72 horas, de forma contínua



A partir dos dados coletados em campo, fez-se a simulação da oscilação térmica do solo em condições de estufa visando avaliar o comportamento da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. A Figura 11 traz as curvas da temperatura do solo medidas em campo e em estufa. A linha contínua em preto representa a temperatura do solo medida em campo e a linha laranja representa a temperatura do solo simulada em estufa. Foi realizado em laboratório a simulação da oscilação térmica do solo para analisar o comportamento da bactéria em condições reais. Para isso, foi utilizada uma sala climatizada, uma estufa de pequeno porte com circulação forçada de ar, uma resistência inserida no interior da estufa e um microcontrolador com sensores de temperatura instalados no interior da estufa. No microcontrolador foi programado o comportamento da temperatura obtido em campo, com ajustes automáticos a cada 5 minutos. A lógica de funcionamento seguiu o seguinte padrão: o solo foi colocado no interior da estufa, com um sensor de temperatura inserido no mesmo (Figura 12); no microcontrolador estava armazenada a curva da temperatura durante a medição em campo, em intervalos de 5 minutos, por 72 horas; desta forma o microcontrolador realizava a leitura da temperatura do solo a cada 5 minutos e, dependendo da leitura, era ligada ou desligada a resistência no interior da estufa ajustando o valor para o

mais próximo do real. Esse processo foi realizado continuamente, de forma automática, durante as 72h.

Figura 11- Temperatura do solo medida em campo e a temperatura do solo simulada em estufa para avaliação de seu efeito nos microrganismos, durante 72 horas

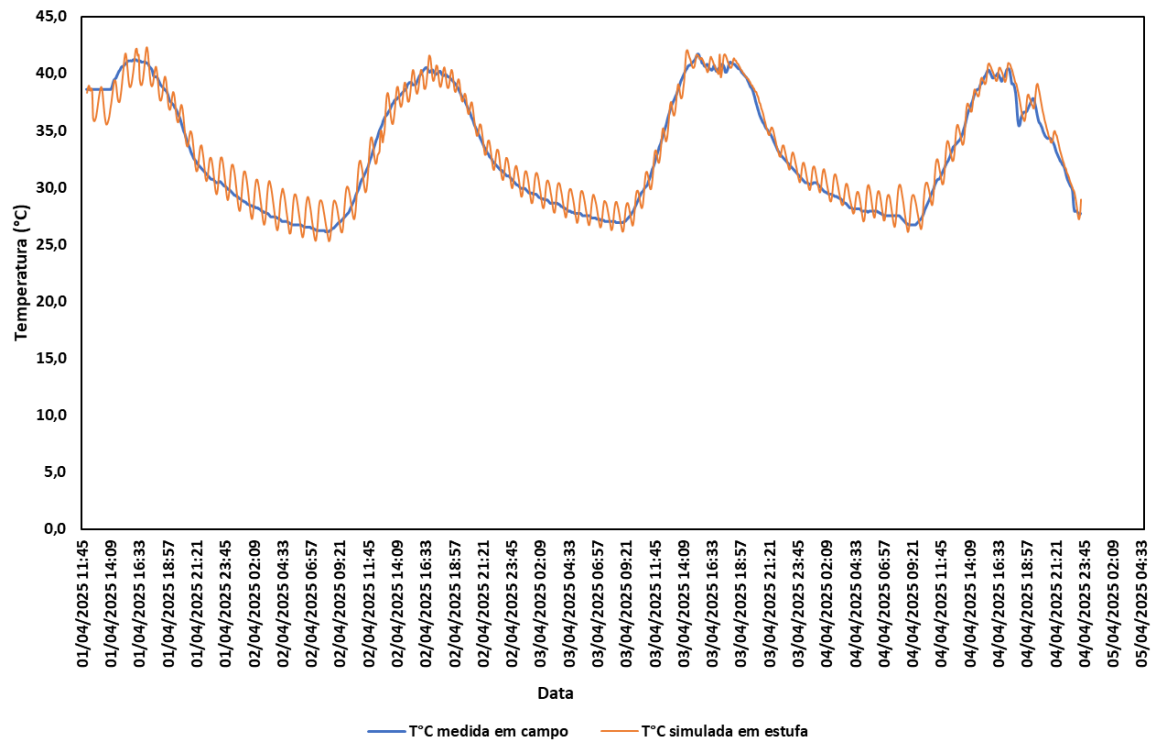


Figura 12- Vista da cuba de vidro com solo e do sensor de temperatura para simulação, em estufa, da oscilação térmica que ocorre em condições de campo, visando avaliar o comportamento dos microrganismos



Para simular um sulco de plantio, foi confeccionado uma cuba de vidro com dimensões de 12,0cm de comprimento, 2,5cm de largura e 4,0cm de profundidade. Ela foi preenchida com o mesmo solo da área comercial onde foram realizadas as coletas de dados e, em seguida, foi esterilizado em autoclave à 121°C por 25 minutos.

Com a cuba preenchida de solo estéril, abriu-se um sulco no centro do solo com uma espátula esterilizada com uma profundidade de 2,0cm e adicionou-se, com o auxílio de uma micropipeta, 100 µL de uma solução com a proporção de 300 mL de inoculante Rhizotrop 2 para cada 10 litros de água esterilizada (Figura 13). Adicionada a solução, o sulco foi fechado e foi adicionada água esterilizada em autoclave à 121°C por 20 minutos em quantidade suficiente para atingir a umidade de capacidade de campo, considerada a condição ótima de umidade. Foi definida essa umidade para que o fator temperatura fosse isolado e assim garantir que somente ele influenciasse nos resultados. Em seguida, a cuba foi envolvida com papel filme para garantir que o solo se mantivesse úmido durante o período do ensaio. Foram confeccionadas várias cubas para que, nos momentos programados, fossem retiradas e analisadas. Finalizado o processo, as cubas foram colocadas na estufa para iniciar a simulação da oscilação de temperatura.

A cada 24h foi retirada uma cuba da estufa para análise microbiológica por meio da contagem das UFCs sobreviventes. Uma cuba foi analisada logo ao término do preparo das amostras, sendo considerada a amostra referência/testemunha da quantidade de UFC inicial.

Para análise microbiológica desse ensaio, todo solo da cuba foi retirado, diluído e agitado para assim realizar as diluições seriadas decimais. Isso foi fundamental visto que a quantidade de inoculante aplicada é muito pequena e caso fosse retirada apenas uma porção de solo, o erro de amostragem seria alto e inviabilizaria o ensaio. Portanto, o uso de todo solo da cuba minimizou o erro da amostragem e permitiu avaliar todo conteúdo aplicado no solo.

Figura 13 - Cuba de vidro com solo para simulação de um sulco de plantio para condução dos testes com os inoculantes simulando sua aplicação direta no solo



1.3.3.7 Efeito da umidade do solo na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*

A umidade do solo é um dos fatores que necessita de testes para caracterizar sua influência na sobrevivência da bactéria aplicada no solo. Não são encontrados ensaios como estes na literatura; portanto não se tem informações sobre o

comportamento da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em determinadas condições de umidade do solo.

No plantio mecanizado, considera-se como umidade ótima 50% da capacidade de água disponível (CAD) para que o maquinário possa realizar a operação de forma eficiente. No entanto, para a germinação das sementes o ideal é 100% da CAD, o que garante uma germinação rápida e uniforme. Com isso foram testadas cinco condições de umidade do solo que podem ser encontradas em campo dependendo da época de plantio, condições climáticas, presença ou ausência de irrigação, sendo elas: 100% da CAD, 75% da CAD, 50% da CAD, 37,5% da CAD e 25% da CAD.

Para realização do ensaio utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item anterior, do preenchimento das cubas de vidro com solo, esterilização, aplicação da solução na mesma proporção, mudando apenas a quantidade de água aplicada de acordo com o tratamento. As amostras ficaram em estufa à 28°C.

Uma cuba foi analisada logo ao término do preparo das amostras, com umidade a 100% da CAD, sendo considerada a amostra no tempo zero e a referência da quantidade de UFC inicial. As demais amostras foram analisadas nos tempos 24h e 48h após aplicação.

1.4 Resultados e Discussão

1.4.1 Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em diferentes níveis de pressão

Na Tabela 3 estão apresentadas as médias de UFC de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida à diferentes cargas de pressão, durante cinco minutos. Nota-se que os valores das potencias da base dez tanto da testemunha quanto dos tratamentos com pressão não sofreram alteração. Os resultados mostram que a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* pode ser submetida a uma pressão máxima de 80m.c.a, durante um período de cinco minutos, que não haverá mortalidade da bactéria.

Tabela 3 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida à diferentes cargas de pressão durante 5 minutos de pressurização

Tratamentos	Contagem
	UFC mL ⁻¹
Testemunha - Pressão 0 mca	1,39x10 ⁹
Pressão 40 mca	3,30x10 ⁹
Pressão 60 mca	1,43x10 ⁹
Pressão 80 mca	2,68x10 ⁹
CV %	7,8

CV%: coeficiente de variação.

O mesmo resultado obtido para bactéria *Bradyrhizobium japonicum* foi encontrado para o *Azospirillum brasilense* (Tabela 4). Essa bactéria também pode ser submetida a pressão máxima de 80m.c.a, durante cinco minutos, que não causará sua mortalidade.

Tabela 4 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Azospirillum brasilense*, submetido à diferentes pressões durante 5 minutos de pressurização

Tratamentos	Contagem
	UFC mL ⁻¹
Testemunha - Pressão 0 mca	1,49x10 ⁸
Pressão 40 mca	1,70x10 ⁸
Pressão 60 mca	1,65x10 ⁸
Pressão 80 mca	1,84x10 ⁸
CV %	4,0

CV%: coeficiente de variação.

Essa informação é importante pois revela a resistência da bactéria a diferentes pressões e amplia as formas de aplicação da bactéria no campo, indicando a viabilidade de aplicação em sistemas com maior pressão, como pulverizadores, sistemas de irrigação e injetores que possuam maior pressão.

1.4.2 Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* submetidos à agitação por bomba hidráulica

A passagem constante da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* pelo rotor da bomba hidráulica, em alta rotação (3600rpm) e sob uma carga de pressão de 10 m.c.a, não causou sua mortalidade como demonstra a Tabela 5. Isso é fundamental, pois complementa o resultado anterior da pressão, indicando que essa bactéria pode ser pressurizada por determinado tempo e pressão e, além disso, suporta a passagem por um rotor em alta rotação.

Tabela 5 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida à agitação pressurizada à 10m.c.a, em bomba hidráulica durante 3 horas

Tratamentos	Contagem UFC mL ⁻¹
Testemunha sem agitação	1,15x10 ⁹
Agitação pressurizada	1,17x10 ⁹
CV %	5,2

CV%: coeficiente de variação.

A Tabela 6, apresenta o mesmo resultado e conclusão para a bactéria *Azospirillum brasilense*, ou seja, não houve mortalidade ao passar pelo rotor em alta rotação.

Tabela 6 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Azospirillum brasilense*, submetido à agitação pressurizada à 10m.c.a, em bomba hidráulica durante 3 horas

Tratamentos	Contagem UFC mL ⁻¹
Testemunha sem agitação	1,69x10 ⁸
Agitação pressurizada	1,91x10 ⁸
CV %	6,1

CV%: coeficiente de variação.

1.4.3 Sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em diferentes valores de pH de calda

A mudança de uma unidade de pH, acima ou abaixo do original da embalagem, não causou mortalidade da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* durante um período de exposição de 5h30min (Tabela 7). Esse inoculante pode ser diluído em água desde pH 6,0 até um pH 8,0, sem prejuízo.

Tabela 7 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida à diferentes pH de calda durante 5 horas

Tratamentos	Contagem UFC mL ⁻¹
Testemunha pH 7,3 original	2,37x10 ⁹
pH 6,0	2,19x10 ⁹
pH 8,0	2,08x10 ⁹
CV %	6,0

CV%: coeficiente de variação.

Para o *Azospirillum brasilense* houve mortalidade em função do aumento do pH em um tempo de exposição de 5h30min (Tabela 8). Esse inoculante pode ser diluído em água com valor de pH máximo de 7,0, ou seja, a neutralidade. Por ser originalmente ácido (pH 5,3), a elevação do pH à 8,0 causou a mortalidade de 90% das bactérias, ou seja, da quantidade de UFC inicial restaram apenas 10%, após a exposição à um pH 8,0.

Tabela 8 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Azospirillum brasilense*, submetido à diferentes pH de calda durante 5 horas

Tratamentos	Contagem UFC mL ⁻¹
Testemunha pH 5,3 original	2,06x10 ⁸
pH 7,0	2,02x10 ⁸
pH 8,0	2,61x10 ⁷
CV %	1,8

CV%: coeficiente de variação.

1.4.4 Compatibilidade da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em mistura com diferentes produtos

O uso de produtos químicos com os microrganismos pode ser prejudicial, pois determinados fungicidas, nematicidas e inseticidas, quando em contato direto com os inoculantes, causam sua mortalidade e diminuem a eficiência da nodulação (Marks *et al.*, 2013; Bueno *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2013; Campo e Hungria, 2000; Mendes *et al.*, 2010). A Tabela 9 apresenta a UFC da bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (BJ) quando aplicada conjuntamente com um nematicida/fungicida químico (BP), com um nematicida microbiológico (NM) e com um fertilizante mineral (F), durante 5 h e 30 min de contato.

Os resultados mostram que houve compatibilidade entre a bactéria BJ e o nematicida/fungicida químico e o fertilizante, já que não houve redução nas contagens comparativamente com a testemunha pura. No entanto, nas duas misturas em que o nematicida microbiológico estava presente houve redução de 90% no número de UFC de BJ. Isso pode indicar que houve competição entre os microrganismos e o nematicida microbiológico, por ser mais “agressivo”, levando à redução na população de BJ. Desta forma, recomenda-se não manter esses microrganismos em conjunto no mesmo tanque de aplicação.

Tabela 9 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, em mistura com diferentes ingredientes ativos durante 5 horas e 30 minutos

Tratamentos	Contagem
	UFC mL ⁻¹
Testemunha – produto original	3,90x10 ⁷
BJ + BP	5,10x10 ⁷
BJ + NM	5,25x10 ⁶
BJ + BP + NM	4,00x10 ⁶
BJ + F	1,82x10 ⁷
CV %	10,9

CV%: coeficiente de variação; BJ: *Bradyrhizobium japonicum*; BP: nematicida/fungicida sistêmico do grupo químico Benzamida Piramida (FLUOPIRAM - 500g/L); ** nematicida microbiológico (*Bacillus licheniformis*, cepa ATCC 12713 (mínimo de 9,0 x 10⁹ UFC/g) - 200 g/kg; *Bacillus subtilis*, cepa ATCC 6051 (mínimo de 9,0 x 10⁹ UFC/g) - 200 g/kg, e *Paecilomyces lilacinus* (*Purpureocillium lilacinum*), cepa: CPQBA 040-11 DRM 10 (mínimo de 9,0 x 10⁸ UFC/g) - 200 g/kg); *** Fertilizante mineral a base de Cobalto – 1% (fonte: sulfato de cobalto), Molibdênio – 12% (fonte: molibdato de sódio) e Níquel – 0,5% (fonte: quelato de níquel), densidade 1,42.

1.4.5 Efeito da combinação temperatura e tempo na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*

Uma das principais questões relacionadas a aplicação de inoculantes é a temperatura de exposição das bactérias. Em condições de campo, os inoculantes ficam expostos a temperaturas elevadas, acima de 32°C facilmente, e muitas vezes é dito que grande parte das bactérias já poderiam estar mortas devido a essa exposição. Na literatura para BJ, a temperatura ideal é 28°C e a máxima recomendada é de 30°C (Prando *et al.*, 2020; Prando *et al.*, 2022; Mendes *et al.*, 2010; Vidor, 1981; Morote *et al.*, 1990; Hungria e Vargas, 2000; Norris e Date, 1976). Estes estudos foram realizados há muitos anos e essas recomendações são utilizadas até os dias atuais. Entretanto, nessas duas décadas não foram feitas novas pesquisas para confirmar essa recomendação para as novas cepas selecionadas, já que houve grande avanço na seleção de cepas mais eficientes e resistentes.

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que essa informação está desatualizada e necessita ser modificada, já que os principais estudos foram realizados antes dos anos 2000 (Munévar e Wollum LL, 1981; Galleti *et al.*, 1971; Freire e Vidor, 1971; Munns, 1977; Keyser e Munns, 1979; Vidor, 1981; Morote *et al.*, 1990). Nessa época as cepas eram diferentes das atuais, já que houve um grande avanço na seleção de novas estirpes. O ensaio realizado manteve a bactéria BJ a uma temperatura de 35°C com exposição mínima de 35 minutos e máxima de 210 minutos, sendo que nesse intervalo não houve mortalidade. Essa informação é nova e muda os parâmetros já estabelecidos para cepas mais antigas.

As testemunhas permaneceram em temperatura de armazenamento controlada de 25°C. Uma amostra foi retirada da embalagem original e analisada imediatamente.

Tabela 10 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida a temperatura de 35°C com diferentes tempos de exposição

Tratamentos	Contagem
	UFC mL ⁻¹
Testemunha – 0 min	2,85x10 ⁹
35°C – 35 min	5,22x10 ⁹
35°C – 70 min	3,44x10 ⁹
35°C – 140 min	3,01x10 ⁹
35°C – 210 min	2,33x10 ⁹
CV %	9,0

CV%: coeficiente de variação.

Na Tabela 11 estão os resultados com a temperatura de 40°C. A bactéria BJ quando submetida 25 e 50 minutos à temperatura de 40°C, não sofreu mortalidade, porém quando o tempo de exposição passou para 75 minutos já ocorreu prejuízo, restando apenas 10% de UFC da quantidade original.

Com base nestes resultados, o ideal seria ter um sensor de temperatura instalado nos tanques de injeção de inoculante para que o operador monitorasse, desde a cabine do trator, a temperatura da calda em tempo real, para que quando chegasse a 40°C medidas fossem tomadas. A temperatura de 40°C só foi observada em campo quando o volume de calda estava baixo. Portanto, o ideal seria repor a calda antes de estar próximo do esgotamento. Para não diminuir o rendimento operacional podem ser utilizados tanques com maiores volumes, porém vale a mesma questão de reposição quando o volume ficar baixo.

Tabela 11 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida a temperatura de 40°C com diferentes tempos de exposição

Tratamentos	Contagem
	UFC mL ⁻¹
Testemunha – 0 min	2,85x10 ⁹
40°C 25 min	2,32x10 ⁹
40°C 50 min	4,59x10 ⁹
40°C 75 min	1,50x10 ⁸
CV %	6,9

CV%: coeficiente de variação.

1.4.6 Efeito da oscilação térmica do solo na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*

O primeiro passo ao realizar os ensaios com aplicação da bactéria BJ no solo, foi realizar a validação da repetibilidade da metodologia adaptada de (Ferreira, Nogueira e Hungria, 2024), pois não há uma metodologia específica para os ensaios realizados nesta pesquisa. A Tabela 12 apresenta a contagem de UFC g⁻¹ de quatro repetições. Cada repetição foi composta por uma cuba de solo autoclavada, com a bactéria BJ aplicada. É possível observar que houve repetibilidade dos dados, indicando que a metodologia estabelecida foi eficiente.

Tabela 12 - Repetibilidade da contagem de UFC de *Bradyrhizobium japonicum* no solo

Tratamentos	Contagem UFC g⁻¹ de solo
Repetição 1	2,20x10 ⁶
Repetição 2	1,65x10 ⁶
Repetição 3	2,05x10 ⁶
Repetição 4	2,10x10 ⁶
CV %	4,8

CV%: coeficiente de variação.

