

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL
CAMPUS IBIRUBÁ**

**EFEITO DA COINOCULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO A
APLICAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NA CULTURA DA
SOJA**

RAFAEL ASDRUBAL DRESCH

Ibirubá, 30/03/2021.

RAFAEL ASDRUBAL DRESCH

**EFEITO DA COINOCULAÇÃO ASSOCIADA OU NÃO A APLICAÇÃO DE
MICRONUTRIENTES NA CULTURA DA SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado junto ao curso de Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul – Campus Ibirubá como requisito parcial da obtenção do grau de Engenheiro Agrônomo.

Orientadora: Prof. Dra Daniela Batista dos Santos.

Ibirubá, 30/03/2021.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais processos que fazem parte do ciclo biogeoquímico de N.....	15
Figura 2: Reações catalisadas pela nitrogenase	16
Figura 3: Reação de redução catalisada pela nitrogenase: Ferredoxina reduz a proteína Fe. A ligação e hidrólise de ATP da proteína Fe é considerada causadora de uma mudança na conformação de tal proteína, facilitando as reações de oxi-redução.....	17
Figura 4: Processo de infecção e desenvolvimento de um nódulo na rizosfera de plantas da família Fabaceae.....	19
Figura 5: Precipitação e temperaturas no decorrer da instalação, desenvolvimento e conclusão do experimento em dias após a semeadura.....	36
Figura 6: Dados da estação meteorológica automática de Ibirubá, gerados pelo software SISDAGRO no decorrer do experimento instalado.....	36
Figura 7: Relação de excesso e deficiência hídrica em milímetros, gerados pelo software SISDAGRO no decorrer do experimento instalado	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Propriedades químicas do solo na camada de 0-10 e de 10-20cm de profundidade, da área experimental do IFRS-Campus Ibirubá. Ibirubá-RS, 2019.	28
Tabela 2 : Massa seca de parte aérea e de raízes somadas às variáveis relacionadas a nodulação (nº de nódulos por planta e massa seca de nódulos por planta) em soja cultivada em sistema de semeadura direta usando diferentes aplicações de inoculantes e cobalto e molibdênio. Ibirubá, RS, safra 2019/2020.	31
Tabela 3 : Componentes de rendimento da cultura da soja, número de grãos por vagem (NGV), peso de mil grãos (PMS) e produtividade (P), cultivada em sistema de semeadura direta. Usando diferentes aplicações de inoculantes e cobalto e molibdênio. Ibirubá, RS, safra 2019/2020.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 CULTURA DA SOJA E IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO.....	10
2.2 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGENIO.....	13
2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGENIO.....	15
2.3.1 Fixação Simbiótica de Nitrogênio	17
2.3.2 Fixação associativa de Nitrogênio	20
2.3.3 A prática de coinoculação	22
2.3.4 O registro a seleção e a produção de inoculantes	22
2.4 COBALTO E MOLIBDENIO NA CULTURA DA SOJA E A SUA RELAÇÃO COM A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	25
3. MATERIAIS E METODOS	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS	39

RESUMO

A cultura da soja é uma das mais importantes para alimentação humana e animal, sendo importante fonte de proteína. O nitrogênio é um dos principais elementos para essa cultura, podendo ser fornecido via fixação biológica de nitrogênio por meio de técnicas denominadas de inoculação e coinoculação nas quais utilizam-se bactérias *Bradyrhizobium elkanii* e *Azospirillum brasiliense*. Micronutrientes a base de cobalto e molibdênio no tratamento de sementes (TS) ou em estágio fenológico de quatro nós visíveis e três folhas trifolioladas totalmente abertas (V3-V4) podem ajudar a aprimorar o processo de FBN. Diante desse contexto, o presente estudo objetivou avaliar os componentes de rendimento da cultura da soja quando essa foi inoculada com *Bradyrhizobium* e coinoculada (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) associada ou não à aplicação de CoMo em diferentes estádios fenológicos da cultura. O experimento foi realizado na área didática e experimental do IFRS – Campus Ibirubá sob delineamento de blocos ao acaso, em arranjo experimental de faixas, com 12 tratamentos em 3 repetições. Os tratamentos utilizados foram T1- Sem inoculante (Testemunha), T2- Sem inoculante + CoMo TS, T3- Sem inoculante + CoMo V3-V4, T4- Sem inoculante + CoMo TS + CoMo V3-V4, T5- *Bradyrhizobium elkanii* + Testemunha, T6- *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo TS, T7- *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo V3-V4, T8- *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo TS + CoMo V3-V4, T9- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + Testemunha, T10- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo TS, T11- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo V3-V4, T12- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo TS + CoMo V3-V4. Os resultados foram submetidos ao teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Foi possível concluir que em anos de estiagem a aplicação de cobalto e molibdênio na dose de 200 mL ha⁻¹ realizado 35 dias após a semeadura da cultura apresenta resultados positivos na variável massa seca de nódulos por planta, porém não resulta em aumento de produtividade final. Quanto às demais variáveis analisadas, essas não foram influenciadas pelos tratamentos estudados, tanto pela prática de inoculação *Bradyrhizobium elkanii* ou coinoculação em conjunto com *Azospirillum brasiliense* como a aplicação de CoMo.