A Tabela 13 traz os resultados da contagem de UFC da bactéria BJ submetida a oscilação térmica que ocorre no solo, simulada em condições de laboratório. No tempo zero, ou seja, logo após aplicação do inoculante na cuba contendo o solo, foi realizada a análise microbiológica para contagem das UFCs que foram aplicadas na amostra. Quando se analisou a contagem após 24h (T1) notou-se que houve mortalidade de 90% das bactérias. Isso pode ter ocorrido devido a temperatura elevada no início da aplicação. A Figura 15 mostra a temperatura do solo medida em campo (linha preta) e a temperatura do solo na simulação em laboratório (linha laranja). Essa medida em campo foi realizada no início do plantio, logo essa é uma condição real que pode acontecer na época de plantio em que se realizou a medição. Nota-se que no início do plantio e também no início da aplicação do inoculante, já que são operações concomitantes, a temperatura do solo já estava próxima dos 39°C e com o passar das horas ela se elevou e atingiu 41°C. A temperatura do solo

permaneceu 175 minutos acima de 40°C, o que causou a mortalidade das bactérias. Esse dado confirma os resultados obtidos na Tabela 11, ou seja, tempos maiores de exposição a temperatura de 40°C causaram mortalidade das bactérias BJ.

Após esse período a temperatura caiu abaixo dos 40°C e 35°C, e passadas mais 24h (T2), as bactérias BJ se multiplicaram já que a temperatura ficou na faixa ideal para multiplicação. Nota-se que, em apenas 24h, de T1 para T2, houve um crescimento de 900% (10 vezes) comparado a T0 e 9900% (100 vezes) comparado com T1. Ao final de 72h, ela permaneceu estável com mesma contagem de T2.

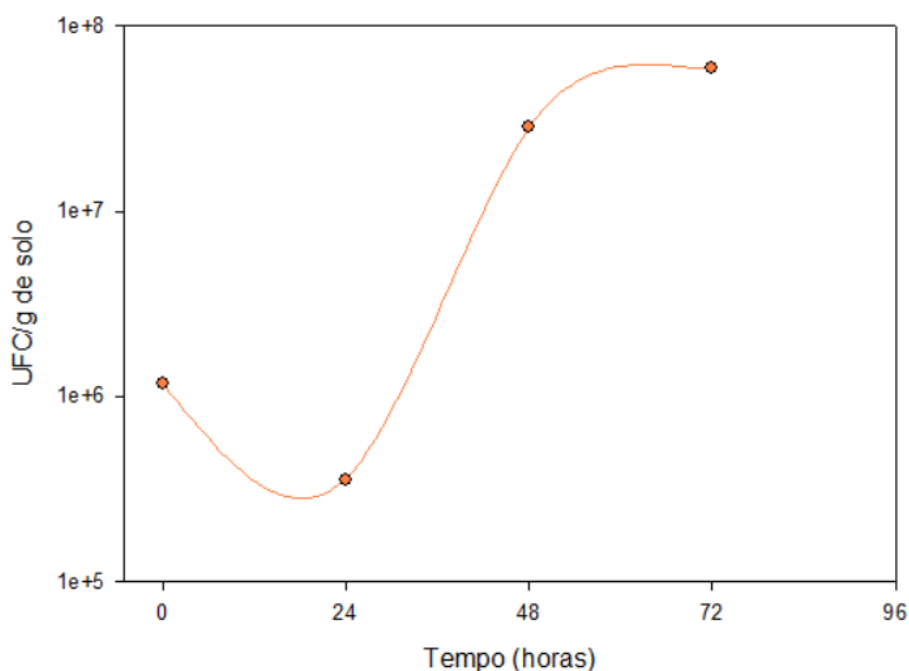
Cabe ressaltar que nessa condição de ensaio, não foi feita nenhuma suplementação de nutrientes no solo para crescimento das bactérias e que a umidade foi mantida na capacidade de campo, para isolar o fator temperatura.

Tabela 13 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida a simulação da oscilação térmica que ocorre no solo, em quatro momentos distintos

Tratamentos	Contagem UFC g⁻¹ de solo
Testemunha – T0	1,17x10 ⁶
T1 - 24h	3,56x10 ⁵
T2 - 48h	2,86x10 ⁷
T3 - 72h	5,87x10 ⁷
CV %	5,9

CV%: coeficiente de variação. T0 – refere-se ao tempo zero da medida, logo após aplicação. A umidade da amostra foi referente a capacidade de campo.

Figura 14 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida a simulação da oscilação térmica que ocorre no solo, em quatro momentos distintos



1.4.7 Efeito da umidade do solo na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*

A umidade do solo é fundamental para sobrevivência e multiplicação das bactérias. Estudos mostram que as bactérias morrem rapidamente quando aplicadas em solo seco (Pinto *et al.*, 2023; Prando *et al.*, 2020; Prando *et al.*, 2022; Freire e Vidor, 1971; Munns, 1977; Keyser e Munns, 1979; Vidor, 1981; Morote *et al.*, 1990). Apesar de na literatura ter essa citação, os ensaios foram realizados muito antigamente e essa informação é replicada até hoje sem um estudo atualizado e mais detalhado. A Tabela 14 apresenta a contagem de UFC em função do nível de umidade no solo, 24h e 48h após aplicação da bactéria BJ, em temperatura de 28°C. O valor de 100% da CAD representa a máxima retenção de água no solo, logo, nessa condição ele está em capacidade de campo. A contagem em T0h com 100% da CAD, foi considerada como referência de comparação, já que nessa condição o solo tem umidade ideal para crescimento e a análise microbiológica foi realizada logo após a aplicação das bactérias no solo.

Analisando apenas o tratamento de 100% CAD, é possível observar que houve um crescimento contínuo ao longo do tempo. Na primeiras 24h houve um crescimento muito rápido das bactérias, com aumento de 100 vezes da quantidade inicial em T0h. Após 48h (T48h), elas ainda continuaram em crescimento, porém de forma mais lenta aumentando 10 vezes comparado com o tempo anterior (T24h). Quando a umidade do solo foi reduzida, a taxa de crescimento foi menos expressiva e em alguns casos ocorreu mortalidade. Quando a umidade foi reduzida para 75% da CAD, houve mudança no crescimento da bactéria, mesmo sendo uma redução pequena na umidade. Nessa condição houve crescimento de 10 vezes nas primeiras 24h, inferior à umidade de 100% CAD que foi de 100 vezes. Passadas mais 24h (T48h), não houve crescimento das bactérias, permanecendo estável.

Com a umidade de 50% da CAD, não houve crescimento das bactérias, que permaneceram estáveis por 48h depois de aplicadas. Após 48h, a umidade ideal de 100% da CAD tinha 1000 vezes mais UFC do que a umidade de 50% CAD, valor muito expressivo que impacta na nodulação da cultura alvo. Quando a umidade foi reduzida abaixo de 50% da CAD, nas primeiras 24h elas também permanecem estáveis, porém após 48h ocorreu mortalidade das bactérias, reduzindo em 90% da quantidade inicial.

Isto é de grande importância prática pois mostra que a umidade do solo impacta diretamente na sobrevivência e multiplicação das bactérias, que por consequência irão impactar no desenvolvimento inicial da cultura alvo. Plantio em solo seco causa mortalidade das bactérias e níveis de umidade abaixo do 100% diminuem a taxa de multiplicação. Desta forma, recomenda-se que a bactéria (BJ) deva ser aplicada com solo úmido. Em sequeiro, significa tentar aplicar antecedendo a ocorrência de chuva. Em sistemas irrigados, em que é possível controlar de forma efetiva a umidade do solo, que seja mantida a umidade próximo do ideal pelo maior número de dias possível após a aplicação de BJ.

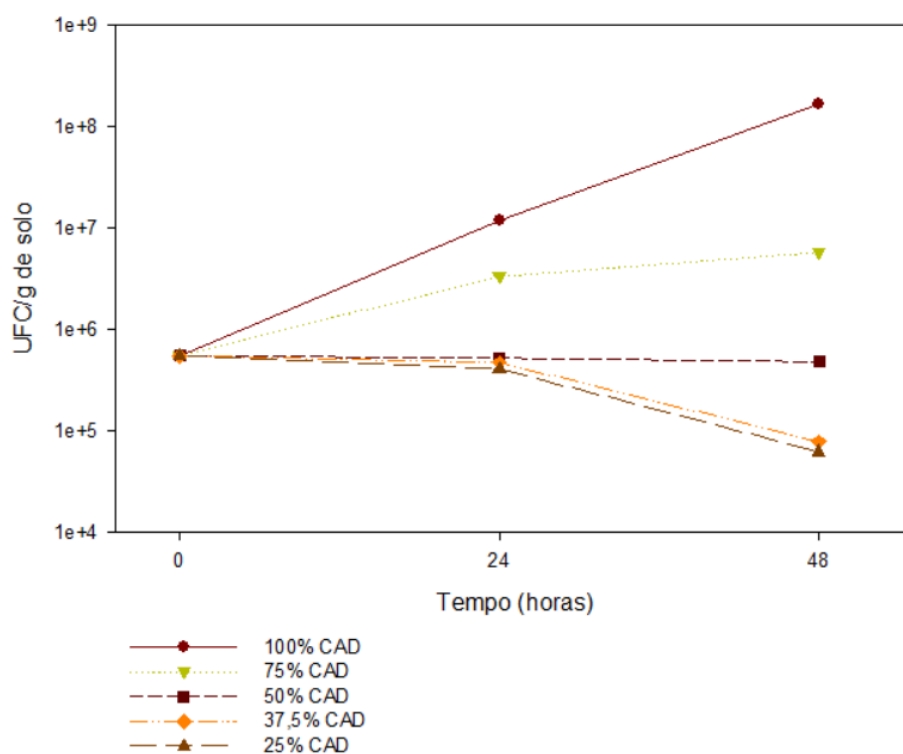
Tabela 14 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida a diferentes umidades do solo, em três momentos distintos

Tratamentos	Contagem T0h	Contagem T24h	Contagem T48h
	----- UFC g ⁻¹ de solo -----		
100% CAD	5,51x10 ⁵	1,20x10 ⁷	1,66x10 ⁸
75% CAD	-	3,34x10 ⁶	5,80x10 ⁶
50% CAD	-	5,23x10 ⁵	4,80x10 ⁵
37,5% CAD	-	4,72x10 ⁵	7,83x10 ⁴
25% CAD	-	4,11x10 ⁵	6,24x10 ⁴
CV % = 19,8			

CV%: coeficiente de variação. CAD: capacidade de água disponível. As amostras foram mantidas a temperatura de 28°C.

A Figura 16, apresenta a evolução das UFCs por grama de solo, nos tempos zero, 24 horas e 48 horas após aplicação, em temperatura controlada de 28°C. É possível notar comportamento linear para a umidade de 100% da CAD, também linear para 75% da CAD porém com ganhos inferiores, visível pelo coeficiente angular menor. Para 50% também ocorre um comportamento linear, porém estavel com coeficiente angular de zero, ou seja, não ocorre acrescimo nem decrescimo com o tempo. Já para 35,5% e 25% da CAD, inicialmente não ocorreu nem crescimento nem mortalidade até as primeiras 24 horas, porém em seguida iniciou-se o decrescimo das UFCs, ou seja, ocorreu mortalidade das bactérias.

Figura 15 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/g) de *Bradyrhizobium japonicum*, submetida a diferentes umidades do solo em três momentos distintos



1.5 Considerações e recomendações gerais

A partir dos ensaios e resultados deste trabalho sugere-se as seguintes recomendações e considerações:

1. A pressão de aplicação de pulverizadores e injetores de linha não impacta nas bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*.
2. Manter as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* pressurizadas por até cinco minutos sob pressão de até 80 m.c.a. não causa mortalidade, com isso viabiliza-se outros métodos de aplicação.
3. Recomenda-se, para as bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, um pH de calda entre 6,0 e 7,0, sendo o ideal próximo de 7,0.
4. Não há problema na mistura entre a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* com o nematicida fungicida, na concentração e doses testadas (nematicida/fungicida sistêmico do grupo químico Benzamida Piramida (FLUOPIRAM - 500g/L))
5. Recomenda-se não misturar a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* com nematicida microbiológico descrito neste trabalho, devido a incompatibilidade e

- consequente mortalidade da bactéria de interesse (nematicida microbiológico (*Bacillus licheniformis*, cepa ATCC 12713 (mínimo de $9,0 \times 10^9$ UFC/g) - 200 g/kg; *Bacillus subtilis*, cepa ATCC 6051 (mínimo de $9,0 \times 10^9$ UFC/g) - 200 g/kg, e *Paecilomyces lilacinus* (*Purpureocillium lilacinum*), cepa: CPQBA 040-11 DRM 10 (mínimo de $9,0 \times 10^8$ UFC/g) - 200 g/kg);
6. Não há problema em misturar a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* com o fertilizante na concentração, fonte e dose aqui testadas (Fertilizante mineral a base de Cobalto – 1% (fonte: sulfato de cobalto), Molibdênio – 12% (fonte: molibdato de sódio) e Níquel – 0,5% (fonte: quelato de níquel), densidade 1,42).
 7. Manter a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em temperatura de 35°C por até 210 minutos e a 40°C por até 50 minutos não causa sua mortalidade. Essa bactéria não deve ser mantida em temperatura acima de 35°C por tempo superior a 50 minutos, pois irá causar grande mortalidade das bactérias.
 8. Recomenda-se a instalação de sensor de temperatura no tanque de injeção de inoculante das semeadoras com visualização na cabine do trator para acompanhamento da temperatura. Quando o valor começar a ultrapassar os 35°C, recomenda-se a parada e/ou reposição da calda.
 9. Recomenda-se não trabalhar com o tanque de inoculantes da semeadora com baixo volume, pois a calda com os inoculantes irá aquecer rapidamente e chegar a temperaturas elevada causando a mortalidade das bactérias. Para aumentar o rendimento sugere-se o uso de tanques com maior capacidade de armazenamento, porém fica a mesma recomendação quando volume estiver baixo.
 10. Não se deve aplicar a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* em solo seco ou com umidade inferior a 50% CAD, pois irá causar a mortalidade das bactérias e por consequência menor nodulação das plantas, gasto com produto e comprometimento da tecnologia. A umidade é o fator mais crítico, seguido pela temperatura.
 11. Em ambientes de produção irrigados fica a recomendação quase obrigatória da manutenção da umidade do solo próximo à capacidade de campo após o plantio e por no mínimo 96 horas, garantindo a máxima taxa de multiplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum*. Sugere-se ao invés de irrigar com lâminas altas e menor frequência, irrigar com lâminas baixas e com maior

frequência para manter úmida a camada superficial onde estão a semente e o inoculante aplicado.

12. Utilizar o produto dentro da data de validade e assegurar seja armazenado em condições favoráveis, protegido dos raios solares.
13. Recomenda-se sempre que adquirido os inoculantes realizar a análise microbiológica para verificar a garantia de UFC do produto e verificar se as bactérias estão vivas.

1.6 Conclusões

Este estudo inédito revelou informações importantes para as bactérias analisadas, modificando recomendações práticas consolidadas, porém obtidas no passado com outras cepas.

A bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* suportaram as pressões de 40, 60 e 80 m.c.a durante cinco minutos de pressurização, além da passagem pelo rotor de bombas hidráulicas em alta rotação.

A mudança do pH da calda para 6,0 ou 8,0, não interferiu na sobrevivência da bactéria *Bradyrhizobium japonicum*. Para o *Azospirillum brasilense* a mudança do pH da calda para 7,0 não interferiu na contagem de UFC, porém a alteração do pH da calda para 8,0 causou a mortalidade de 90% das UFCs.

A bactéria *Bradyrhizobium japonicum* mostrou-se compatível com o nematicida/fungicida químico e com o fertilizante testado neste trabalho, porém mostrou-se incompatível com o nematicida microbiológico adotado, proporcionando 90% de mortalidade das UFCs.

A literatura recomenda entre 28 e 30°C como a temperatura máxima para a bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, e cita que acima desse valor há mortalidade das bactérias. Entretanto, nesse estudo provou-se nas condições de teste que essa bactéria pode permanecer sob a temperatura de 35°C por 210 minutos e de 40°C por até 50 minutos, sem ocorrência de mortalidade.

A oscilação térmica do solo em condição de umidade na capacidade de campo, não causou grandes prejuízos às bactérias, ocorrendo mortalidade nas primeiras 24h

devido ao alto tempo de exposição a temperatura de 40°C, devido ao modelo de ensaio realizado, porém após essa ocasião elas voltaram a se multiplicar. Entretanto, a oscilação térmica junto com o secamento do solo, causou 99,99% de mortalidade.

A umidade do solo influenciou diretamente na sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum*, sendo que o solo com umidade próximo a capacidade de campo proporcionou a melhor condição para sobrevivência e multiplicação das bactérias. O solo com 50% da CAD manteve a população estável, sem multiplicação. Para 37,5% e 25% da CAD, após 48h, 90% das bactérias estavam mortas.

Após 48h, em temperatura de 28°C, a condição com 100% da CAD tinha 100 vezes mais bactérias que a condição de 75% da CAD, 1000 vezes mais que 50% da CAD e 10000 vezes mais UFC que as condições de 37,5 e 25% da CAD.

A umidade do solo foi o principal fator a interferir na sobrevivência das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* no solo, seguida pela temperatura. As duas variáveis em campo interferem de maneira conjunto, porém cabe distinguir duas situações: temperaturas elevadas (acima de 35°C) porém com o solo em capacidade de campo resultam em menor prejuízo ao desenvolvimento das bactérias, que podem se recuperar; temperaturas elevadas e solo com baixa umidade resultam em grande mortalidade das bactérias.

Referências

- ALEXANDRE, G. **Chemotaxis in *Azospirillum***. Em: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Eds.). *Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols*. Knoxville: Springer, 2015.
- BARBOSA, H. M., ALVAREZ, R. D. C. F., LIMA, S. F. D., CORDEIRO, M. A. S., ZANELLA, M. S., & BERNARDO, V. F. **Bradyrhizobium and Azospirillum co-inoculation associated with cobalt and molybdenum application in the soybean crop**. *Ciência Rural*, 53(7), 20210871, 2022.
- 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*, 25(1), 231, 2003.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants**. *Symbiosis*, v. 48, p.154-163, 2009.
- CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Compatibilidade de uso de inoculante e fungicidas no tratamento de sementes de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 32p. (Circular Técnica / Embrapa Soja, ISSN 1516-7860; n.26), 2000.
- CASSÁN, F., CONIGLIO, A., LÓPEZ, G., MOLINA, R., NIEVAS, S., DE CARLAN, C. L. N., ... & MORA, V. **Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond**. *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), 461-479, 2020.
- COSTA, M. R., CAVALHEIRO, J. C. T., GOULART, A. C. P., & MERCANTE, F. M. **Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura**. *Summa Phytopathologica*, 39, 186-192, 2013.
- FERREIRA, E.; NOGUEIRA, A.N.; HUNGRIA, M. **Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes**. Brasília, DF: Embrapa, 165p., 2024.
- FREIRE, J. R. J.; VIDOR, C. **Fatores limitantes dos solos ácidos na simbiose de *Rhizobium* e as leguminosas**. In: DÖBEREINER, J. (ed.). *As leguminosas na agricultura tropical*. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1971. p.211-247.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 9ª ed., 76-170 p., 1994.
- HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S.; SILVA JÚNIOR, E. B.; ZILLI, J. É. **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.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: SEIXAS, C. D. S. et al. (ed.). *Tecnologias de produção de soja*. Londrina: Embrapa Soja, 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17), 2020.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica do nitrogênio**. In: MEYER, M. C. et al. (org.). *Bioninsumos na cultura da soja*. Brasília: Embrapa, cap. 8, p. 141-162, 2022.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologias de inoculação da cultura da soja: mitos, verdades e desafios**. In: KAPPES, C. (ed.). *Boletim de Pesquisa 2019/2020*. Rondonópolis: Fundação MT, p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19), 2019.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; CAMPOS, L. J. M.; MENNA, P.; BRANDI, F.; RAMOS, Y. G. **Seed pre-inoculation with Bradyrhizobium as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems**. *Agronomy Journal*, v. 112, n. 6, p. 5222-5236, 2020. DOI: 10.1002/agj2.20392.
- HUNGRIA, M.; O'HARA, G. W.; ZILLI, J. E.; ARAUJO, R. S.; DEAKER, R.; HOWIESON, J. G. **Isolation and growth of rhizobia**. In: HOWIESON, J. G.; DILWORTH, M. J. (ed.). *Working with rhizobia*. Canberra: ACIAR, p. 39-60, 2016.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. **Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil**. *Field Crops Research*, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. **Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro**. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (ed.). *Biologia dos Solos dos Cerrados*. Embrapa-CPAC, Planaltina, p.189-295, 1997.
- KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N. **Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium, and phosphate**. *Soil Science Society of America Journal*, v.43, n.5, p.519-523, 1979.
- LAMM, R. B.; NEYRA, C. A. **Characterization and cyst production of Azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York**. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 27, n. 12, p. 1320–1325, 1981. DOI: 10.1139/m81-202.
- MARKS, B. B. et al. **Avaliação da sobrevivência de Bradyrhizobium spp em sementes de soja tratadas com fungicidas, protetor celular e inoculante**. *Revista Internacional de Ciências*, 3(1), 43-51, 2013.
- MARONICHE, G. A. et al. **Molecular identification of Azospirillum spp: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpoD as genetic markers**. *Microbiological Research*, v.195, p.1-10, 2017.
- MENDES, I. de C.; JUNIOR, F. B. R.; CUNHA, M. H. da. **20 Perguntas e respostas sobre fixação biológica de nitrogênio**. Embrapa Cerrados, Planaltina -DF, 19p., 2010.

MOROTE, C. G. B. et al. **Melhoria da nodulação da soja pela cobertura do solo e inoculação com *Bradyrhizobium japonicum***. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.14, n.1, p.143-150, 1990.

MUNNS, D. N. **Soil acidity and related factors**. In: VINCENT, J. M. (ed.). *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. University of Hawaii, 1997. p.211-236.

NORRIS, D. O.; DATE, R. A. **Legume bacteriology**. In: SHAW, N. H.; BRYAN, W. W. (ed.). *Tropical pasture research: principles and methods*. Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crop, Hurley, p.134-174, 1976.

OHYAMA, T. et al. **Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization technique to promote nitrogen fixation and seed yield**. *Soybean: The Basis of Yield, Biomass and Productivity*, p.153-185, 2017.

PINTO, D. B. B. et al. **Recovery of *Bradyrhizobium* cells and effects on the physiological quality of soybean seeds sown in dry soil**. *Journal of Seed Science*, v.45, e202345001, 2023.

PRANDO, A. M. et al. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2019/2020 no Paraná**. 2020.

PRANDO, A. M. et al. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2020/2021 no Paraná**. 2022.

PROCÓPIO, S. D. O. et al. **Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum* brasilense**. *Planta Daninha*, 29, 1079-1089, 2011.

RONDINA, A. B. L. et al. **Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum* brasilense or treated with *A. brasilense* exudates**. *Biology and Fertility of Soils*, v.56, p.537-549, 2020.

RONNER, E. et al. **Understanding variability in soybean yield and response to P-fertilizer and rhizobium inoculants on farmers' fields in northern Nigeria**. *Field Crops Research*, v.186, p.133-145, 2016.

SADOWSKY, M. J. **Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation**. In: *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*. Springer, Dordrecht, p. 89–112, 2005.

SAHGAL, M.; JOHRI, B. N. **The changing face of rhizobial systematics**. *Current Science*, v.84, n.1, p.43-48, 2003.

SILVEIRA, B. M. D. E. **Efeitos da inoculação e coinoculação associada à aplicação de micronutrientes na cultura da soja**. 2021.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia**. New York: Springer-Verlag, 450 p., 1994.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. **Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects**. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, n.4, p.487-506, 2000.

TELLES, T. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil**. *Environmental Technology & Innovation*, v.31, 103158, 2023.

VIDOR, C. **Symbiotic dinitrogen fixation**. In: RUSSEL, R. S. E. A. (ed.). *The soil/root system in relation to Brazilian agriculture*. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná/IAPAR, Londrina, p.199-221, 1981.

WILLEMS, A. **The taxonomy of rhizobia: an overview**. *Plant and Soil*, v.287, n.1, p.3-14, 2006.

ZHANG, F.; DASHTI, N.; HYNES, R. K.; SMITH, D. L. **Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures**. *Annals of Botany*, v.77, n.3, p.453-459, 1996.

ZHANG, Y. M. et al. **Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain**. *Applied and Environmental Microbiology*, p.6331-6342, 2011.

ZILLI, J. E. et al. **Influence of fungicide seed treatment on soybean nodulation and grain yield**. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.33, p.917-923, 2009.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO SIMULADA DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA, VIA IRRIGAÇÃO

Caio Nascimento Fernandes^a, João Carlos Cury Saad^a e Vera Lucia Mores Rall^b

^aDepartamento de Engenharia Rural e Socioeconomia, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

^bDepartamento de Genética, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente: Caio Nascimento Fernandes (caionfernandes@hotmail.com)

2.1 Introdução

A soja tem elevado valor comercial, tanto no mercado internacional quanto nacional, sendo a principal oleaginosa cultivada mundialmente e a responsável pela expansão da produção de grãos no Brasil. A produção brasileira se sobressai a cada ano, alcançando 147 milhões de toneladas de grãos em 2024 (Conab, 2024; Landau *et al.*, 2020). No entanto, com a demanda em constante crescimento, torna-se necessário aprimorar a eficiência produtiva para suprir esse mercado.

A busca por técnicas que maximizem o rendimento agrícola é contínua e isso não é diferente para a soja. Essa cultura demanda grande quantidade de nitrogênio para produzir os grãos, sendo necessário em torno de 80 kg de nitrogênio para cada tonelada de soja produzida (Hungria, Mendes e Campo, 2007; Hungria *et al.*, 2020; Hungria *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2020). Caso essa necessidade de nitrogênio fosse suprida completamente por fertilizantes nitrogenados, a produção de soja no Brasil seria inviável economicamente, já que, com base na produtividade, a demanda total

de nitrogênio por hectare ficaria entre 240 e 480 kg. Entretanto, graças ao desenvolvimento biotecnológico, selecionaram-se bactérias capazes de fornecer grande parte do nitrogênio para a planta, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Zuffo *et al.*, 2019), proporcionando uma economia financeira de 17 bilhões de dólares por ano e preservação ambiental, por reduzir a emissão na atmosfera de mais de 200 milhões de toneladas de gases de efeito estufa (Hungria e Nogueira, 2022; Telles *et al.*, 2023; Costa, 2023).

A simbiose entre bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e as plantas é a responsável pela FBN. Nesse processo, formam-se nódulos radiculares, onde essas bactérias captam o nitrogênio atmosférico (N₂) e, por meio de processos enzimáticos, o convertem em compostos nitrogenados assimiláveis pela planta. Em troca, a planta as nutre e oferece abrigo para sua sobrevivência (Prando *et al.*, 2022; Hungria e Nogueira, 2020; Hungria e Nogueira, 2022; Hungria *et al.*, 2015).

O processo de aplicação dessas bactérias é denominado inoculação. Essa aplicação pode ser realizada via semente, em que o inoculante é misturado às sementes, devendo ser utilizado no prazo máximo de 24 horas. Essa forma vem sendo menos utilizada devido à dificuldade na mistura dos inoculantes e também à menor eficiência, já que há contato direto com fungicidas e inseticidas (Zuffo *et al.*, 2019).

A forma mais comum atualmente é via sulco de plantio, em que o inoculante é aplicado no momento da semeadura, diretamente na abertura do sulco para deposição da semente (Zibiane *et al.*, 2023; Hungria *et al.*, 2007; Vieira Neto *et al.*, 2008). Outra modalidade de aplicação que vem sendo estudada é via pulverização, empregada principalmente quando há falhas na inoculação via sulco ou como reforço para intensificar a nodulação (Zibiane *et al.*, 2023; Zilli *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2022).

Em conjunto com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, outros microrganismos também são utilizados no momento do plantio, cada um oferecendo benefícios distintos à cultura. A aplicação de *Azospirillum brasilense* associada ao *Bradyrhizobium* tem se mostrado eficaz, uma vez que o *Azospirillum* produz fitormônios que estimulam o desenvolvimento das raízes, favorecendo maior exploração de água e nutrientes, além de potencializar a infecção pelo *Bradyrhizobium*. Essa prática é conhecida como co-inoculação e deve ser realizada

anualmente para garantir o pleno potencial produtivo, devido à especificidade das bactérias envolvidas (Hungria *et al.*, 2020; Hungria e Nogueira, 2020; Santos *et al.*, 2019; Silveira, 2021; Hungria *et al.*, 2015).

O processo de inoculação gera um ganho médio de produtividade de 8%, enquanto a co-inoculação pode proporcionar aumentos de até 16%, ou seja, o dobro da inoculação com apenas *Bradyrhizobium* (Hungria *et al.*, 2013; Hungria *et al.*, 2007; Hungria e Nogueira, 2019).

A presença dessas bactérias nos sistemas de produção é fundamental, porém sua sobrevivência e estabelecimento no solo são diretamente influenciados por fatores edafoclimáticos (Campo *et al.*, 2009; Zilli *et al.*, 2009). Condições ambientais e características do solo, como temperatura, pH, umidade, fertilidade, matéria orgânica e salinidade, afetam significativamente essas bactérias (Hungria *et al.*, 2017; Ohyama *et al.*, 2017; Ronner *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 1996; Sadowski, 2005; Zhang *et al.*, 2011).

A temperatura ideal para a sobrevivência das bactérias e para o adequado processo de nodulação é de aproximadamente 25 °C. Temperaturas abaixo de 15 °C reduzem a atividade ou até mesmo inibem a ação das bactérias. Por outro lado, temperaturas superiores a 30–35 °C podem inviabilizar sua sobrevivência e diminuir a nodulação (Sadowski, 2005; Zhang *et al.*, 1996; Prando *et al.*, 2022; Galletti *et al.*, 1971; Figueiredo *et al.*, 1995).

Quando os inoculantes são aplicados via semente, é necessário redobrar os cuidados devido ao contato direto das bactérias com produtos químicos. Além disso, a aplicação de herbicidas para controle de plantas daninhas também pode interferir negativamente na nodulação. Arruda *et al.* (2001) avaliaram diferentes doses de sulfentrazone e observaram que, conforme aumenta a quantidade do ingrediente ativo, ocorre redução na nodulação.

A umidade do solo é um importante fator no processo de nodulação da soja e no processo da FBN. O estresse hídrico afeta diretamente a atividade da enzima nitrogenase, dificulta o processo de fixação de nitrogênio e diminui a produção da leghemoglobina (Hungria e Vargas, 2000; King e Purcell, 2005; Sinclair *et al.*, 2007; Sadowski, 2005). A baixa umidade pode influenciar na sobrevivência das bactérias no

solo, em sua multiplicação, o que impacta diretamente o processo de nodulação e fixação biológica de N.

Com base nisso, a técnica da irrigação pode ser uma alternativa para a aplicação dos inoculantes pois garante níveis adequados de umidade do solo, proporciona redução na temperatura do solo e gera um microclima favorável para o desenvolvimento das culturas e dos microrganismos.

2.2 Hipótese e objetivos

A primeira hipótese desta pesquisa é que a aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, na cultura da soja, de forma superficial, simulando sistema de irrigação por aspersão é mais eficiente que os métodos atuais proporcionando maior sobrevivência das bactérias devido às condições favoráveis de aplicação, refletindo em maior rendimento de grãos. A segunda hipótese é de que a combinação dose de bactéria e época de aplicação interfere na eficiência do processo de nodulação e na produtividade.

O objetivo desta pesquisa foi determinar a melhor combinação envolvendo forma, dose e época de aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na cultura da soja, avaliando a sobrevivência das bactérias e os componentes de produção, em condição de cultivo protegido.

2.3 Material e Métodos

2.3.1 Localização da área de estudo

O experimento foi conduzido entre novembro de 2023 e março de 2024 em uma casa de vegetação, localizada no Departamento de Solos e Recursos Ambientais da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, SP, Brasil (22°50'48"S, 48°26'6"O, a 813m acima do nível do mar).

A casa de vegetação é constituída por uma estrutura de aço galvanizado revestida por vidros nas laterais e no teto. Possui dois exaustores e uma estrutura alveolada para controle interno da temperatura e umidade de acordo com a

necessidade. A temperatura máxima definida foi de 32°C; quando o controlador identificava valor superior os exaustores eram acionados.

2.3.2 Descrição, obtenção e procedência dos inoculantes

Os produtos comerciais utilizados, denominados RHIZOTROP 2 e AZOTROP, possuem concentração mínima de 7×10^9 UFC/mL de *Bradyrhizobium japonicum* (BJ) (SEMA 5079 e 5080) e 2×10^8 UFC/mL de *Azospirillum brasilense* (AB) (Ab-V5 e Ab-V6), respectivamente. A dosagem recomendada para cultura da soja é de 300 mL por hectare no tratamento via sulco para o RHIZOTROP 2 e 300 mL por hectare em área total para o AZOTROP. O produto foi obtido da empresa Biotrop, com sede em Vinhedo, SP, Brasil.

2.3.3 Cultivar de soja, preparo do solo e condições de cultivo

A cultivar utilizada foi a Brasmax Zeus IPRO, por ser muito empregada na região produtora de soja próximo a Botucatu, sede do experimento e pelo plantio ser recomendado na época de instalação do experimento. É uma cultivar com hábito de crescimento indeterminado, grupo de maturação 5.5, possui alto potencial produtivo, índice de ramificação médio e duração média de ciclo de 120 dias.

Foi utilizado solo de textura média, classificado como Latossolo Vermelho distrófico (Santos *et al.*, 2018), proveniente de área sem histórico de cultivo agrícola. As análises química e física, estão apresentadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Características químicas do solo corrigido antes da implantação do experimento analisado de 0 a 0,2 m de profundidade

pH	M.O.	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----							
5,0	7	2	0	15	0,2	10	9	19	35	56
Enxofre		Boro	Cobre		Ferro	Manganês		Zinco		
----- mg dm ⁻³ -----										
58		0.17	0.3		7	0.3		0.1		

Tabela 2 - Caracterização física do solo utilizado

Areia Total	Argila	Silte	Textura do Solo
-----g kg ⁻¹ -----			
767	174	59	Média

Realizou-se a solarização como alternativa para desinfecção do solo e redução da carga microbiana (Patrício *et al.*, 2005) com objetivo de reduzir o efeito de rizóbios nativos sobre a nodulação das plantas que não fossem da cepa adicionada. Para isso, o solo foi colocado dentro a estufa, umedecido e coberto com um plástico transparente, permanecendo nessa condição durante 20 dias.

Os dados de temperatura e umidade relativa do ar no interior da casa de vegetação foram coletados através de um datalogger durante todo período do experimento. Foi instalado um sistema de irrigação do tipo gotejamento para irrigação de todos os vasos. A tensão de água no solo limite para irrigação foi de 30kPa e, quando atingido esse valor, ocorria a irrigação visando elevar a umidade para a condição de capacidade de campo.

Para condução do experimento foram utilizados vasos com diferentes volumes. O primeiro modelo, com 25 litros de capacidade, foi utilizado para conduzir as plantas até o final do ciclo, permitindo pleno desenvolvimento das plantas. Já o segundo modelo, com 3 litros de capacidade, foi utilizado para conduzir as plantas por apenas trinta dias, para avaliação das raízes e nodulação, segundo o protocolo do MAPA, facilitando a lavagem das raízes devido o menor volume, porém sem comprometimento do crescimento radicular.

2.3.4 Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 5 x 3 + 3, com quatro repetições (Tabela 3). O primeiro fator refere-se às doses do inoculante Rhizotrop 2 (composto pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, responsável pela nodulação da cultura da soja), sendo cinco doses avaliadas: 0 mL ha⁻¹, 300mL ha⁻¹, 600mL ha⁻¹, 900mL ha⁻¹ e 1500mL ha⁻¹. O segundo fator refere-se a três diferentes épocas de aplicação do inoculante, sendo: logo após o plantio e junto

à irrigação de germinação; no estágio VE (cotilédone acima da superfície do solo); e no estágio VC (cotilédone totalmente aberto; início da formação da folha primária). Além dos fatores citados, foram implementados três tratamentos adicionais: um com aplicação de N mineral na dose de 200kg/ha; um com inoculação via semente; e um com inoculação via sulco o mais adotado na atualidade.

O experimento teve 18 tratamentos, distribuídos em 72 vasos de 25 litros e 64 vasos de 3 litros. Os vasos menores foram utilizados para análise de raízes aos 30 DAE, para facilitar a retirada e limpeza do material. Sua quantidade é menor já que a dose zero não precisa estar em todas as combinações do fatorial.

Tabela 3 - Delineamento experimental

Fator 1 – Dose de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (mL ha⁻¹)	Fator 2 – Estádio fenológico
0 mL ha ⁻¹	Logo após o plantio
300 mL ha ⁻¹	VE (cotilédone acima da superfície do solo)
600 mL ha ⁻¹	VC (cotilédone totalmente aberto; início da formação da folha primária)
900 mL ha ⁻¹	
1500 mL ha ⁻¹	
Tratamentos Adicionais	
N mineral 200kg/ha	
Inoculação via semente	
Inoculação via sulco	

A Tabela 4 apresenta a combinação dos fatores e as dosagens para cada tratamento.

Tabela 4 - Descrição das combinações dos fatores do delineamento experimental

Descrição dos Tratamentos
Dose zero de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (BJ) e <i>Azospirillum brasilense</i> (AB)
Dose 300 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB - fase plantio
Dose 300 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
Dose 300 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VC
Dose 600 mL ha ⁻¹ de (BJ) + 300 mL ha ⁻¹ de (AB) - fase plantio
Dose 600 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
Dose 600 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VC
Dose 900 mL ha ⁻¹ de (BJ) + 300 mL ha ⁻¹ de (AB) - fase plantio
Dose 900 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
Dose 900 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VC
Dose 1500 mL ha ⁻¹ de (BJ) + 300 mL ha ⁻¹ de (AB) - fase plantio
Dose 1500 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
Dose 1500 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VC
Tratamentos Adicionais
N mineral 200kg/ha
Inoculação via semente – 240 mL para cada 50 kg de semente para BJ e 100 mL para cada 50 kg de semente para AB
Inoculação via sulco – 300 mL ha ⁻¹ de BJ e AB

Todos os tratamentos receberam a dose fixa de 300mL ha⁻¹ de *Azospirillum brasilense*. As doses de inoculante foram compostas apenas pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum* por ser a responsável pela nodulação da soja. Além disto, o *Azospirillum brasilense* já apresenta dose comercial para área total e seu uso em doses excessivas proporciona efeitos negativos ao desenvolvimento das plantas, devido a elevada produção de fito hormônios que, ao invés de estimular o desenvolvimento das culturas, podem prejudicá-lo (Prando *et al.*, 2022; Prando *et al.*, 2024)

Com base na análise química do solo, corrigiu-se a acidez, fosforo, potássio e magnésio. Para acidez utilizou-se calcário dolomítico, com garantia mínima de 36% CaO, 15,8% MgO e PRNT 90%, visando elevar a saturação por bases (V%) a 70%

segundo a metodologia de V% estabelecida por Raij et al. (1996). Após receber o corretivo, o solo permaneceu incubado por trinta dias com umidade mantida a 70% da capacidade de campo, sob lona plástica preta.

Após o período de incubação, foram aplicados 150 mg dm^{-3} de fósforo (P) sendo 50% na forma de termofosfato e 50% na forma de superfosfato simples, 113 mg dm^{-3} de potássio (K) na forma de cloreto de potássio, visando elevar o teor para $3,0 \text{ mmolc dm}^{-3}$ e 12 mg dm^{-3} de magnésio (Mg) na forma de sulfato de magnésio com objetivo de elevar o teor a $8,0 \text{ mmolc dm}^{-3}$. Aplicou-se o sulfato de Mg a parte devido o fornecimento de Mg pelo calcário não ser suficiente para atingir o mínimo de $8,0 \text{ mmolc/dm}^3$.

2.3.5 Semeadura e aplicação dos tratamentos

O plantio foi realizado no dia 23 de novembro de 2023, adicionando oito sementes por vaso a uma profundidade de 3 centímetros. Após germinação foi realizado o desbaste, mantendo-se três plantas por vaso nos vasos de 25 litros e duas plantas por vaso nos de três litros.