Palavras chave: Nitrogênio, fixação biológica de nitrogênio (FBN), inoculação, coinoculação, produção, *Glycine max*.

ABSTRACT

Soybean cultivation is one of the most important for human and animal feed, being an important source of protein. Nitrogen is one of the main elements for this crop, and can be supplied via biological nitrogen fixation through techniques called inoculation and coinoculation nas which to use bacterium *Bradyrhizobium elkanii* and *Azospirillum brasiliense*. Micronutrients based on cobalte and molybdenum in seed treatment (TS) or in phenological stage of four visible nodes and three fully open trifoliolade leaves(V3-V4) can help improve the BNF process. In this context, the present study evaluated the yield components of soybean culture when it was inoculated with *Bradyrhizobium* and coinoculation (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) associated or not with the application of CoMo in different phenological stages of the crop. The experiment was carried out in the didactic and experimental area of IFRS - Campus Ibirubá under a randomized block design, in an experimental arrangement of tracks, with 12 treatments in 3 replications. The tratamentos used were T1- No inoculant (Control), T2- No inoculant + CoMo TS, T3- No inoculant + CoMo V3-V4, T4- No coulante + CoMo TS + CoMo V3-V4, T5- *Bradyrhizobium elkanii* + Witness, T6- *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo TS, T7- *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo V3-V4, T8- *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo TS + CoMo V3-V4, T9- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + Witness, T10- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo TS, T11- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo V3-V4, T12- *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo TS + CoMo V3-V4. The results were submitted to the F test and the means compared by the Tukey test. It is possible to conclude that in years of drought the application of cobalt and molybdenum at a dose of 200 mL ha⁻¹ performed 35 days after culture sowing presents positive results in the variable dry mass of nodules per plant, but does not result in increased final productivity. As for the other variables analyzed these were not influenced by the treated studied, either by the practice of inoculation *Bradyrhizobium elkanii* or coinoculation together with *Azospirillum brasiliense* as the application of CoMo.

Keywords: Nitrogen, biological nitrogen fixation (BNF), inoculation, coinoculation, production, *Glycine max*.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas quatro décadas a demanda pela produção de soja vem aumentando de forma considerável devido às exigências do mercado interno e externo. Atualmente, é indiscutível a importância dessa *comoditie* agrícola, a qual interfere na balança comercial dos principais países exportadores como EUA, Brasil, Argentina. Essa demanda deve-se ao crescimento constante da população mundial e à exigência de proteína com um custo baixo quando comparada à proteína de origem animal.

A produção de soja no Brasil na safra passada (2019/20) foi de 128.500 mil toneladas com estimativas para a atual safra (2020/2021) de 134.000 mil de toneladas (USDA,2021). Colocando o Brasil como maior produtor mundial dessa *comoditie*, com uma produtividade média estimada por hectare de 3.470 kg (USDA, 2021).

No entanto, tal quantidade é cerca da metade do que já foi produzido em casos isolados, na safra passada segundo dados da Cesb (2020) 7.129,2 kg ha⁻¹. Esse fato mostra que a média da produção está aquém do potencial produtivo da cultura, ou seja, ainda é possível realizar melhorias nas técnicas de manejo do solo e cultivos. Entre os avanços tecnológicos acerca do manejo destacam-se o uso de: irrigação, sensoriamento remoto, melhoramento genético, agricultura de precisão e avanço na nutrição de plantas.

Com relação à nutrição, destaca-se o nitrogênio (N) como um dos principais nutrientes para o desenvolvimento das plantas. No caso da soja, a demanda é de 80 kg de N T⁻¹ de grãos produzida, sendo que 15 kg ha⁻¹ são necessários para desenvolvimento de biomassa (haste, folha e raiz) e 65 kg há⁻¹ de nitrogênio são exportados via grãos (HUNGRIA et al. 2007). Essa demanda de N é suprida graças à fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo realizado pela simbiose entre o sistema radicular de *Fabaceae* e algumas bactérias, sendo que uma das principais bactérias utilizadas comercialmente na forma de inoculante é *Bradyrhizobium elkanii*. Nessa associação, a bactéria converte o gás nitrogênio molecular (N₂) em amônia ou íons de amônio (NH₄⁺) e supre de 70% a 95% do nitrogênio (N) utilizado pela soja

durante o decorrer do ciclo da cultura. Em contrapartida, a bactéria recebe energia e nutrientes da planta (HUNGRIA et. al. 2007).

Esse processo simbiótico é responsável por viabilizar a cultura da soja e seu cultivo tanto economicamente quanto ambientalmente, reduzindo o uso de adubos nitrogenados. Dentro desse contexto não se pode deixar de lado a importância dos micronutrientes minerais para a eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio (N).

O cobalto (Co) e o molibdênio (Mo) são os micronutrientes de maior importância para a fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja (HUNGRIA et al., 2001). O molibdênio está associado à nitrogenase, uma enzima responsável pelo metabolismo do nitrogênio (N) nas plantas e o cobalto à bactéria, fazendo parte da estrutura das vitaminas B12 necessária para a síntese de cobalamina que participa das reações metabólicas do nitrogênio (N) e formação de leghemoglobina, a qual possui uma estreita relação com o oxigênio, e regula sua concentração nos nódulos impedindo a inativação da enzima nitrogenase (CERETTA et al., 2005).

A recomendação de molibdênio na cultura da soja, para os estados do RS e SC, varia conforme o pH do solo pois a disponibilidade desse micronutriente é maior em solos com pH maior que 5,5. De uma forma geral as doses deste nutriente variam 12 a 25 g ha⁻¹ no tratamento de sementes ou 20 a 50 g ha⁻¹ via foliar podendo ser aplicado do estágio de V3 ao V5 (correspondente a aproximadamente 30 dias após a semeadura), esse período pode variar conforme o ciclo da cultivar semeada e condições ambientais para o desenvolvimento inicial da mesma.

O cobalto é um micronutriente importante para os rizóbios, tendo importância indireta para as plantas. A quantidade recomendada deste nutriente não deve ultrapassar 3 g ha⁻¹, a fim de evitar a ocorrência de fitotoxicidade que esse cátion pode gerar nas plantas de soja (CQFS, 2016).

Nesse contexto, em que há uma crescente demanda mundial por produção de soja, a qual é dependente do fornecimento de N, alternativas que maximizem ou potencializem o fornecimento desse nutriente são importantes. Para essa temática, há diversos trabalhos que estudam a viabilidade de adubação mineral suplementar de N (LAMOND & WESLEY, 2001). Porém, ela tem se mostrado inviável tanto do ponto de vista ambiental quanto econômica. Assim, a coinoculação, que seria a adição da bactéria *Azospirillum brasiliense*, apresenta-se como uma estratégia potencial de

produção. *Azospirillum* é uma bactéria associativa de vida livre, que beneficia as plantas por meio da liberação de fitormônios, como giberelinas, citocininas e ácido indol acético (TIEN et al., 1979).