Imediatamente após o plantio, foram aplicados os tratamentos correspondentes ao estágio logo após o plantio, simulando uma irrigação de germinação. A lâmina de irrigação adotada foi de 10mm, sendo que o volume de água e a quantidade de inoculante para cada vaso foram calculados com base na área de cada vaso. Como a quantidade de inoculante a ser colocada em cada vaso foi muito pequena ($0,0029 \text{ mL}$ para o vaso de 25L e $0,000603 \text{ mL}$ para o vaso de 3L, referente a dose 300 mL ha^{-1}), preparou-se uma calda de 20 litros e dessa calda retirou-se o volume necessário para cada vaso. A aplicação foi manual, adicionando toda a calda de forma superficial no vaso, simulando uma irrigação por aspersão. Entre as aplicações de cada dose, realizou-se a tríplice lavagem do recipiente para evitar contaminações, além da ordem de aplicação ser sempre de forma crescente, reduzindo ainda mais a possibilidade de contaminação dos tratamentos. A dosagem do inoculante foi feita utilizando uma micropipeta variável para garantir a precisão na dosagem. As duas bactérias foram adicionadas na calda e aplicadas simultaneamente.

Para a aplicação via semente, realizou-se o tratamento das sementes com o inoculante líquido na dosagem de 150mL para cada 50 kg de semente. Já para o tratamento via sulco (Figura 1), a quantidade de inoculante para cada vaso foi calculada com base na aplicação via sulco em campo, tendo a relação do volume de inoculante por metro linear. Como são aplicados 300 mL ha⁻¹ de inoculante e como 1,0 hectare de soja com espaçamento de 0,45m entre linhas tem 22.222 metros lineares, obtém-se 0,0135 mL de inoculante por metro linear. As sementes foram dispostas no vaso e foi medido o comprimento total em função da disposição do plantio. A partir disso calculou-se a quantidade de inoculante por vaso e aplicou-se utilizando micropipeta variável.

Figura 1 - Sulco de semeadura para aplicação dos inoculantes



O tratamento com N mineral recebeu 50% da dose no momento do plantio e os outros 50% quinze dias após germinação. Todos os tratamentos sem inoculantes receberam o mesmo manejo hídrico que os demais.

Os estádios VE e VC ocorreram aos 7 dias após o plantio (DAP) e aos 10 DAP, respectivamente, estádios em que foram aplicados os respectivos tratamentos, da mesma maneira como explicado na aplicação de plantio.

2.3.6 Tratos culturais

Aos 20 DAP foi realizada uma aplicação foliar, em todos os vasos, com cobalto, molibdênio e níquel, através do produto comercial Viridian CoMo + Ni (1,0 % Co, 12% Mo e 0,5% Ni), na dosagem de 250mL ha⁻¹.

Ao longo do ciclo foram realizadas quatro aplicações com defensivos. Uma aplicação de Deltametrina e uma de Tiametoxam + Piretroide para controle de insetos e uma aplicação de Piraclostrobina + Fluxapiroxade e uma de Estrobirulina + Pirazol carboxamida + cetona para controle de fungos.

2.3.7 Avaliações morfológicas

2.3.7.1 Comprimento das plantas e diâmetro de caule

O comprimento das plantas foi obtido com o auxílio de uma fita métrica, medindo-se desde o nível do solo até o ápice das plantas. Já o diâmetro de caule foi medido na altura de inserção do cotilédone através de um paquímetro digital. Ambas medidas foram realizadas na maturação fisiológica (120 DAE) e nos vasos de 25 litros, nas três plantas de cada vaso.

2.3.7.2 Número de ramos, número de nós e número de vagens

Na ocasião de maturidade fisiológica (120 DAE) foram contados o número de nós no ramo central, sendo considerado um nó toda inserção de um trifólio (JOHNSON, 1997). O número de ramos foi contado no caule central nas três plantas de cada vaso de 25 litros. O número de vagens foi determinado contando todas as vagens das plantas.

2.3.7.3 Massa de grãos por planta e produtividade

Após a colheita das plantas (120 DAE) dos vasos de 25 litros, foi realizada a separação entre grãos e vagens visando determinar a massa de grãos por planta e a produtividade.

2.3.7.4 Massa seca de parte aérea e raiz

Aos 35 dias após emergência (DAE) foi realizado o corte das plantas dos vasos de 3 litros de capacidade, para análise foliar e radicular. As raízes foram separadas da parte aérea no ponto de inserção do cotilédone e posteriormente lavadas. A parte aérea e raízes foram acondicionados, separadamente, em sacos de papel e secos em estufa a 65°C até massa constante. Finalizada a secagem, os materiais foram pesados em balança de precisão.

2.3.8 Avaliações bioquímicas

2.3.8.1 Índice SPAD

A estimativa do conteúdo de clorofila via unidade SPAD foi realizada utilizando um clorofilômetro portátil (SPAD-502, Minolta Corporation, Ramsey, NJ, EUA). Este índice foi obtido nos estádios V3, R2, R3 no terço inferior da planta, R3 no terço médio / superior da planta, R5 no terço inferior da planta e R5 no terço médio / superior da planta, a partir da média de três pontos em três folhas distintas.

2.3.9 Análise química das plantas

2.3.9.1 Análise de nitrogênio na folha diagnose

Para cultura da soja a coleta da folha diagnose para análise química deve ser realizada quando as plantas estiverem em pleno florescimento, estágio equivalente ao R1. Nesse estágio coletou-se o terceiro trifólio a partir do ápice da planta (MALAVOLTA et al., 1997), nos vasos de 25 litros.

2.3.9.2 Quantidade de macro e micronutrientes na parte aérea

Aos 35 DAE, fase de pleno florescimento, as plantas dos vasos de 3 litros foram colhidas para análise de matéria seca e acúmulo de macro e micronutrientes na parte aérea. Após a coleta das plantas, estas foram lavadas em água corrente e em água deionizada. Posteriormente, as plantas foram levadas à estufa a 65°C até massa

constante. Após a secagem das amostras, foram pesadas e moídas para serem encaminhadas para análise química determinando-se os teores de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Mn e Zn, conforme metodologia desenvolvida por Malavolta et al. (1997).

Com base no resultado do teor de nutrientes e na massa de matéria seca foi calculada a quantidade / acúmulo de cada nutriente nas plantas, em g planta⁻¹, utilizando-se a equação 1:

$$\text{Quantidade de nutriente} = \frac{\text{teor (g kg}^{-1}\text{)} \times \text{massa de matéria seca (g planta}^{-1}\text{)}}{1000 \text{ (g kg}^{-1}\text{)}}$$

2.3.10 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, referentes aos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa Agroestat (BARBOSA e MALDONADO JUNIOR, 2015)

2.4 Resultados e Discussão

A discussão dos dados com base na literatura atual é reduzida pois este é um estudo inovador, já que é a primeira vez que é realizada a aplicação de *Bradyrhizobium* via irrigação por aspersão. Portanto, esse trabalho será base para discussão de novas pesquisas que venham a ser realizadas.

A Tabela 5 apresenta os componentes biométricos avaliados nas plantas de soja. As variáveis diâmetro de caule, número de ramos e número de nós não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos, nem interação entre os fatores. De forma geral, essas variáveis apresentaram média de 6,65 mm para o diâmetro de caule, 3,0 ramos por planta e 11,0 nós por planta. Nota-se a baixa ramificação das plantas, característica da cultivar empregada, assim para a cultivar ZEUS é fundamental garantir a população mínima para atingir altas produtividades. Apesar da baixa ramificação, o número de nós está dentro da faixa ideal para altas produtividades, reforçando a necessidade de garantir o estande para essa cultivar.

O comprimento de plantas (cm) foi significativo para o fator doses de *Bradyrhizobium japonicum* (BJ), sendo que todas as doses foram superiores a dose zero, porém entre as doses que continham a bactéria BJ não houve diferença. É importante observar que essa cultivar possui um porte mediano, porém com grande número de nós como discutido anteriormente, que no final é onde irá formar as vagens e os grãos, por isso é fundamental estruturar a planta para que esses componentes de produção respondam em rendimento.

Tabela 5 - Comprimento das plantas de soja (cm), diâmetro de caule (mm), número de ramos, número de nós e número de vagens por planta aos 120 DAE, em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.

Tratamentos	Comprimento das Plantas (cm)	Diâmetro de Caule (mm)	Número de Ramos por Planta	Número de Nós por Planta	Número de Vagens por Planta
0 mL ha ⁻¹	57,50 b	6,45	2,75	11,00	42,75 b
300 mL ha ⁻¹	63,00 a	6,63	3,41	10,58	47,66 a
600 mL ha ⁻¹	64,67 a	6,91	2,91	10,83	46,50 ab
900 mL ha ⁻¹	65,00 a	7,07	3,08	11,00	46,16 ab
1500 mL ha ⁻¹	62,60 a	6,43	3,08	10,58	46,50 ab
Plantio	63,05 ^{ns}	6,6	2,8	10,85	46,45 ^{ns}
VE	62,25 ^{ns}	6,68	3,05	10,95	46,05 ^{ns}
VC	62,35 ^{ns}	6,82	3,30	10,60	45,25 ^{ns}
N mineral	64,50 ^{ns}	6,70	2,50	11,00	45,75 ^{ns}
Semente	62,75 ^{ns}	6,27	2,50	10,75	42,50 ^{ns}
Sulco	65,50 ^{ns}	6,25	3,00	10,50	47,75 ^{ns}
Média geral	62,83	6,65	3,00	11,00	45,81
CV%	6,8	7,6	19,0	7,6	7,7

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

Para o número de vagens, houve diferença somente para o fator dose, sendo a dose 300 mL ha⁻¹ superior a dose zero, porém não diferente das demais. Em geral as plantas foram compostas por 46 vagens por planta, número superior à média para se obter produtividade em torno de 85 sacas/ha. Quanto maior o número de vagens maior será o número de grãos (Vaz Bisneta *et al.*, 2015) e maior será a produtividade. Essa variável é uma das principais que compõem o rendimento final (Zambiazzi *et al.*,

2017). Cada nó foi composto, em média, por 4,2 vagens, sendo muito superior à média para soja que fica entre 1 e 2 vagens por nó. Paraginski et al. (2024), avaliando os componentes de produção de diversas cultivares, obtiveram em média 1,3 vagens por nó para a cultivar ZEUS.

A Tabela 6 traz a massa de grãos por planta, em gramas/planta, e a produtividade em sacas por hectare. A cultivar Zeus pode atingir altas produtividades, chegando a mais de 100 sacas por hectare. Estudos demonstram produtividades entre 60 e 137 sc/ha (Harms E Waureck, 2024; Tonatto et al., 2022). Para a massa de grãos por planta e produtividade, houve diferença para o fator dose, sendo a dose 300 mL ha⁻¹ superior a dose zero, porém não diferenciou das demais e entre os tratamentos adicionais, em que a inoculação via sulco foi superior a inoculação via semente e ao nitrogênio mineral. Apesar de não haver diferença entre as doses que continham o inoculante (todas exceto a dose zero), esse resultado demonstra a importância da inoculação na produtividade da soja. O fato de realizar a inoculação proporcionou em média 20 sc/ha a mais que o tratamento dose zero e 10 sc/ha a mais que o fertilizante mineral.

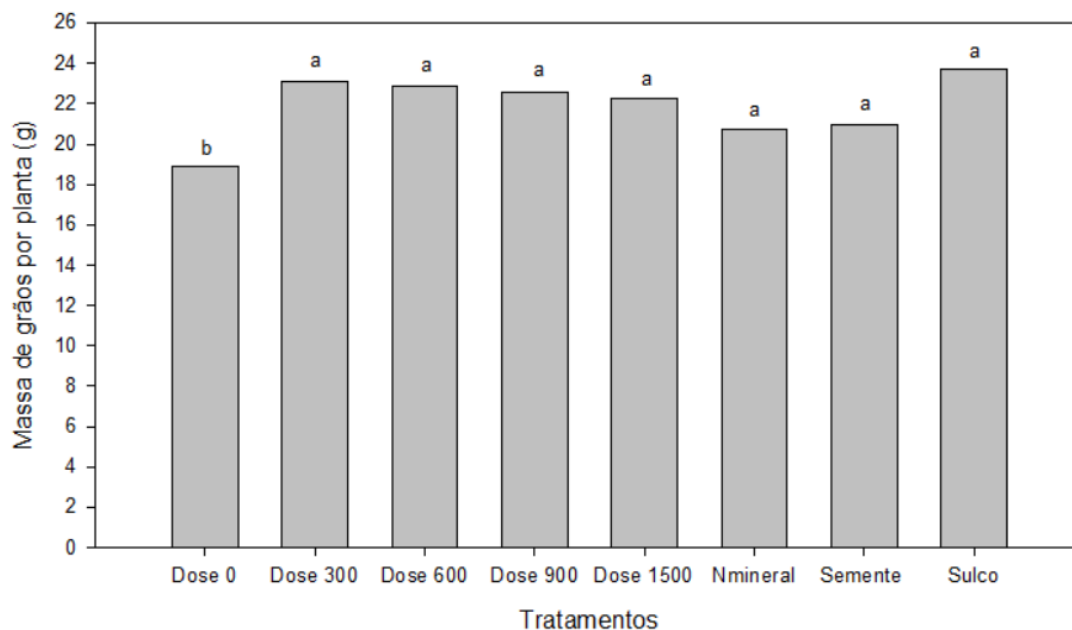
Tabela 6 - Massa de grãos por planta (g) e produtividade (sacas/hectare) aos 120 DAE, em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria

Tratamentos	Massa de grãos por planta (g/planta)	Produtividade (sacas/ha)
0 mL ha ⁻¹	18,90 b	91,00 b
300 mL ha ⁻¹	23,11 a	111,34 a
600 mL ha ⁻¹	22,90 a	110,34 a
900 mL ha ⁻¹	22,57 a	108,75 a
1500 mL ha ⁻¹	22,25 a	107,13 a
Plantio	21,65 ^{ns}	104,30 ^{ns}
VE	22,19 ^{ns}	106,83 ^{ns}
VC	22,00 ^{ns}	106,01 ^{ns}
Nmineral	20,72 b	99,85 b
Semente	20,97 b	101,12 b
Sulco	23,70 a	114,10 a
Média geral	21,92	105,6
CV%	6,9	6,9

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

A Figura 2 expressa graficamente os dados de massa de grãos por planta, em gramas.

Figura 2- Massa de grãos por planta (g planta^{-1}), em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.



Os resultados de massa seca da parte área e da raiz estão apresentados na Tabela 7. Não houve diferença entre as doses e as épocas, somente entre os tratamentos adicionais, sendo o N mineral superior.

Tabela 7 - Massa seca da parte aérea (g/planta) e massa seca de raiz (g/planta) aos 120 DAE, em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria

Tratamentos	Massa seca parte aérea (g/planta)	Massa seca raiz (g/planta)
0 mL ha ⁻¹	2,51	5,87
300 mL ha ⁻¹	2,55	6,89
600 mL ha ⁻¹	2,59	8,30
900 mL ha ⁻¹	2,53	6,97
1500 mL ha ⁻¹	2,66	6,44
Plantio	2,62	6,92
VE	2,55	6,77
VC	2,54	7,00
Nmineral	4,06 a	10,30
Semente	3,15 b	8,08
Sulco	3,13 b	7,67
Média Geral	2,71	7,19
CV%	15,6	19,5

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância.

O índice SPAD (Tabela 8) foi significativo para as doses em todos os estádios fenológicos, exceto em V3. Em todas as fases, exceto no R5 superior, os tratamentos que continham inoculante na dose, foram superiores a dose zero, em média 4,5 unidades SPAD, indicando que as plantas estavam mais verdes, ou seja, a clorofila estava mais pronunciada, devido ao maior fornecimento de nitrogênio pelas bactérias.

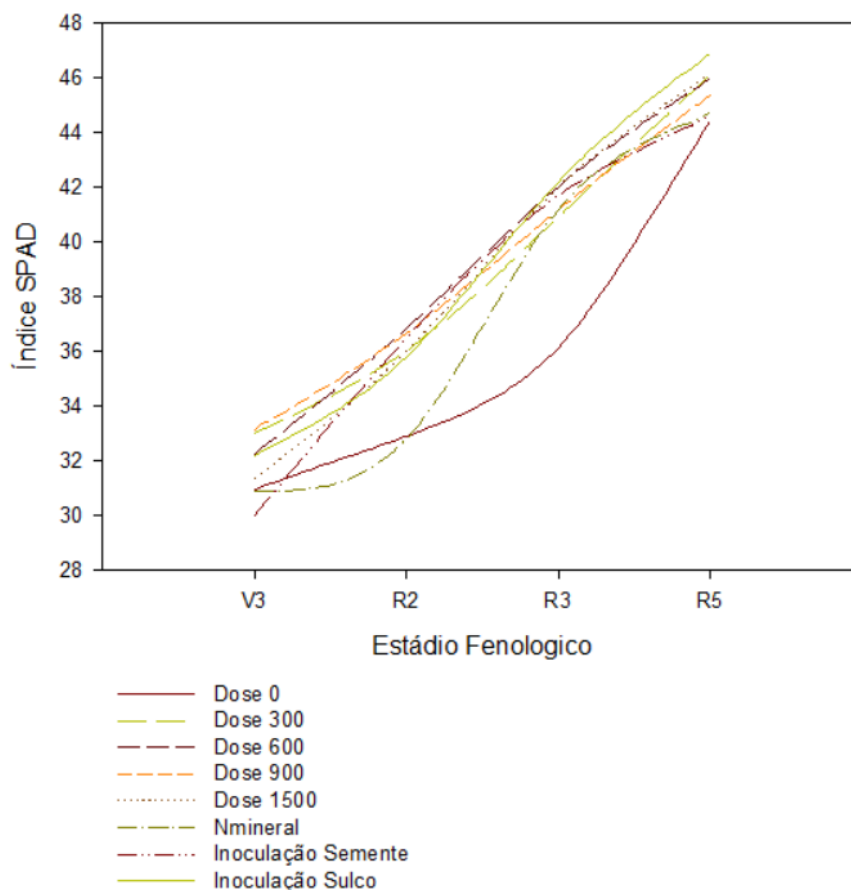
Tabela 8 - Índice SPAD nos estádios fenológicos V3, R2, R3 na parte inferior da planta, R3 na parte superior da planta, R5 na parte inferior da planta e R5 na parte superior da planta, em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria

Tratamentos	Índice SPAD V3	Índice SPAD R2	Índice SPAD - R3 Inferior	Índice SPAD - R3 Superior	Índice SPAD - R5 Inferior	Índice SPAD - R5 Superior
0 mL ha⁻¹	30,95	32,90 b	29,05 b	36,12 b	24,72 b	44,42 b
300 mL ha⁻¹	33,54	36,22 a	35,25 a	40,27 a	29,16 a	46,07 ab
600 mL ha⁻¹	32,23	36,00 a	34,40 a	41,90 a	30,92 a	46,36 a
900 mL ha⁻¹	33,38	37,00 a	36,70 a	41,40 a	30,06 a	45,4 ab
1500 mL ha⁻¹	32,41	36,82 a	35,90 a	42,53 a	32,62 a	46,24 a
Plantio	32,37	36,32	34,19	39,79	28,69	45,34
VE	32,45	35,93	34,48	41,15	30,30	46,28
VC	32,70	35,12	34,09	40,39	29,51	46,49
Nmineral	30,87	32,80 b	32,75	41,17	27,50	44,72
Semente	30,02	36,50 a	33,66	41,72	23,32	44,60
Sulco	32,17	35,80 ab	32,47	42,25	23,20	46,90
Média geral	32,25	35,66	34,03	40,65	28,70	45,65
CV%	7,9	5,0	9,7	7,5	11,3	3,4

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância.

A Figura 3, traz de forma gráfica a estimativa do conteúdo de clorofila via unidade SPAD. É possível notar que na dose zero, ou seja, sem aplicação das bactérias, o índice SPAD ficou abaixo dos demais tratamentos em todas as fases, sendo mais significativo até R3. Os ganhos para esse tratamento foram de 6,3% de V3 para R2, 9,8% de R2 para R3 e 23,0% de R3 para R5, enquanto os ganhos foram, de forma geral para os outros tratamentos, 11% de V3 para R2, 14% de R2 para R3 e 10% de R3 para R5.

Figura 3- Índice SPAD em função do estágio fenológico e das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.