O benefício dessa associação se dá de forma indireta, pois consiste em aumentar o volume do sistema radicular da cultura da soja explorando mais área de solo e conseqüentemente influenciando na nodulação e absorção de nutrientes (GITTI, 2016). Pelo fato de a bactéria ser de vida livre, seu benefício também pode se refletir nas culturas sucessoras, uma vez que a bactéria demonstra grande eficiência para o desenvolvimento radicular de plantas da família das *Poaceae*, principalmente milho (GITTI, 2016). Segundo Hungria (2013) o ganho médio pela reinoculação anual de *Bradyrhizobium* na cultura da soja foi de 8,6% no rendimento de grãos, em relação ao controle sem reinoculação, ocorrendo um incremento de 16,1% pela coinoculação (*Bradyrhizobium*+*Azospirillum*).

Dado o exposto, o objetivo do presente trabalho foi realizar a inoculação com *Bradyrhizobium* e avaliar o efeito da coinoculação (*Bradyrhizobium* + *Azospirillum*) associada ou não à aplicação de CoMo em diferentes estádios fenológicos da cultura da soja sobre componentes de rendimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DA SOJA E IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO

O cultivo da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) teve seus primeiros registros realizados por um imperador Chinês Shen Nung no ano de 2.838 antes de Cristo, sendo o mesmo consagrado um dos pioneiros da agricultura na Ásia (CESB, 2018).

No Brasil os primeiros relatos de soja ocorreram no ano de 1882 com germoplasma procedente dos Estados Unidos da América (EUA) pelo professor da Escola Agrícola da Bahia Gustavo D'Utra, contribuindo para a distribuição da cultura no estado, sendo esse o registro mais antigo que se tem da soja no país

(COSTA,1996). Devido a fatores de adaptação climática onde a soja foi inicialmente testada, região com clima tropical e latitude baixa (12°S) a cultura não se adaptou e fracassou comercialmente. Alguns anos mais tarde em 1982, cultivares de soja foram introduzidas no município de Campinas, São Paulo, latitude (22°S) e clima tropical, avaliadas pelo IAC-Instituto Agrônomo de Campinas, onde foram realizadas as primeiras observações pelo cientista Franz Wilhelm Dafert, apresentando melhor desempenho quando comparado ao estado anterior, porém não sendo cultivada em escala comercial.

No Rio Grande do Sul (RS), segundo relatos, a soja foi introduzida e cultivada no ano de 1900 em uma fazenda no município de Dom Pedrito, pelo engenheiro agrônomo Alberto Welhauser, sendo publicado o primeiro trabalho no estado em 1901 (COSTA, 1996). Assim como nos EUA, as primeiras cultivares de soja foram utilizadas para alimentação animal, não possuindo foco para produção de grãos e derivados na alimentação humana (EMBRAPA, 2004).

Em 1931 houve a introdução da variedade Amarela do RS, a qual foi durante anos responsável por 95% da soja produzida no estado possibilitando que o RS fosse o primeiro com produção comercial no país (COSTA, 1996).

A cultura se adaptou bem no estado do Rio Grande do Sul devido a latitude (28° a 34°S) e o clima temperado serem semelhantes à região dos Estados Unidos de onde os primeiros germoplasmas foram trazidos (EMBRAPA, 2004).

A cultura da soja se mantém desde a safra de 2009 em quarto lugar na escala de produção mundial de grãos, tendo a sua frente as culturas do milho, trigo e arroz (AMIS, 2018).

Devido as suas características nutricionais, principalmente relacionadas ao teor de proteína (tanto para alimentação humana quanto para animal) e o óleo (utilizado principalmente na produção de biocombustíveis), a cultura apresenta grande importância econômica. O Brasil foi o maior produtor de soja nas safras 2019/2020 e projetasse que será na safra 2020/2021(USDA, 2021). O aumento na produção de soja no Brasil ocorreu principalmente devido ao acréscimo de áreas semeadas sendo de 21.849,00 milhões de hectares do ano 2000 até 2018 onde se teve um aumento de produtividade de 455 kg por hectare quando comparado com as estimativas da safra atual (CONAB, 2019).

O uso de biotecnologias, melhoramento de plantas, proteção de cultivos, manejo do solo, máquinas agrícolas e fertilizantes também contribuíram muito com esses fatores. Dentro desse contexto se encontra a técnica de inoculação da soja com bactérias, as quais tem como função principal de converter o nitrogênio molecular (N_2), transformando-o em amônia (NH_3) através de um processo simbiótico (TAIZ & ZIEGER, 2004), fornecendo o (N) de forma assimilada para a planta descartando o uso de fertilizantes nitrogenados industrializados os quais são prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana.

O nitrogênio é o segundo componente mais importante da célula após a água, sendo encontrado em muitos compostos orgânicos, abrangendo todos os aminoácidos e ácidos nucleicos. Esse elemento tem como principais funções catalisar e orientar o metabolismo celular, também atuando em outros diversos processos metabólicos, fazendo parte da constituição de hormônios, e interferindo diretamente no processo fotossintético, além de participar na constituição da molécula de clorofila segundo SALLISBURY e ROSS (1969, apud, EPSTEIN & BLOOM, 2004). Fato esse que comprova a demanda maior de nitrogênio nas plantas quando comparado com outros nutrientes minerais. Os principais sintomas de deficiência do nutriente são, a clorose generalizada e o hábito estiolado, fatores que afetam a formação de raízes, fotossíntese, produção e translocação de fotoassimilados (TAIZ & ZIEGER, 2004).

Segundo análises com base em teores medidos de 16.472 acessos do banco de germoplasma da Embrapa Soja, a soja possui um alto teor de proteína podendo variar de 31,7 a 57,9% e a concentração de óleo varia de 8,0 a 25,4%, média de 44,3 e 17,9% (base seca), respectivamente. É a principal matéria prima para produção de rações, óleo e biocombustíveis (PÍPOLO et al., 2015).

Segundo Planchon, (2000, apud PÍPOLO et al., 2015) a FBN está ligada diretamente aos teores de proteína e óleo no grão de soja, sendo que durante o período reprodutivo o qual se estende até R6 + 10 dias, contribuiu para uma maior concentração de proteína no grão.

Nesse contexto é importante mencionar que 90% do nitrogênio é fornecido pela FBN, justificando a importância da inoculação com bactérias (EPSTEIN & BLOOM, 2004).

2.2 CICLO BIOGEOQUÍMICO DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante encontrado na atmosfera terrestre (78%) onde se encontra na forma de gás também denominado de nitrogênio molecular (N_2). No solo, a maior parte do nitrogênio (98%) encontra-se na forma orgânica (alfa amínica, ácidos nucleicos, amino açúcares, produtos de condensação e complexos com lignina) presentes principalmente na matéria orgânica do solo, e 2% na forma mineral, como amônia (NH_3), amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (MALAVOLTA, 2006).

As raízes das plantas absorvem o N do solo, principalmente na forma de íons NH_4^+ e NO_3^- , presentes na solução do solo, sendo que a mistura de ambos elementos fornece uma absorção mais equilibrada para planta, já que a absorção de NH_4^+ reduz o pH do meio (rizosfera) e o NO_3^- aumenta (BRADY e WEIL, 2013).

Para aumentar a produção agrícola, produtores rurais de todo mundo aplicam mais de 80 milhões de toneladas cúbicas de fertilizantes nitrogenados por ano. Infelizmente uma grande parte desses fertilizantes se perde quando aplicados ao solo, principalmente por lixiviação para bacias hidrográficas e afluentes, ou volatilizando para a atmosfera. Essa última perda pode chegar a 50% segundo Cameron e Haynes (1986, apud, EPSTEIN e BLOOM, 2004).

O consumo de fertilizantes minerais no Brasil superou a marca de 22 milhões de toneladas, sendo a ureia e o sulfato de amônio as fontes mais utilizadas (BRASIL, 2008, ABISOLO, 2019). O Brasil é um grande importador de fertilizantes nitrogenados, chegando 8,8 milhões de toneladas importadas em 2018. Desse total, 5,4 milhões de toneladas referem-se à ureia e 2,3 milhões a sulfato de amônio.

Segundo projeções da Anda (2009) o uso de fertilizantes nitrogenados vem crescendo nos últimos anos com estimativas de se chegar a 118.763 mil toneladas até 2020. Fato que se comprova pelo informe técnico do Ministério de Minas e Energia (2019), no qual consta que o Brasil importou cerca de 9 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados em 2018. Caso melhorias não sejam realizadas para a redução das perdas de nitrogênio e seu melhor aproveitamento pelas plantas, o desperdício desse recurso valioso irá aumentar e também os riscos e danos que os

resíduos do mesmo ocasionam a saúde humana e a todo o ecossistema segundo Natural Research Council (1989, apud, EPSTEIN & BLOOM 2004).