A Figura 4 apresenta a estimativa do conteúdo de clorofila via unidade SPAD para as doses e tratamentos adicionais em todas as fases avaliadas e porções da planta. Essa figura apresenta uma informação importante a ser observada, o “nível de verde/clorofila” no baixeiro das plantas, representado pelo índice SPAD. Foram realizadas medidas desse índice em dois estádios fenológicos, R3 e R5, fase de formação das vagens e enchimento de grãos, respectivamente. Pela Figura 5, é possível observar que a demanda por nitrogênio a partir de R3 se eleva rapidamente e atinge pico em R5. Nesse período é comum que parte das folhas do baixeiro da planta tenha sido perdida por doenças ou, em casos de baixa nutrição com N, que ocorra translocação do N das folhas velhas para as novas na parte superior, já que é um nutriente móvel na planta. Para atingir altas produtividades é fundamental que isso não ocorra, ou seja, quanto mais tempo as folhas mais velhas permanecerem viáveis, melhor será o aporte de nutrientes para a planta e posteriormente para formação das

vagens e grãos. Diante disso, analisando a Figura 4, podemos observar, na fase R3 Inferior, que a dose zero possui um índice muito inferior aos demais tratamentos. Como esse tratamento não recebeu a bactéria BJ, responsável pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) e nenhuma adição de fertilizante nitrogenado, sua nutrição com N foi deficiente, ocasionando a translocação do N das folhas inferiores para as superiores, confirmado pelo índice SPAD. Outra observação é que os tratamentos que continham a bactéria BJ aplicada de forma simulada a uma irrigação por aspersão apresentaram três unidades SPAD a mais que os tratamentos de N mineral, inoculação via semente e sulco, de forma geral.

Quando analisado o estágio R5 inferior, essa diferença fica mais evidente. Os tratamentos que receberam a bactéria BJ de forma simulada a uma irrigação por aspersão conseguiram manter níveis maiores de clorofila na parte baixa da planta.

Figura 4- Índice SPAD em função do estágio fenológico das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.

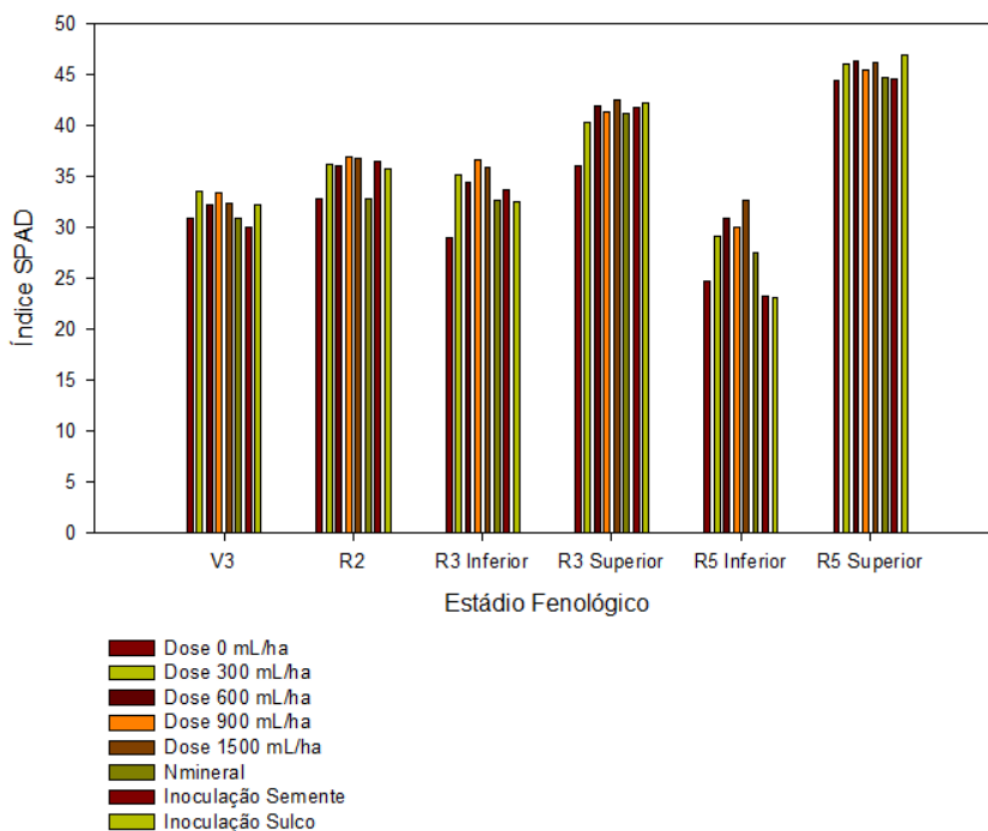
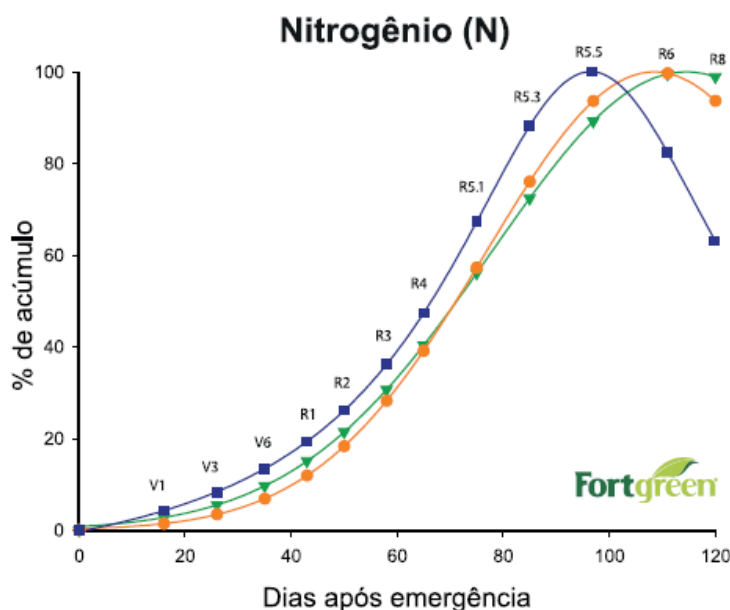


Figura 5- Curva de absorção de nitrogênio para as cultivares BRS 184, SYN 1059 e DM 6563 – Intacta RR2 PRO de soja (OLIVEIRA JUNIOR, et al., 2016)



A Tabela 9, apresenta o teor de nitrogênio na folha diagnose. Houve diferença para o fator doses, sendo que a dose zero foi inferior às demais. Para soja, o teor foliar de N é classificado como deficiente ou baixo quando o teor está inferior a 36,8 g/kg, caso da dose zero e suficiente valores entre 36,8 e 46,9 g/kg, caso das demais doses (Kurihara et al., 2008).

Tabela 9 - Teor de nitrogênio na folha diagnose, em g/kg, no pleno florescimento, em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.

Tratamentos	Teor de N folha diagnose (g/kg)
0 mL ha ⁻¹	29,03 b
300 mL ha ⁻¹	37,22 a
600 mL ha ⁻¹	38,09 a
900 mL ha ⁻¹	36,42 a
1500 mL ha ⁻¹	37,26 a
Plantio	35,18
VE	35,72
VC	35,92
Nmineral	36,00
Semente	35,00
Sulco	34,00
Média Geral	35,50
CV%	13,3

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância.

Para o acúmulo de macro e micronutrientes (Tabela 10), não houve diferença estatística para as doses e épocas, apenas para os tratamentos adicionais. Para os casos que houve diferença entre os adicionais o maior acúmulo foi para o N mineral.

Tabela 10 - Acúmulo de macro e micronutrientes na parte aérea, em g/planta, em função das doses de *Bradyrhizobium japonicum* aplicada via superfície, simulando irrigação por aspersão e épocas de aplicação dessa bactéria.

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Mn	Zn
	----- g/planta -----								
0 mL ha ⁻¹	0,087	0,0073	0,066	0,036	0,013	0,006	0,17	0,13	0,10
300 mL ha ⁻¹	0,094	0,0073	0,062	0,035	0,013	0,007	0,19	0,13	0,10
600 mL ha ⁻¹	0,096	0,0075	0,062	0,034	0,013	0,007	0,18	0,12	0,10
900 mL ha ⁻¹	0,096	0,0078	0,061	0,035	0,013	0,007	0,18	0,12	0,10
1500 mL ha ⁻¹	0,103	0,0079	0,064	0,036	0,014	0,007	0,2	0,12	0,10
Plantio	0,097	0,0075	0,062	0,036	0,014	0,007	0,19	0,13	0,10
VE	0,095	0,0078	0,067	0,036	0,013	0,007	0,19	0,12	0,10
VC	0,093	0,0074	0,060	0,034	0,013	0,007	0,17	0,12	0,10
Nmineral	0,160 a	0,011 a	0,084	0,051	0,022 a	0,011	0,29 a	0,23 a	0,12
Semente	0,123 b	0,009 b	0,080	0,041	0,015 b	0,009	0,22 b	0,15 b	0,11
Sulco	0,120 b	0,009 b	0,077	0,040	0,015 b	0,009	0,22 b	0,15 b	0,11
Média Geral	0,101	0,0079	0,07	0,037	0,014	0,0074	0,19	0,13	0,10
CV%	8,3	11,5	16,2	16,6	16,2	18,5	14,8	18,5	15,6

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de significância. NS: não significativo.

2.5 Conclusões

As épocas de aplicação não diferiram para os componentes biométricos e fisiológicos, nem para rendimento e nutrição da soja. No entanto, recomenda-se a aplicação dos inoculante logo no plantio, para permitir a multiplicação das bactérias.

As doses de inoculante diferiram da dose zero para o comprimento das plantas, número de vagens, massa de grãos, índice SPAD e teor de nitrogênio na folha diagnose. Recomenda-se a aplicação da dose de 300 mL ha⁻¹ por ser a mais econômica.

A aplicação da bactéria BJ de forma simulada a irrigação por aspersão, independente da dose, proporcionou maior conteúdo de clorofila via unidade SPAD na parte inferior das plantas nos estádios R3 e R5 e maior manutenção das folhas nessa porção, já que como a planta foi bem nutrida por N pelas bactérias, não houve a necessidade de translocar esse nutriente para as partes superiores.

Este trabalho confirma a importância da inoculação da cultura da soja, assim como outros trabalhos na literatura, já que a não aplicação das bactérias que realizam a FBN influencia negativamente no desenvolvimento e rendimento da cultura.

Os resultados mostraram que a aplicação dos inoculantes de forma simulada a irrigação por aspersão é viável, visto que as plantas apresentaram desenvolvimento e rendimento satisfatórios.

Referências

- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, A. M. **Nodulação e fixação de nitrogênio em soja tratada com sulfentrazone**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330, 2001.
- BARBOSA, J. C.; MALDONADO J., W. **AgroEstat: sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Jaboticabal, FCAV/UNESP. 396p, 2015.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants**. Symbiosis, v. 48, p.154-163, 2009
- CONAB, C. N. DE A. **Acompanhamento da safra brasileira 2023/2024**. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2023/2024, 2024.
- COSTA, M. M. M. N. **Fixação biológica de nitrogênio: uma revisão**. Documentos 293. Campina Grande: EMBRAPA. 2023.
- FIGUEIREDO, M. D. V. B., BALATTI, A. P., DE FRANÇA, F. P., & BURITY, H. A. **Sobrevivência do Bradyrhizobium sp. quando submetido a diferentes temperaturas de Crescimento**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1233-1238, 1995.
- GALLETTI, P., FRANCO, A. A., AZEVÊDO, H., & DÖBEREINER, J. **Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja anual**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1-8, 1971.
- HARMS, K. L., DE ARAUJO, T. G., & WAURECK, A. **Influência da densidade de semeadura nas características agrônômicas e produtividade de cultivares de soja (Agronomia)**. Repositório Institucional, 2(2), 2024.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283), 2007.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Dordrecht: Springer, p.25-42, 2005.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. de C. (ed.). Tecnologias de produção de soja. Londrina: Embrapa Soja, 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17), 2020.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica do nitrogênio**. In.: MEYER, M.C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; da SILVA, J. C.(org.). Bioninsumos na cultura da soja. Brasília: EMBRAPA, cap. 8. p. 141-162, 2022.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologias de inoculação da cultura da soja: mitos, verdades e desafios**. In: KAPPES, C. (Ed.). Boletim de Pesquisa 2019/2020. Rondonópolis: Fundação MT, p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19), 2019.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and Azospirilla: strategies to improve sustainability**. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; CAMPOS, L. J. M.; MENNA, P.; BRANDI, F.; RAMOS, Y. G. **Seed pre-inoculation with Bradyrhizobium as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems**. *Agronomy Journal*, [S.L.], v. 112, n. 6, p. 5222-5236, 22 set. 2020. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/agj2.20392>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. **Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing**. *African Journal of Agricultural Research*, Sapele, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 2015.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. **Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil**. *Field Crops Research*, Dordrecht, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.

JOHNSON, S.R. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, and Cooperative Extension Service, 18p. (Special Report n.53), 1997.

KING, C. A.; PURCELL. **Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids**. *Plant Physiology*, Rockville, v. 137, n. 2, p. 1389-1396, 2005.

KURIHARA, C. H., VENEGAS, V. H. A., NEVES, J. C. L., NOVAIS, R. F. D., & STAUT, L. A. **Faixas de suficiência para teores foliares de nutrientes em algodão e em soja, definidas em função de índices DRIS**. *Revista Ceres*, 60, 412-419, 2013.

LANDAU, E. C., SILVA, G. A., MOURA, L., HIRSCH, A., & GUIMARÃES, D. P. **Dynamics of agricultural production and the natural landscape in Brazil in recent decades: Products of plant origin (2^a ed)**. Embrapa, 2020.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. DE. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 319p. 1997.

OHYAMA, T.; TEWARI, K.; ISHIKAWA, S.; TANAKA, K.; KAMIYAMA, S.; ONO, Y.; HATANO, S.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; HASEGAWA, H.; SATO, T.; TANABATA, S.; NAGUMO, Y.; FUJITA, Y.; TAKAHASHI, Y. **Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization technique to promote nitrogen fixation and seed yield**. *Soybean: The Basis of Yield, Biomass and Productivity*, [s. l.], p. 153-185, 2017.

OLIVEIRA JUNIOR, A. D., CASTRO, C. D., PEREIRA, L. R., DOMINGOS, C. D. S., LEONARDO RÉGIS PEREIRA, F., & CLEYTON DA SILVA DOMINGOS, F. **Estádios fenológicos e marcha de absorção de nutrientes da soja**, 2016.

PARAGINSKI, J. A., MORAES, M. P., SOUZA, R. R. D., MELLO, A. D. C., & TOEBE, M. **Correlation between productive components and grain yield of soybean cultivars sown in the northwest region of Rio Grande do Sul**. *Revista Ceres*, 71, e71017, 2024.

- PATRÍCIO, F.R.A., ALMEIDA, I.M.G., SANTOS, A.S., CABRAL, O., TESSARIOLI NETO, J., SINIGAGLIA, C., BERIAM, L.O.S., RODRIGUES NETO, J. **Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum***. Fitopatol. Bras. 30, 475–481, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000500003>.
- PRANDO, A. M., DE OLIVEIRA, A. B., POSSAMAI, E., REIS, E., NOGUEIRA, M., HUNGRIA, M., ... & CONTE, O. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2020/2021 no Paraná**. 2022.
- PRANDO, A. M., DE OLIVEIRA, A. B., POSSAMAI, E., REIS, E., NOGUEIRA, M., HUNGRIA, M., ... CARNEVALLI, R. A. **Coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra 2023/2024 no Paraná**. 2024.
- RAIJ, B. CANTARELA, H., QUAGGIO, J. A., FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2.ed. Campinas: IAC, 285p. Boletim Técnico, 100, 1996
- RONNER, E.; FRANKE, A. C.; VANLAUWE, B.; DIANDA, M.; EDEH, E.; UKEM, B.; BALAF, A.; HEERWAARDENA, J.VAN.; GILLER, K. E. **Understanding variability in soybean yield and response to P-fertilizer and rhizobium inoculants on farmers' fields in northern Nigeria**. Field Crops Research, Heidelberg, v. 186, p. 133-145, 2016.
- SADOWSKY, M.J. **Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation**. In Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment (D. Werner and W. E. Newton, eds.), pp. 89–112. 2005. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- SANTOS M. S.; NOGUEIRA M.A.; HUNGRIA M. **Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture**. AMB Expr 9:205. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.
- SANTOS, H.G., JACOMINE, P.K.T., ANJOS, L.H.C., OLIVEIRA, V.A., LUMBRERAS, J.F., COELHO, M.R., ALMEIDA, J.A., ARAÚJO-FILHO, J.C., OLIVEIRA, J.B., CUNHA, T.J.F. **Sistema brasileiro de classificação de solos, fifth ed**. Embrapa Solos, Brasília, Brazil, 2018
- SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. de C. (Ed.). **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17).
- SILVEIRA, Bruno Marcelo Dorneles. **Efeitos da inoculação e coinoculação associada a aplicação de micronutrientes na cultura da soja**. 2021
- SINCLAIR, T. R.; PURCELL, L. C.; KING, C. A.; SNELLER, C. H.; CHEN, P.; VADEZ, V. **Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation**. Field Crops Research, v. 101, n. 1, p. 68-71, 2007.
- SOUSA, W. S.; TEIXEIRA, I. R.; CAMPOS, T. S.; SILVA, G. C.; SILVA, M. B.; MOREIRA, S. G. **Supplementary reinoculation in topdressing of *Rhizobium tropici* in common bean crop: effects on nodulation, morphology, and grain yield**. Journal of Plant Nutrition, v. 45, e20, 2021.
- TEIXEIRA, I. R.; LOPES, P. R.; SOUSA, W. S.; SILVA, G. C. **Response of common bean to rhizobium reinoculation in topdressing**. Revista Brasileira de Engenharia

Agrícola e Ambiental, v. 26, n. 4, p. 274-282, 2022. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v26n4p274-282

TELLES, T. S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. **Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil**. Environmental Technology & Innovation, Amsterdã, v. 31, p. 103158, 2023.

TONATTO, M., ZDZIARSKI, A. D., MEIRA, D., PANHO, M. C., ZANELLA, R., MENEGAZZI, C. P., ... & BENIN, G. **Yield potential of modern soybean cultivars under high and low input levels**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 57, e02852, 2022.

VAZ BISNETA, M., DUARTE, J. B., MELLO FILHO, O. L., ZITO, R. K., RODRIGUES, J. S., CARVALHO JUNIOR, E. M., & ALVARENGA, W. B. **Correlação entre componentes de produção em soja como função de tipo de crescimento e densidade de plantas**. In: Proceedings of the VII congresso brasileiro de soja. Embrapa Soja, Florianópolis. p. 659-661, 2015.

VIEIRA NETO, S. A., PIRES, F. R., MENEZES, C. C. E. D., MENEZES, J. F. S., SILVA, A. G. D., SILVA, G. P., & ASSIS, R. L. D. **Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 32, 861-870, 2008.

WELLBURN, A.R. **The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution**. J. Plant Physiol. 144, 307–313. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2), 1994.

ZAMBIAZZI, E. V.; BRUZI, A. T.; ZUFFO, A. M.; SOARES, I. O.; MENDES, A. E. S.; TERESANI, A. L. R.; RAONI G.; CARVALHO, J. P. S.; MOREIRA, S. G. **Desempenho agrônomico e qualidade sanitária de sementes de soja em resposta à adubação potássica**. Revista de Ciências Agrárias, v. 40, n. 3, p. 543-553, 2017.

ZHANG, F.; DASHTI, N.; HYNES, R. K.; SMITH, D. L. **Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [Glycine max (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at sub optimal root zone temperatures**. Annals of Botany, Oxford, v. 77, n. 3, p. 453-459, 1996.

ZHANG, Y.M.; LI, Y.; CHEN, W.F.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; LI, Q.Q.; ZHANG, Y.Z.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. **Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain**. Applied and Environmental Microbiology, Washington, p. 6331-6342, 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00542-11>.

ZIBIANI, Renan Mariano et al. **Inoculação com Bradyrhizobium via Sulco de Plantio e Formas de Aplicação de Cobalto e Molibdênio na Cultura da Soja de Segundo Ano**. Ensaios e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde, v. 27, n. 2, p. 197-203, 2023.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Inoculação de Bradyrhizobium em soja por pulverização em cobertura**. Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v. 43, n. 4 p. 541-544, 2008.

ZUFFO, A.M.; STEINER, F.; BUSCH, A.; SANTOS, D.M.S. **Adubação nitrogenada na soja inibe a nodulação e não melhora o crescimento inicial das plantas.** Revista de Agronegócio e Meio Ambiente, v. 12, n.2, p. 333-349, 2019.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DAS BACTÉRIAS *Bradyrhizobium japonicum* E *Azospirillum brasilense* NA CULTURA DA SOJA, VIA SISTEMA DE IRRIGAÇÃO POR ASPERSÃO

Caio Nascimento Fernandes^a, Ricardo Rabelo de Arruda Filho^a, Tatiane Cristovam Ferreira^a, João Carlos Cury Saad^a e Vera Lucia Mores Rall^b

^aDepartamento de Engenharia Rural e Socioeconomia, Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

^bDepartamento de Genética, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu, SP, Brasil.

Autor correspondente: Caio Nascimento Fernandes (caionfernandes@hotmail.com)

3.1 Introdução

A soja possui grande valor comercial internacional e nacional, sendo a principal oleaginosa cultivada em todo o mundo e a responsável pela expansão na produção de grãos no Brasil. A produção brasileira se destaca ano após ano, com produção de 147 milhões de toneladas de grãos em 2024 (Conab, 2024; Landau *et al.*, 2020), porém, com o aumento contínuo de sua demanda, é necessário aumentar a eficiência produtiva para atender esse mercado.

A busca por técnicas que maximizem o rendimento agrícola é contínua, e isso não é diferente para a soja. Essa cultura demanda grande quantidade de nitrogênio para produzir os grãos, sendo necessário em torno de 80 kg de nitrogênio para cada tonelada de soja produzida (Hungria, Mendes e Campo, 2007; Hungria *et al.*, 2020; Hungria *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2020). Caso essa necessidade de nitrogênio fosse suprida completamente por fertilizantes nitrogenados, a produção de soja no Brasil

seria inviável economicamente, já que, com base na produtividade, a demanda total de nitrogênio por hectare ficaria entre 240 e 480 kg. Entretanto, graças ao desenvolvimento biotecnológico, selecionaram-se bactérias capazes de fornecer grande parte do nitrogênio para a planta, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Zuffo *et al.*, 2019), proporcionando uma economia financeira de 17 bilhões de dólares por ano e preservando o ambiente, por reduzir a emissão na atmosfera de mais de 200 milhões de toneladas de gases de efeito estufa (Hungria e Nogueira, 2022; Telles *et al.*, 2023; Costa, 2023).

A simbiose entre as bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e as plantas é a responsável pela FBN. Neste processo, são formados nódulos radiculares, onde essas bactérias captam o nitrogênio atmosférico (N₂) e, através de processos enzimáticos, o convertem em compostos nitrogenados assimiláveis pela planta. Em contrapartida, a planta nutre e fornece abrigo para a sobrevivência delas (Prando *et al.*, 2022; Hungria e Nogueira, 2020; Hungria e Nogueira, 2022; Hungria *et al.*, 2015).

O processo de aplicação dessas bactérias é chamado de inoculação. Essa aplicação pode ser feita via semente, onde o inoculante é misturado junto às sementes e deve ser aplicado no prazo máximo de 24 h. Essa forma vem caindo em desuso devido à dificuldade de mistura dos inoculantes e também à menor eficiência, pois ficam em contato direto com fungicidas e inseticidas (Zuffo *et al.*, 2019).

A forma mais adotada é via sulco de plantio, onde o inoculante é injetado no momento do plantio, na abertura do sulco da semeadora, para deposição da semente (Zibiane *et al.*, 2023; Hungria *et al.*, 2007; Vieira Neto *et al.*, 2008). Outra forma de aplicação que vem sendo testada é via pulverização, empregada principalmente quando ocorre algum problema com a inoculação via sulco ou como reforço para aumentar a nodulação (Zibiane *et al.*, 2023; Zilli *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2022).

Em conjunto com a bactéria *Bradyrhizobium*, são utilizados outros microrganismos no momento do plantio, cada um trazendo um benefício diferente para a cultura. A aplicação de *Azospirillum brasilense* em conjunto com o *Bradyrhizobium* mostrou-se eficiente, visto que o *Azospirillum* produz fitormônios estimulando a formação de raízes, o que proporciona maior exploração por água e nutrientes e pode incrementar a infecção pelo *Bradyrhizobium*. Essa prática é denominada co-

inoculação e deve ser realizada todos os anos para garantir o potencial produtivo, visto a especificidade das bactérias (Hungria *et al.*, 2020; Hungria e Nogueira, 2020; Santos *et al.*, 2019; Silveira, 2021; Hungria *et al.*, 2015). O processo de inoculação proporciona ganhos médios de 8% de produtividade, enquanto a co-inoculação proporciona ganhos de 16%, o dobro da inoculação com somente *Bradyrhizobium* (Hungria *et al.*, 2013; Hungria *et al.*, 2007; Hungria e Nogueira, 2019).

A presença dessas bactérias nos ambientes de produção é essencial, porém sua sobrevivência e estabelecimento são diretamente influenciados por fatores edafoclimáticos (Campo *et al.*, 2009; Zilli *et al.*, 2009). Fatores ambientais e do solo, como temperatura, pH, umidade, fertilidade, matéria orgânica e salinidade (Hungria *et al.*, 2017; Ohya *et al.*, 2017; Ronner *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 1996; Sadowski, 2005; Zhang *et al.*, 2011) afetam diretamente essas bactérias.

A temperatura ideal para sobrevivência das bactérias e para que a nodulação ocorra de forma adequada é de 25 °C. Temperaturas inferiores a 15 °C causam diminuição da atividade ou até mesmo inibição das bactérias. Já temperaturas acima de 30–35 °C podem causar inviabilidade das bactérias e reduzir a nodulação (Sadowski, 2005; Zhang *et al.*, 1996; Prando *et al.*, 2022; Galletti *et al.*, 1971; Figueiredo *et al.*, 1995).

A aplicação dos inoculantes via semente requer cuidado redobrado devido ao contato das bactérias com produtos químicos. A aplicação de herbicidas para controle de plantas daninhas também pode influenciar na nodulação. Arruda *et al.* (2001) avaliaram doses de sulfentrazone na nodulação e concluíram que a nodulação diminui com o aumento da dose do ingrediente ativo.

A umidade do solo é um fator importante no processo de nodulação da soja e no processo da FBN. O estresse hídrico afeta diretamente a atividade da enzima nitrogenase, dificulta o processo de fixação de nitrogênio e diminui a produção da leghemoglobina (Hungria e Vargas, 2000; King e Purcell, 2005; Sinclair *et al.*, 2007; Sadowski, 2005). A baixa umidade pode influenciar na sobrevivência das bactérias no solo e em sua multiplicação, impactando diretamente o processo de nodulação e a fixação biológica de N.

Desta forma, a técnica da irrigação pode ser uma forma alternativa de aplicação de inoculantes pois garante níveis adequados de umidade do solo, proporciona

redução na temperatura do solo e um microclima favorável para o desenvolvimento das culturas e dos microrganismos.

3.2 Hipótese e objetivos

A hipótese desta pesquisa é que a aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, na cultura da soja, via sistema de irrigação por aspersão proporciona maior sobrevivência das bactérias devido às condições favoráveis de aplicação e, com isso, aumenta o rendimento e a nodulação, além de melhorar os componentes biométricos e nutricionais da cultura.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar se a aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, via sistema de irrigação por aspersão é mais eficiente que o método usual via sulco e se proporciona efeitos positivos na produtividade, nos componentes biométricos e bioquímicos e na nutrição da soja.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Localização da área de estudo

O experimento foi conduzido entre novembro de 2024 e março de 2025 em área de campo, localizada no Departamento de Engenharia Rural e Socioeconomia da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, SP, Brasil (22°51'9"S, 48°25'46"O à 772m acima do nível do mar).

Essa área foi escolhida por não apresentar, durante seis anos, nenhum registro de cultivo de nenhuma cultura leguminosa, permanecendo apenas *Brachiaria* como cobertura. Essa característica é importante pois é esperado baixa população de rizóbios nativos já que não houve inoculação e nenhuma cultura leguminosa que poderia propiciar o aumento da população dessas bactérias.

3.3.2 Descrição, obtenção e procedência dos inoculantes

Os produtos comerciais utilizados, denominados RHIZOTROP 2 e AZOTROP, possuem concentração mínima de 7×10^9 UFC/mL de *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) e 2×10^8 UFC/mL de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), respectivamente. A dosagem recomendada para cultura da soja é de 300 mL por hectare (5 doses de 60mL) no tratamento via sulco para o RHIZOTROP 2 e 300 mL por hectare em área total para o AZOTROP. O produto foi obtido da empresa Biotrop, com sede em Vinhedo, SP, Brasil.

3.3.3 Cultivar de soja, preparo do solo e condições de cultivo

A cultivar utilizada foi a Brasmax Zeus IPRO, por ser muito empregada na região produtora de soja próximo a Botucatu, sede do experimento e pelo plantio ser recomendado na época de instalação do experimento. É uma cultivar com hábito de crescimento indeterminado, grupo de maturação 5.5, possui alto potencial produtivo, índice de ramificação médio e duração média de ciclo de 120 dias.

O solo foi classificado como Latossolo Vermelho distrófico ((Santos *et al.*, 2018), de textura argilosa, sem histórico recente de cultivo. A análises química e física, após a correção, estão apresentadas na Tabela 1 e 2.

Foi realizada a descompactação do solo, através do uso de um escarificador. Em seguida, com base na análise química do solo, corrigiu-se a acidez utilizando calcário dolomítico, com garantia mínima de 36% CaO, 15,8% MgO e PRNT 90%, visando elevar a saturação por bases (V%) a 70% segundo a metodologia de V% estabelecida por Raij *et al.* (1996), 60 dias antes do plantio. O calcário foi incorporado com uma grade intermediária e posteriormente o solo foi nivelado com uma grade leve.

Tabela 1 - Características químicas do solo corrigido antes da implantação do experimento analisado de 0 a 0,2 m de profundidade

pH	M.O. CaCl ₂ g dm ⁻³	P _{resina} mg dm ⁻³	Al ³⁺ -----	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V%
5,5	17	21	0	27	4,4	57	27	89	116	77
Enxofre			Boro		Cobre		Ferro		Manganês	
-----			-----		-----		-----		-----	
12			0,27		6,3		26		21,8	
									1,7	

Tabela 2 - Caracterização física do solo utilizado

Areia Total	Argila	Silte	Textura do Solo
-----	-----	-----	
518	393	89	Argilosa

Foi instalado um sistema fixo de irrigação por aspersão em toda área do experimento. Os aspersores foram instalados a um metro de altura para proporcionar uma irrigação uniforme em todos os tratamentos. A variação de pressão ficou abaixo de 10%, muito inferior aos 20% utilizado como critério de projeto, indicando que se trata de um sistema uniforme.

O manejo da irrigação foi realizado com base em tensiômetros automáticos instalados na área de cultivo (Figura 1). A tensão crítica foi de 35kPa (MARCELINO et al., 2003), momento em que se realizava a irrigação visando elevar a umidade para a condição de capacidade de campo. Foram instalados três tensiômetros em camadas distintas, sendo 0-0,2m, 0,2-0,4m e 0,4-0,6m.

Figura 1 - Vista dos tensiômetros automáticos, em três profundidades, para manejo da irrigação



Em torno do experimento foi instalada uma cerca elétrica com dois fios a 15 e 35cm do solo para evitar a entrada de animais, principalmente lebre, predominante na área experimental.

3.3.4 Tratamentos e delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 2 com quatro repetições (Tabela 3). O primeiro fator refere-se às doses do inoculante Rhizotrop 2 (composto pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, responsável pela nodulação da cultura da soja), sendo quatro doses avaliadas, a saber: 0 mL ha⁻¹; 300 mL ha⁻¹; 600 mL ha⁻¹ e 900 mL ha⁻¹. O segundo fator refere-se a duas diferentes épocas de aplicação do inoculante, sendo: logo após o plantio, junto à irrigação de germinação; e no estágio VE (cotilédone acima da superfície do solo). Além dos fatores foram implementados dois tratamentos adicionais: aplicação de N

mineral na dose de 200 kg/ha; inoculação via sulco, o método de aplicação mais adotado na atualidade. Desta forma, o experimento envolveu 10 tratamentos e 40 parcelas experimentais (Tabela 4).

Tabela 3 - Delineamento experimental

Fator 1 – Dose de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (mL ha ⁻¹)	Fator 2 – Estádio fenológico
0 mL ha ⁻¹	Logo após o plantio
300 mL ha ⁻¹	VE (cotilédone acima da superfície do solo)
600 mL ha ⁻¹	
900 mL ha ⁻¹	
Tratamentos Adicionais	
N mineral 200 kg/ha	
Inoculação via sulco	

Tabela 4 - Descrição detalhada dos tratamentos

Descrição dos Tratamentos
Dose 0 mL ha ⁻¹ de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (BJ) + 0 mL ha ⁻¹ de <i>Azospirillum brasilense</i> (AB)
300 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase plantio
300 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
600 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase plantio
600 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
900 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase plantio
900 mL ha ⁻¹ de BJ + 300 mL ha ⁻¹ de AB – fase VE
N mineral 200 kg/ha
Inoculação via sulco – 300 mL ha ⁻¹ de BJ e AB

Todos os tratamentos receberam a dose de 300mL ha⁻¹ de *Azospirillum brasilense*. As doses de inoculante foram compostas apenas pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum*, uma vez que ela é a responsável pela nodulação da soja. Além disto, o *Azospirillum brasilense* já apresenta dose em área total e seu uso em doses excessivas proporciona efeitos negativos ao desenvolvimento das plantas devido a elevada produção de fito hormônios, que ao invés de estimular o desenvolvimento das culturas, podem prejudicá-lo (Prando et al., 2022; Prando et al., 2024).

Cada parcela foi composta por quatro linhas de soja, espaçadas a 0,5m entre si, com 2,0m de largura e 7,0m de comprimento, totalizando 14m². As duas linhas laterais foram consideradas bordaduras, além de um metro de borda nas cabeceiras. Entre uma parcela e outra, na direção do comprimento, foi deixado um metro de bordadura para evitar contaminação na aplicação dos tratamentos. Todas as análises, inclusive a colheita, foram realizadas nas duas linhas centrais da parcela.

3.3.5 Semeadura e aplicação dos tratamentos

Uma semana antes do plantio foi realizada a aplicação de 60 kg ha⁻¹ de K₂O (com a fonte cloreto de potássio) em mistura com 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (com a fonte superfosfato triplo), via semeadora de fluxo contínuo, com espaçamento entre linhas de 0,2m.

O plantio foi realizado dia 18 de novembro de 2024, utilizando semeadora a vácuo, com espaçamento entre linhas de 0,5m e regulagem para garantir estande final de 320.000 plantas. Na adubação de semeadura empregou-se 50 kg ha⁻¹ de K₂O e 50 kg ha⁻¹ de P₂O₅, através do fertilizante formulado 0-20-20.

Após o plantio foi realizada a pulverização mecanizada com herbicida pré-emergente do grupo químico Sulfentraozona para garantir o controle inicial de plantas daninhas e em conjunto de 2,0 kg ha⁻¹ de boro.

Para aplicação dos tratamentos foi construída uma estrutura de madeira do tamanho da parcela, com uma borda plástica de um metro de altura para evitar deriva e contaminação das demais parcelas. Nas laterais foram instalados aspersores do tipo escamoteável spray de alta eficiência para aplicação da calda (Figura 2). Uma caixa

d'água foi colocada em uma carreta móvel, junto de uma motobomba de 1,0 CV e um gerador para deslocamento entre as parcelas para aplicação dos devidos tratamentos (Figura 3). Todo esse aparato foi montado para realizar uma aplicação o mais próximo do real possível e com a menor possibilidade de contaminação entre os tratamentos.

A Figura 2 apresenta também o ensaio de uniformidade do sistema de irrigação, para indicar a qualidade da irrigação para aplicação dos tratamentos. O coeficiente de uniformidade de Christiansen (CUC) foi de 86,4%.

Figura 2 - Estrutura para aplicação dos tratamentos via irrigação por aspersão e ensaio de uniformidade do sistema



Figura 3 - Estrutura para aplicação dos tratamentos via irrigação por aspersão e sistema móvel para injeção da calda, composto por uma bomba d'água, gerador e caixa d'água



Foi definida uma lâmina de irrigação pós plantio de 10mm. Como a área da parcela era conhecida, foi possível calcular o volume de água necessário para ser aplicado em cada parcela, assim a mesma quantidade de água era adicionada na caixa d'água em todas as aplicações. Junto a água da caixa adicionou-se a dose dos inoculantes referente a cada tratamento, foi feita a homogeneização da calda e realizada sua aplicação.

Logo após o plantio, realizou-se a aplicação dos tratamentos correspondentes à época imediatamente após o plantio, sendo a irrigação de germinação (Figura 2). Para os tratamentos que não continham a bactéria foi aplicada somente água e para o tratamento com N mineral, 50% da dose do fertilizante foi diluído na caixa e aplicado da mesma maneira.

Aos 8 DAP as plantas encontravam-se em estágio VC (Figura 4), momento em que foi realizada a aplicação dos tratamentos restantes, referentes a época do referido estágio.

Aos 35 DAE foi aplicado, manualmente a lanço, os 50% da dose restante do N mineral em seu respectivo tratamento.

Figura 4 - Aplicação dos tratamentos no estágio fenológico VC



3.3.6 Tratos culturais

Aos 15 DAE foi realizada uma fertirrigação em área total com 2,5 kg/ha de manganês, 250 g/ha de molibdênio e 1,0 kg/ha de boro através do sistema de irrigação por aspersão utilizado para irrigar toda área.

Aos 16 DAE foi realizada uma pulverização com cobalto, molibdênio e níquel, através do produto comercial Viridian CoMo + Ni (1,0 % Co, 12% Mo e 0,5% Ni), na dosagem de 250mL ha⁻¹.

Aos 25 DAE foi complementada a dose de potássio aplicando via fertirrigação, 20 kg/ha de K₂O, com a fonte cloreto de potássio branco.

Ao longo do ciclo foram realizadas quatro aplicações de fungicida utilizando de forma alternada os grupos químicos triazolinona + estrobilurina e carboxamida + triazol + estrobilurina e quatro aplicações de inseticida utilizando de forma alternada os grupos químicos piretróide e neonicotinoide + lambdacialotrina.

O controle das plantas daninhas foi realizado manualmente e ao final do ciclo para dessecação de colheita foi utilizado glufosinato de amônio.

3.3.7 Avaliações morfológicas

3.3.7.1 Comprimento das plantas

O comprimento das plantas foi avaliado com o auxílio de uma fita métrica medindo-se desde o nível do solo até o ápice das plantas. Foram medidas 14 plantas nas duas linhas centrais de cada parcela, aos 125 DAE.

3.3.7.2 Massa de grãos por planta e rendimento de grãos

Após a dessecação da área, foi realizada a colheita das duas linhas centrais respeitando o limite de 1,5m das cabeceiras e as plantas foram passadas por uma trilhadora de grãos para separação e limpeza dos grãos. Com isso foi possível determinar a massa de grãos por planta e a produtividade em kg/ha.

3.3.7.3 Massa seca de planta

Aos 35 DAE foram coletadas cinco plantas com raízes intactas, da área central da segunda linha de cada parcela. Para manter o padrão de coleta em todos os tratamentos, foi construída uma forma com chapa de aço que era cravada entre as plantas para retirada das plantas e raízes (Figura 5). Dessa forma sempre foi coletado o mesmo volume de solo e raízes para avaliação.

Figura 5 - Retirada das raízes e parte aérea com uma forma de aço para retirada do mesmo volume de todos os tratamentos



A parte aérea foi separada das raízes na altura de inserção do cotilédone, lavada e acondicionada em saco de papel. O mesmo procedimento foi feito para as raízes, para permitir a separação dos nódulos das raízes. Com os materiais separados, realizou-se a secagem em estufa a 65°C até massa constante. Finalizada a secagem a parte aérea e nódulos foram pesados em balança de precisão.

3.3.8 Avaliações bioquímicas

3.3.8.1 Índice SPAD

A estimativa do conteúdo de clorofila via unidade SPAD foi realizada utilizando um clorofilômetro portátil (SPAD-502, Minolta Corporation, Ramsey, NJ, EUA). Este índice foi obtido nos estádios V4 e R2 a partir da média de 10 pontos nas duas linhas centrais.

3.3.9 Análise química das plantas

3.3.9.1 Quantidade de nitrogênio na parte aérea

Aos 35 DAE foram colhidas 5 plantas como descrito no item 3.2.7.3 para análise de matéria seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Após a coleta das plantas, estas foram lavadas em água corrente e em água deionizada. Posteriormente, as plantas foram levadas à estufa a 65°C até massa constante. Após a secagem das amostras, foram pesadas e moídas para serem encaminhadas para análise química determinando-se o teor de N segundo a metodologia descrita por Malavolta et al. (1997).

Com base no resultado do teor de nitrogênio e na massa de matéria seca foi calculada a quantidade / acúmulo nas plantas utilizando-se a equação 1:

$$\text{Quantidade de N (g planta}^{-1}\text{)} = \frac{\text{teor N (g kg}^{-1}\text{)} \times \text{massa de matéria seca (g planta}^{-1}\text{)}}{1000 \text{ (g kg}^{-1}\text{)}}$$

3.3.9.2 Eficiência nodular

A eficiência nodular avalia a eficiência dos nódulos fornecerem nitrogênio para as plantas. Para isso, determinou-se a massa seca de nódulos e o nitrogênio total na massa seca da parte aérea. Para o cálculo utilizou a seguinte equação 2:

$$\text{Eficiência nodular (\%)} = \frac{\text{Nitrogênio total da massa seca (mg)} \times 100}{\text{Massa seca de nódulos (mg)}}$$

3.3.10 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias, referentes aos tratamentos, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa Agroestat (BARBOSA e MALDONADO JUNIOR, 2015)

Os tratamentos adicionais em que a análise de variância indicou significativo, foram comparados com os tratamentos através do teste de Dunnett (95% de confiança) com o software Minitab 17.

3.4 Resultados e Discussão

O comprimento de plantas (cm) apresentou interação significativa entre dose e época de aplicação (Tabela 5). Na época de plantio, as doses que continham a bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (BJ) foram superiores a dose zero. Já para a época VC a dose de 900 mL ha⁻¹ foi superior a dose zero e 300 mL ha⁻¹, porém não diferiu da dose 600 mL ha⁻¹. As doses de 300 mL ha⁻¹ e 600 mL ha⁻¹ diferiram em função da época de aplicação, sendo superior no plantio.

Recomenda-se, para atingir altas produtividades, que as plantas possuam no mínimo 60 cm de comprimento (Rocha et al., 2012), característica observada nos resultados, indicando o potencial para alta produtividade. Apenas a dose zero que foi mais baixa, em média, logo essas plantas possuem menos nós e, por consequência, menos vagens.

A aplicada no plantio via irrigação, dose de 300 mL ha⁻¹, foi superior ao padrão utilizado atualmente, que é via sulco de semeadura.

Tabela 5 - Desdobramento das interações entre doses e épocas de aplicação para o comprimento de plantas (cm), aos 125 DAE

Comprimento de plantas (cm)		
Tratamentos	Plantio	VC
0 mL ha ⁻¹	77,0 Ab ⁺⁺	79,0 Ab ⁺⁺
300 mL ha ⁻¹	93,5 Aa ⁺	81,2 Bb [*]
600 mL ha ⁻¹	91,5 Aa	85,2 Bab
900 mL ha ⁻¹	90,5 Aa	88,7 Aa
Nmineral*	89,0	
Sulco ⁺	86,5	
CV%= 2,3		

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

A massa de grãos por planta (g/planta) apresentou interação significativa entre dose e época (Tabela 6). A aplicação dos inoculante via irrigação no plantio, com a dose 300 mL ha⁻¹, foi superior aos demais tratamentos, com 21,65 g planta⁻¹. As doses 600 mL ha⁻¹ e 900 mL ha⁻¹ aplicadas via irrigação no estágio fenológico VC, foram superiores aos demais tratamentos.

Comparando os tratamentos fatoriais com os adicionais observa-se que a dose 300 mL ha⁻¹ aplicada via irrigação no plantio, foi superior ao Nmineral e a inoculação via sulco de semeadura, o mesmo para as doses 600 mL ha⁻¹ e 900 mL ha⁻¹ aplicadas via irrigação no estágio fenológico VC.

Tabela 6 - Desdobramento das interações entre doses e épocas de aplicação para a massa de grãos por planta (g planta⁻¹)

Massa de grãos por planta (g planta ⁻¹)		
Tratamentos	Plantio	VC
0 mL ha ⁻¹	18,04 Ac	17,38 Ab
300 mL ha ⁻¹	21,65 Aa ⁺⁺	17,49 Bb
600 mL ha ⁻¹	20,21 Bb ⁺⁺	21,65 Aa ⁺⁺
900 mL ha ⁻¹	17,00 Bc [*]	20,99 Aa ⁺⁺
Nmineral*	18,68 a	
Sulco ⁺	17,76 b	
CV%= 3,05		

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

A Tabela 7 traz o desdobramento das doses e épocas para o rendimento de grãos por planta, em sacas/ha. A cultivar Zeus pode atingir altas produtividades, chegando a mais de 100 sacas por hectare. Estudos demonstram produtividades entre 60 e 137 sc/ha (Harms E Waureck, 2024; Tonatto et al., 2022), como ocorreu neste estudo.

A discussão dos dados com base na literatura atual é reduzida pois este é um estudo inovador, já que é a primeira vez que é realizada a aplicação de

Bradyrhizobium via irrigação por aspersão. Portanto, esse trabalho será base para discussão de novas pesquisas que venham a ser realizadas.

Tabela 7 - Desdobramento das interações entre doses e épocas de aplicação para o rendimento de grãos por planta (sacas ha⁻¹)

Rendimento de grãos (sacas ha ⁻¹)		
Tratamentos	Plantio	VC
0 mL ha ⁻¹	96,2 Ac	92,7 Ab
300 mL ha ⁻¹	115,5 Aa ⁺⁺	93,3 Bb
600 mL ha ⁻¹	107,8 Bb ⁺⁺	115,5 Aa ⁺⁺
900 mL ha ⁻¹	90,7 Bc [*]	111,9 Aa ⁺⁺
Nmineral*	99,7	
Sulco ⁺	96,0	
CV%= 3,15		

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

A Tabela 7 traz resultados interessantes que, quando analisados de forma conjunta, explicam dados isolados contidos na literatura. Observando primeiramente a época plantio, a dose de 300 mL ha⁻¹ foi superior às demais doses, seguida pela dose 600 mL ha⁻¹ e depois pela dose zero, que não diferiu da de 900 mL/ha. Já para época VC, as doses 600 e 900 mL ha⁻¹ foram superiores as demais e as doses zero e 300 mL ha⁻¹ não diferiram entre si.

Em resumo, quando a bactéria BJ é aplicada via irrigação por aspersão logo após o plantio a melhor dose é a de 300 mL ha⁻¹, menor dose contendo BJ e a pior dose contendo BJ é a máxima testada de 900 mL ha⁻¹. Para a época VC, as doses mais produtivas foram 600 e 300 mL ha⁻¹ e a menos produtiva contendo BJ foi 300 mL ha⁻¹. Avaliando as épocas dentro das doses, a dose zero não houve diferença, a dose 300 mL ha⁻¹ foi melhor aplicada via irrigação por aspersão no plantio e as doses 600 e 900 mL/ha foram melhores no estágio fenológico VC.

Considerando a época plantio, a dose zero foi a menos produtiva pois não foi aplicada nenhuma bactéria, sendo que a nodulação ocorreu apenas com as bactérias nativas do solo e, como a área não tinha histórico de cultivo de leguminosa,

naturalmente a população era reduzida, daí a menor nodulação, o menor fornecimento de N e a menor produtividade.

A dose 300 mL ha⁻¹ foi a mais produtiva, pois houve um equilíbrio na quantidade de bactérias aplicadas e multiplicadas no solo. Quando se aplica BJ no solo e este é mantido com umidade próximo do ideal, caso desta pesquisa, sua multiplicação com o passar dos dias é elevada, chegando a um aumento de 1000 vezes em relação à população inicial, em apenas 48 horas

Por sua vez, a dose de 900 mL ha⁻¹ foi inferior às demais, igualando-se a dose zero. Isso ocorreu devido a alta dosagem de bactérias BJ aplicadas via sistema de irrigação por aspersão. Altas doses podem causar prejuízos no estabelecimento, desenvolvimento e produtividade da soja. Rosa et al. (2023), avaliando doses de inoculante no sulco de semeadura, obtiveram menor porcentagem de emergência das plântulas e menor crescimento das raízes. Bulegon et al. (2014) relatam que altas doses de inoculante podem interferir negativamente na nodulação por causar efeitos antagonistas na rizosfera. As plantas leguminosas, caso da soja, possuem um mecanismo de autorregulação da nodulação, controlando a formação de novos nódulos após o processo de simbiose iniciar, para equilibrar o gasto energético com a FBN e sua necessidade de N. Reid et al. (2011) realizaram um estudo complexo sobre esse mecanismo nas leguminosas. Iniciado o processo de simbiose, as raízes produzem determinados peptídeos que são transportados para as folhas via xilema. No caule, há receptores que detectam esses peptídeos e para manter o equilíbrio é gerado um sinal inibidor que é “enviado” as raízes para inibir a formação de novos nódulos. Vários fatores ativam esse mecanismo, um deles é o alto teor de nitrato no solo. O mecanismo de autoregulação da nodulação compartilha genes com a regulação de nitrato, por isso altos níveis de nitrato induzem a produção de sinais que ativam a autoregulação da nodulação, inibindo a formação de novos nódulos. Esta é a explicação do motivo de não se aplicar altas doses de nitrogênio no plantio da soja, pois altas doses de N no solo ativam a autoregulação e inibem a formação de novos nódulos. Observa-se, em campo, a redução na nodulação quando é aplicado nitrogênio no plantio em doses superiores a 20 kg ha⁻¹. A princípio no início do desenvolvimento das plantas não há problema. Conforme as plantas se desenvolvem esse nitrogênio vai sendo consumido e sua demanda por esse nutriente vai aumentando e como a nodulação foi deficiente no início, devido a inibição pela

aplicação de N, toda necessidade das plantas não é suprida pela FBN, limitando a produtividade.

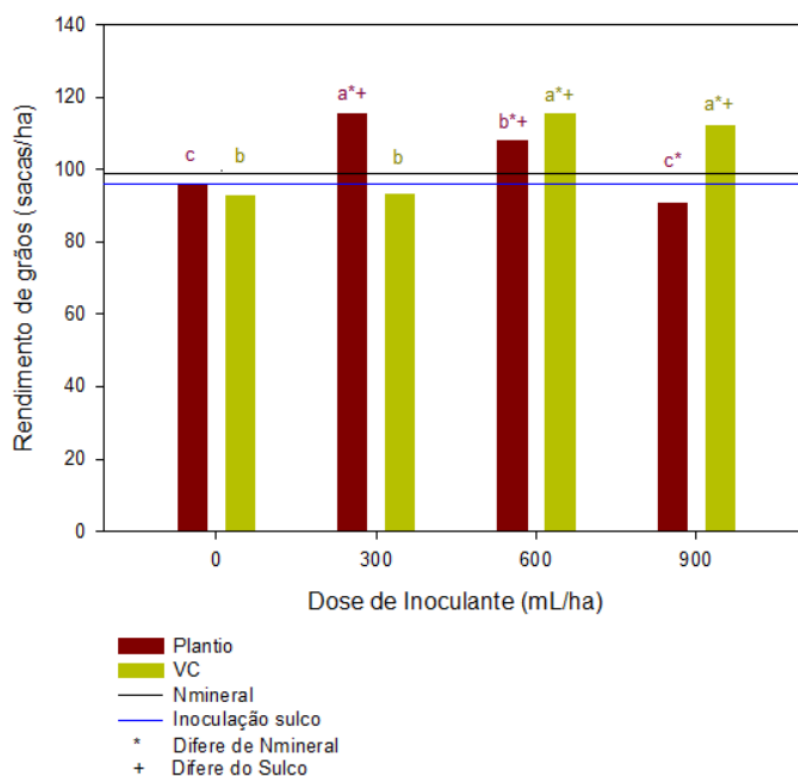
O segundo fator são doses elevadas de inoculante, caso do tratamento 900 mL ha⁻¹ desta pesquisa, que além de ser uma dose alta já no momento da aplicação, pode ficar ainda maior após a multiplicação dessas bactérias. A alta população de bactérias que fixam nitrogênio gera um estímulo inicial que aumentam rapidamente a produção de peptídeos que sinalizam a nodulação da planta. Esse excesso de peptídeos acelera a ativação da autoregulação da nodulação suprimindo a formação de novos nódulos. Devido ao excesso de “estímulo inibidor” a sequência da formação de novos nódulos fica prejudicada, resultando em menor formação de nódulos (Reid *et al.*, 2011).

Analizando a aplicação dos inoculantes via irrigação no estágio VC, nota-se que as maiores doses foram superiores, contradizendo o resultado anterior. Isto pode ser explicado pelo fato de que, quando as bactérias foram aplicadas no plantio, não havia planta emergida e logo não havia raiz. As plantas de soja levam em torno de sete dias para emergirem, portanto quando as bactérias são aplicadas no plantio elas possuem todo esse tempo para se multiplicarem, por isso doses menores são melhores em comparação a doses maiores, pois no final a dose elevada irá proporcionar uma população muito elevada quando as plantas emergirem e emitirem raízes, causando efeito negativo. No entanto, quando aplicado no estágio VC, fase em que os cotilédones estão completamente abertos e a borda das folhas unifoliadas não se tocam, as plantas já possuem sistema radicular desenvolvido, logo não tem o período de sete dias para as bactérias se multiplicarem e estabelecer uma população mínima para o início da nodulação, por isso menores doses são menos eficazes. Nesse caso haverá o efeito negativo pois conforme ocorre a multiplicação das bactérias, também ocorre o desenvolvimento do sistema radicular e a população bacteriana não é suficiente.

A Figura 6 apresenta o rendimento de grãos, em sacas/ha, em função das doses de BJ aplicadas via irrigação por aspersão e épocas de aplicação. Zilli *et al.* (2008), avaliando aplicação de *Bradyrhizobium* via pulverização em cobertura, obtiveram menor produtividade de grãos comparado ao tratamento de sementes. Zago *et al.* (2018), trabalhando com doses de *Bradyrhizobium* aplicada via pulverização em cobertura, concluíram que doses de 1500 mL/ha foram as mais

eficientes. Mesquita e Silva (2023), estudando formas de aplicação de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, não obtiveram diferenças nos componentes biométricos da soja. Braccini et al. (2016) avaliaram modos de aplicação dessas bactérias e uso de adubação nitrogenada na soja e concluíram que o tratamento via semente foi a mais adequada e que a adubação nitrogenada com 200 kg/ha diminui a nodulação, sendo desnecessária quando aplicados os inoculantes.

Figura 6 – Rendimento de grãos (sacas/ha) em função das doses de inoculante aplicado via irrigação por aspersão e épocas de aplicação



Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

As Figuras 7 e 8 apresentam plantas representando os tratamentos, para as épocas de aplicação das bactérias BJ via sistema de irrigação por aspersão, plantio e VC, respectivamente. Nas duas figuras é possível observar o menor porte e quantidade de vagens para a dose zero.

Figura 7 - Imagens das plantas sendo da esquerda para direita os tratamentos da época de aplicação no plantio, dose 0, Nmineral, inoculação via sulco, irrigação via aspersão dose 300 mL ha⁻¹, irrigação via aspersão dose 600 mL ha⁻¹ e irrigação via aspersão dose 900 mL ha⁻¹

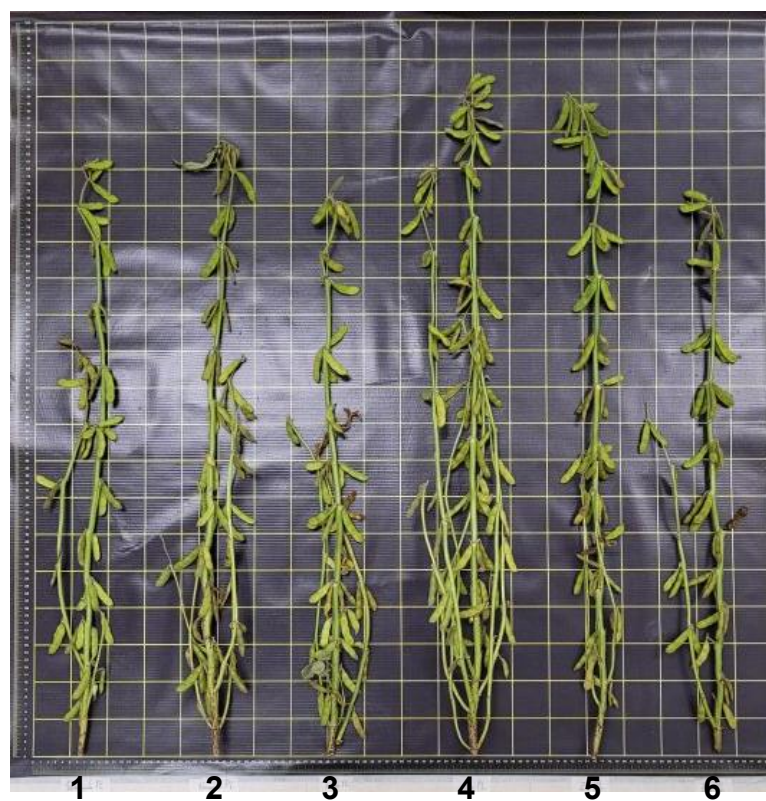


Figura 8 - Imagens das plantas sendo da esquerda para direita os tratamentos da época de aplicação VC, dose 0, Nmineral, inoculação via sulco, irrigação via aspersão dose 300 mL ha⁻¹, irrigação via aspersão dose 600 mL ha⁻¹ e irrigação via aspersão dose 900 mL ha⁻¹



Em relação a massa seca da parte aérea (Tabela 8), não houve diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância.

Tabela 8 – Massa seca da parte aérea por planta (g planta⁻¹) em função dos tratamentos na fase de florescimento

Dose de BJ	Massa seca parte aérea por planta (g planta ⁻¹)
0 mL ha ⁻¹	5,8
300 mL ha ⁻¹	7,4
600 mL ha ⁻¹	7,9
900 mL ha ⁻¹	7,6
Plantio	7,7
VC	6,7
Nmineral	10,7
Sulco	8,7
Média geral	7,7
CV%	18,2

CV%: coeficiente de variação; BJ: *Bradyrhizobium japonicum*.

A Tabela 9 apresenta o desdobramento das doses e épocas para o conteúdo de clorofila via unidade SPAD, no estágio V4. Tanto para o plantio quanto para o estágio VC, as doses que continham BJ, ou seja, diferente da dose zero, foram superiores a dose zero. A aplicação via sistema de irrigação por aspersão de doses de BJ foram superiores no plantio. Todas as doses, exceto a dose zero, foram superiores a inoculação via sulco.

Tabela 9 - Desdobramento das interações entre doses e épocas para o índice SPAD no estágio fenológico V4

SPAD Estádio V4		
Tratamentos	Plantio	VC
0 mL ha ⁻¹	34,4 Bb ⁺⁺	35,5 Ab ⁺⁺
300 mL ha ⁻¹	40,3 Aa ⁺	37,7 Ba [*]
600 mL ha ⁻¹	40,9 Aa ⁺	37,3 Ba [*]
900 mL ha ⁻¹	40,0 Aa ⁺	37,5 Ba [*]
Nmineral*	40,6 a	
Sulco ⁺	38,3 b	
CV%= 1,5		

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

A Tabela 10 apresenta o desdobramento das doses e épocas para o conteúdo de clorofila via unidade SPAD, no estágio R2. As doses que continham BJ diferiram da dose zero. A aplicação do inoculante proporcionou o aumento de, em média, 4 unidades SPAD comparado com a dose zero, demonstrando a importância da aplicação de bactéria fixadoras de N.

Tabela 10 - Desdobramento das interações entre doses e épocas para o índice SPAD no estágio fenológico R2

SPAD Estádio R2		
Tratamentos	Plantio	VC
0 mL ha ⁻¹	40,5 Ab ⁺⁺	38,7 Bc ⁺⁺
300 mL ha ⁻¹	45,1 Aa	42,2 Bb
600 mL ha ⁻¹	43,4 Aa	43,2 Aab
900 mL ha ⁻¹	43,3 Aa	44,3 Aa
Média das Épocas	43,1	42,1
Nmineral*		44,1
Sulco ⁺		43,8
CV%= 2,3		

CV%: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

A Tabela 11 apresenta a eficiência nodular (%) e o acúmulo de nitrogênio (g/planta). Não houve diferença entre as doses 300, 600 e 900 mL ha⁻¹, para as duas variáveis.

Tabela 11 – Eficiência nodular (%) e acúmulo de nitrogênio (g/planta) em função dos tratamentos

Dose de BJ	Eficiência nodular (%)	Acúmulo de N (g/planta)
0 mL ha ⁻¹	60,37 b	0,21 b
300 mL ha ⁻¹	74,57 ab	0,28 ab
600 mL ha ⁻¹	72,01 ab	0,29 a
900 mL ha ⁻¹	94,53 a	0,30 a
Plantio	74,51	0,29
VC	76,23	0,25
Nmineral	227,85 a	0,35
Sulco	80,70 b	0,30
Média geral	91,1	0,28
CV%	19,6	19,6

CV%: coeficiente de variação; BJ: *Bradyrhizobium japonicum*; Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha, minúscula na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey; Médias seguidas de * e + diferem ao nível de significância de 5% pelo teste de Dunnett, dos tratamentos com Nmineral e inoculação via sulco, respectivamente.

3.5 Conclusões

Este estudo inédito revelou informações importantes mostrando que a aplicação das bactérias BJ e AB via sistema de irrigação por aspersão é mais eficiente que os métodos de aplicação atuais.

A aplicação via irrigação foi o diferencial, sendo que a mesma dose utilizada no método de aplicação via sulco, quando aplicada via irrigação por aspersão promoveu maior rendimento de grãos devido as condições favoráveis para o desenvolvimento das bactérias, que esta forma de aplicação proporciona.

A melhor dose da bactéria BJ aplicada via irrigação por aspersão logo após o plantio foi a de 300 mL ha⁻¹.

Altas dosagens de BJ quando aplicadas no plantio, via sistema de irrigação por aspersão, prejudicam o desenvolvimento da soja e reduzem a produtividade.

Quando aplicada de forma tardia, é necessário o aumento da dose de BJ, sendo a dose de 600 mL ha⁻¹, a dose mais indicada por esta pesquisa.

A aplicação das bactérias *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* via sistema de irrigação por aspersão mostrou-se viável e superior a inoculação via sulco de semeadura, recomendando-se a dose de 300 mL ha⁻¹ logo após o plantio com a irrigação de germinação.

Para aplicação via sistema de irrigação por aspersão, deve-se utilizar a lâmina mínima de 10mm de irrigação em todos os estádios de aplicação.

Referências

- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, A. M. **Nodulação e fixação de nitrogênio em soja tratada com sulfentrazone**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330, 2001.
- BRACCINI, A. L., MARIUCCI, G. E. G., SUZUKAWA, A. K., DA SILVA LIMA, L. H., & PICCININ, G. G. **Co-inoculação e modos de aplicação de Bradyrhizobium japonicum e Azospirillum brasilense e adubação nitrogenada na nodulação das plantas e rendimento da cultura da soja**. Scientia Agraria Paranaensis, 27-35, 2016.
- BULEGON, L. G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; KESTRING, D. **Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com Azospirillum brasilense e Bradyrhizobium japonicum**. Journal of Agronomic Sciences, v.3, n.1, p.26-37, 2014.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants**. Symbiosis, v. 48, p.154-163, 2009.
- CONAB, C. N. DE A. **Acompanhamento da safra brasileira 2023/2024**. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2023/2024, 2024.
- COSTA, M. M. M. N. **Fixação biológica de nitrogênio: uma revisão**. Documentos 293. Campina Grande: EMBRAPA. 2023.
- DA ROSA, L., PAULINO, M. A. R., MOLINA, L. S., ZUFFO, A. M., AGUILERA, J. G., & STEINER, F. **Impacto da aplicação de doses de inoculante no sulco de semeadura sobre o estabelecimento inicial das plântulas de soja**. Revista Cultivando o Saber, 16, 1-18, 2023.
- DE MESQUITA, C. J., & DA SILVA, T. P. **Desenvolvimento da soja submetida a diferentes formas de inoculação e coinoculação com Bradyrhizobium japonicum E Azospirillum brasilense**. Revista Agroveterinária do Sul de Minas- ISSN: 2674-9661, 5(1), 1-21, 2023.
- FIGUEIREDO, M. D. V. B., BALATTI, A. P., DE FRANÇA, F. P., & BURITY, H. A. **Sobrevivência do Bradyrhizobium sp. quando submetido a diferentes temperaturas de Crescimento**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1233-1238, 1995.
- GALLETTI, P., FRANCO, A. A., AZEVÊDO, H., & DÖBEREINER, J. **Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja anual**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1-8, 1971.

HARMS, K. L., DE ARAUJO, T. G., & WAURECK, A. **Influência da densidade de semeadura nas características agrônômicas e produtividade de cultivares de soja (Agronomia)**. Repositório Institucional, 2(2), 2024.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283), 2007.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (Ed.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Dordrecht: Springer, p.25-42, 2005.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. de C. (ed.). Tecnologias de produção de soja. Londrina: Embrapa Soja, 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17), 2020.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica do nitrogênio**. In.: MEYER, M.C.; BUENO, A. F.; MAZARO, S. M.; da SILVA, J. C.(org.). Bioninsumos na cultura da soja. Brasília: EMBRAPA, cap. 8. p. 141-162, 2022.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Tecnologias de inoculação da cultura da soja: mitos, verdades e desafios**. In: KAPPES, C. (Ed.). Boletim de Pesquisa 2019/2020. Rondonópolis: Fundação MT, p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19), 2019.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and Azospirilla: strategies to improve sustainability**. Biology and Fertility of Soils, v. 49, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; CAMPOS, L. J. M.; MENNA, P.; BRANDI, F.; RAMOS, Y. G. **Seed pre-inoculation with Bradyrhizobium as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems**. Agronomy Journal, [S.L.], v. 112, n. 6, p. 5222-5236, 22 set. 2020. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/agj2.20392>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. **Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing**. African Journal of Agricultural Research, Sapele, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 2015.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. **Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil**. Field Crops Research, Dordrecht, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.

KING, C. A.; PURCELL. **Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids.** Plant Physiology, Rockville, v. 137, n. 2, p. 1389-1396, 2005.

LANDAU, E. C., SILVA, G. A., MOURA, L., HIRSCH, A., & GUIMARÃES, D. P. **Dynamics of agricultural production and the natural landscape in Brazil in recent decades: Products of plant origin (2^a ed).** Embrapa, 2020.

MARCELINO, K. R. A., VILELA, L., LEITE, G. G., GUERRA, A. F., & DIOGO, J. M. D. **S. Manejo da adubação nitrogenada de tensões hídricas sobre a produção de matéria seca e índice de área foliar de Tifton 85 cultivado no Cerrado.** Revista Brasileira de Zootecnia, 32, 268-275, 2003.

OHYAMA, T.; TEWARI, K.; ISHIKAWA, S.; TANAKA, K.; KAMIYAMA, S.; ONO, Y.; HATANO, S.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; HASEGAWA, H.; SATO, T.; TANABATA, S.; NAGUMO, Y.; FUJITA, Y.; TAKAHASHI, Y. **Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization technique to promote nitrogen fixation and seed yield.** Soybean: The Basis of Yield, Biomass and Productivity, [s. l.], p. 153-185, 2017.

PRANDO, A. M., DE OLIVEIRA, A. B., POSSAMAI, E., REIS, E., NOGUEIRA, M., HUNGRIA, M., ... CARNEVALLI, R. A. **Coinoculação da soja com Bradyrhizobium e Azospirillum na safra 2023/2024 no Paraná.** 2024.

PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B. de; LIMA, D. de; POSSAMAI, E. J.; REIS, E. A.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Coinoculação da soja com Bradyrhizobium e Azospirillum na safra 2020/2021 no Paraná.** Londrina: Embrapa Soja, 24 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 181), 2022.

RAIJ, B. CANTARELA, H., QUAGGIO, J. A., FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2.ed. Campinas: IAC, 285p. Boletim Técnico, 100, 1996.

REID, D. E., FERGUSON, B. J., HAYASHI, S., LIN, Y. H., & GRESSHOFF, P. M. **Molecular mechanisms controlling legume autoregulation of nodulation.** Annals of botany, 108(5), 789-795, 2011.

ROCHA, R. S., SILVA, J. A. L. D., NEVES, J. A., SEDIYAMA, T., & TEIXEIRA, R. D. C. **Desempenho agrônomo de variedades e linhagens de soja em condições de baixa latitude em Teresina-PI.** Revista Ciência Agronômica, 43, 154-162, 2012.

RONNER, E.; FRANKE, A. C.; VANLAUWE, B.; DIANDA, M.; EDEH, E.; UKEM, B.; BALAF, A.; HEERWAARDENA, J. VAN.; GILLER, K. E. **Understanding variability in soybean yield and response to P-fertilizer and rhizobium inoculants on farmers' fields in northern Nigeria.** Field Crops Research, Heidelberg, v. 186, p. 133-145, 2016.

SADOWSKY, M.J. **Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation.** In Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment (D. Werner and W. E. Newton, eds.), pp. 89–112. 2005. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

SANTOS M. S.; NOGUEIRA M.A.; HUNGRIA M. **Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of 29 beneficial bacteria in agriculture.** AMB Expr 9:205. 2019.
<https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.

SANTOS, H.G., JACOMINE, P.K.T., ANJOS, L.H.C., OLIVEIRA, V.A., LUMBRERAS, J.F., COELHO, M.R., ALMEIDA, J.A., ARAÚJO-FILHO, J.C., OLIVEIRA, J.B., CUNHA, T.J.F. **Sistema brasileiro de classificação de solos.** Fifth ed. Embrapa Solos, Brasília, Brazil, 2018.

SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. de C. (Ed.). **Tecnologias de produção de soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2020. 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17).

SILVEIRA, B. M. D. **Efeitos da inoculação e coinoculação associada a aplicação de micronutrientes na cultura da soja.** 2021.

SINCLAIR, T. R.; PURCELL, L. C.; KING, C. A.; SNELLER, C. H.; CHEN, P.; VADEZ, V. **Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation.** Field Crops Research, v. 101, n. 1, p. 68-71, 2007.

SOUSA, W. S.; TEIXEIRA, I. R.; CAMPOS, T. S.; SILVA, G. C.; SILVA, M. B.; MOREIRA, S. G. **Supplementary reinoculation in topdressing of *Rhizobium tropici* in common bean crop: effects on nodulation, morphology, and grain yield.** Journal of Plant Nutrition, v. 45, e20, 2021.

TEIXEIRA, I. R.; LOPES, P. R.; SOUSA, W. S.; SILVA, G. C. **Response of common bean to rhizobium reinoculation in topdressing.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 26, n. 4, p. 274-282, 2022. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v26n4p274-282.

TELLES, T. S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. **Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil.** Environmental Technology & Innovation, Amsterdã, v. 31, p. 103158, 2023.

TONATTO, M., ZDZIARSKI, A. D., MEIRA, D., PANHO, M. C., ZANELLA, R., MENEGAZZI, C. P., ... & BENIN, G. **Yield potential of modern soybean cultivars under high and low input levels.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 57, e02852, 2022.

VIEIRA NETO, S. A., PIRES, F. R., MENEZES, C. C. E. D., MENEZES, J. F. S., SILVA, A. G. D., SILVA, G. P., & ASSIS, R. L. D. **Formas de aplicação de**

inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 32, 861-870, 2008.

ZAGO, L. F., LIMA, C. R., DA CRUZ, R. M. S., & ALBERTON, O. **Inoculação de diferentes doses de Bradyrhizobium por cobertura e seu efeito na cultura da soja.** Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, 21(2), 2018.

ZHANG, F.; DASHTI, N.; HYNES, R. K.; SMITH, D. L. **Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at sub optimal root zone temperatures.** Annals of Botany, Oxford, v. 77, n. 3, p. 453-459, 1996.

ZHANG, Y.M.; LI, Y.; CHEN, W.F.; WANG, E.T.; TIAN, C.F.; LI, Q.Q.; ZHANG, Y.Z.; SUI, X.H.; CHEN, W.X. **Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, p. 6331-6342, 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00542-11>.

ZIBIANI, R. M., BASSI, W. A. L., FERREIRA, N. H., DAS NEVES, C. C. D. S., DE CARVALHO, J. B., & NAKAO, A. H. **Inoculação com Bradyrhizobium via Sulco de Plantio e Formas de Aplicação de Cobalto e Molibdênio na Cultura da Soja de Segundo Ano.** Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde, 27(2), 197-203, 2023.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Inoculação de Bradyrhizobium em soja por pulverização em cobertura.** Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v. 43, n. 4 p. 541-544, 2008.

ZUFFO, A.M.; STEINER, F.; BUSCH, A.; SANTOS, D.M.S. **Adubação nitrogenada na soja inibe a nodulação e não melhora o crescimento inicial das plantas.** Revista de Agronegócio e Meio Ambiente, v. 12, n.2, p. 333-349, 2019.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, A. M. **Nodulação e fixação de nitrogênio em soja tratada com sulfentrazone**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n. 2, p. 325-330, 2001.
- CONAB, C. N. DE A. **Acompanhamento da safra brasileira 2023/2024. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos 2023/2024**, 2024.
- COSTA, M. M. M. N. **Fixação biológica de nitrogênio: uma revisão**. Documentos 293. Campina Grande: EMBRAPA, 2023.
- DEAK, E. A. et al. **Effects of soil temperature and moisture on biological nitrogen fixation in soybean crop**. *Australian Journal of Crop Science*, v. 13, n. 8, p. 1327, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.08.p1739>
- FIGUEIREDO, M. D. V. B.; BALATTI, A. P.; DE FRANÇA, F. P.; BURITY, H. A. **Sobrevivência do Bradyrhizobium sp. quando submetido a diferentes temperaturas de crescimento**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1233-1238, 1995.
- FIPKE, G. M. et al. **Osmoprotectant in soybean seeds can increase the inoculation and co-inoculation time in pre-sowing**. *Australian Journal of Crop Science*, 14(6), 905–912, 2020. doi:10.3316/informit.313462494103151
- GALINDO, F. S. et al. **Technical and economic viability of cowpea co-inoculated with Azospirillum brasilense and Bradyrhizobium spp. and nitrogen doses**. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 24(5), 304-311, 2020.
- GALLETTI, P. et al. **Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja anual**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1-8, 1971.
- HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; CAMPO, R. J. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. 2007.
- HUNGRIA, M. et al. **Inoculum rate effects on the soybean symbiosis in new or old fields under tropical conditions**. *Agronomy Journal*, Madison, v. 109, n. 3, p. 1-7, 2017.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 80 p., 2007.
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. **The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America**. In: WERNER, D.;

NEWTON, W. E. (Ed.). *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*. Dordrecht: Springer, p. 25-42, 2005.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica de nitrogênio**. In: SEIXAS, C. D. S. et al. (Ed.). *Tecnologias de produção de soja*. Londrina: Embrapa Soja, 347 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17), 2020.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. **Fixação biológica do nitrogênio**. In: MEYER, M. C. et al. (Org.). *Bioninsumos na cultura da soja*. Brasília: EMBRAPA, cap. 8, p. 141-162, 2022.

HUNGRIA, M. et al. **Seed pre-inoculation with Bradyrhizobium as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems**. *Agronomy Journal*, v. 112, n. 6, p. 5222-5236, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/agj2.20392>

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing**. *African Journal of Agricultural Research*, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 2015.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. **Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil**. *Field Crops Research*, v. 65, n. 2, p. 151-164, 2000.

KING, C. A.; PURCELL. **Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids**. *Plant Physiology*, v. 137, n. 2, p. 1389-1396, 2005.

MORETTI, L. G. et al. **Effects of growth promoting bacteria on soybean root activity, plant development, and yield**. *Agronomy Journal*, v. 112, n. 1, p. 418-428, 2020.

OHYAMA, T. et al. **Role of nitrogen on growth and seed yield of soybean and a new fertilization technique to promote nitrogen fixation and seed yield**. *Soybean: The Basis of Yield, Biomass and Productivity*, p. 153-185, 2017.

PRANDO, A. M. et al. **Coinoculação da soja com Bradyrhizobium e Azospirillum na safra 2020/2021 no Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 24 p. (Circular Técnica, 181), 2022.

REGO, C. H. Q. et al. **Co-inoculation with Bradyrhizobium and Azospirillum increases yield and quality of soybean seeds**. *Agronomy Journal*, 110(6), 2302-2309, 2018.

RONDINA, A. B. L. et al. **Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense or treated with A. brasilense exudates**. *Biology and Fertility of Soils*, v. 56, p. 537-549, 2020. DOI: 10.1007/s00374-020-01453-0

RONNER, E. et al. **Understanding variability in soybean yield and response to P-fertilizer and rhizobium inoculants on farmers' fields in northern Nigeria.** *Field Crops Research*, v. 186, p. 133-145, 2016.

SADOWSKY, M. J. **Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation.** In: WERNER, D.; NEWTON, W. E. (Eds.). *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment*, pp. 89–112. Springer, Dordrecht, 2005.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture.** *AMB Express*, 9:205, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SEIXAS, C. D. S. et al. (Ed.). **Tecnologias de produção de soja.** Londrina: Embrapa Soja, 347 p. (Sistemas de Produção, 17), 2020.

SILVA, A. F.; FREITAS, A. D. S.; STAMFORD, N. P. **Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem.** *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 2, p. 1327-1333, 2002.

SILVEIRA, B. M. **Efeitos da inoculação e coinoculação associada a aplicação de micronutrientes na cultura da soja.** 2021.

SINCLAIR, T. R. et al. **Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N₂ fixation.** *Field Crops Research*, v. 101, n. 1, p. 68-71, 2007.

SOUSA, W. S. et al. **Supplementary reinoculation in topdressing of *Rhizobium tropici* in common bean crop: effects on nodulation, morphology, and grain yield.** *Journal of Plant Nutrition*, v. 45, e20, 2021.

TEIXEIRA, I. R. et al. **Response of common bean to rhizobium reinoculation in topdressing.** *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 26, n. 4, p. 274-282, 2022. DOI: 10.1590/1807-1929/agriambi.v26n4p274-282

TELLES, T. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil.** *Environmental Technology & Innovation*, v. 31, p. 103158, 2023.

VIEIRA NETO, S. A. et al. **Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soja.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32, 861-870, 2008.

ZHANG, F. et al. **Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures.** *Annals of Botany*, v. 77, n. 3, p. 453-459, 1996.

ZHANG, Y. M. et al. **Biodiversity and biogeography of rhizobia associated with soybean plants grown in the North China Plain.** *Applied and Environmental Microbiology*, p. 6331-6342, 2011. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00542-11>

ZIBIANI, R. M. et al. **Inoculação com *Bradyrhizobium* via sulco de plantio e formas de aplicação de cobalto e molibdênio na cultura da soja de segundo ano.** *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*, 27(2), 197-203, 2023.

ZILLI, J. E. et al. **Inoculação de *Bradyrhizobium* em soja por pulverização em cobertura.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, n. 4, p. 541-544, 2008.

ZUFFO, A. M. et al. **Adubação nitrogenada associada à inoculação de *Bradyrhizobium japonicum* como estratégia para amenizar os efeitos da desfolha na soja.** *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, 14(1), 17-26, 2021.