Dentro desse contexto tem se a importância do uso de inoculantes e da coinoculação para as plantas, principalmente em algumas espécies das famílias *Poaceae* e *Fabaceae*, sendo que para essa última família há inoculantes capazes de eliminar totalmente ou parcialmente o uso de fertilizantes nitrogenados, suprimindo essa demanda de forma sustentável.

O nitrogênio atmosférico, apesar de ser muito abundante, é pouco acessível para os organismos vivos, devido a sua tripla ligação covalente. Nesse contexto são necessários diversos processos de transformação para quebrar essas ligações, as quais ocorrem na atmosfera e no solo, exigindo uma grande quantidade de energia.

No ciclo biogeoquímico do nitrogênio, as três formas principais de adição do elemento ao sistema são: fixação atmosférica, fixação industrial e fixação biológica. As duas últimas convertem o nitrogênio molecular a amônia (NH_3) ou amônio (NH_4^+).

Na fixação industrial o nitrogênio (N_2) e o hidrogênio (H_2) moleculares são submetidos a elevadas temperaturas (400 a 600 °C) e altas pressões (20-40 MPa) em um catalisador metálico (usualmente ferro), esse processo é denominado de *Harber-Bosche*, que foi desenvolvido no decorrer da primeira guerra mundial, é que se fabricam os fertilizantes nitrogenados.

A fixação atmosférica se dá por meio de relâmpagos, sendo essa via responsável por cerca de 8% do N do ciclo. Nesse processo, há conversão do vapor de água e oxigênio em radicais hidroxilas livres altamente reativas, que “atacam” a molécula de N para formar ácido nítrico (HNO_3), o qual será conduzido para o solo por meio de precipitação. Também se tem um adicional de 2% do N fixado naturalmente que é derivado de reação fotoquímica entre o óxido nítrico gasoso e o ozônio, produzindo ácido nítrico. O restante do N naturalmente fixado (90%) são fornecidos pela FBN, cujo processo é realizado por bactérias simbióticas e de vida livre.

A fixação natural (soma entre a fixação atmosférica e biológica) de N equivale a uma taxa de 190×10^{12} gramas de N por ano (figura 1).

Processo	Definição	Taxa (10^{12} g.ano ⁻¹)
Fixação industrial	Conversão industrial de nitrogênio molecular a amônia	80
Fixação atmosférica	Conversão por relâmpagos e fotoquímica de nitrogênio molecular a nitrato	19
Fixação biológica	Conversão de nitrogênio molecular a amônia, por procariotos	170
Aquisição por plantas	Absorção e assimilação de amônia ou nitrato pelas plantas	1200
Imobilização	Absorção e assimilação microbiana de amônio ou nitrato	
Amonificação	Catabolismo de matéria orgânica do solo em amônio, por bactérias ou fungos	
Nitrificação	Oxidação bacteriana (<i>Nitrosomonas</i> sp) de amônio a nitrito e subsequente oxidação bacteriana (<i>Nitrobacter</i> sp) de nitrito a nitrato	
Mineralização	Catabolismo por bactérias ou fungos de matéria orgânica do solo em nitrogênio mineral, por meio de amonificação ou nitrificação	
Volatilização	Perda física de amônia gasosa para a atmosfera	100
Fixação de amônio	Incorporação física de amônio em partículas do solo	10
Denitrificação	Conversão bacteriana de nitrato a óxido nitroso e nitrogênio molecular gasoso	210
Lixiviação de nitrato	Fluxo físico de nitrato dissolvido em água subterrânea para fora da camada superior do solo e eventualmente, em direção aos oceanos	36

^a Os organismos terrestres, o solo e os oceanos contêm cerca de $5,2 \times 10^{15}$ g, 95×10^{15} g e $6,5 \times 10^{15}$ g, respectivamente, de nitrogênio orgânico que está ativo no ciclo. Assumindo que a quantidade de nitrogênio molecular atmosférico permanece constante (isto é, entradas = saídas), o tempo de residência médio do nitrogênio em formas orgânicas é cerca de 370 anos [(tamanho do reservatório)/(fixação do que entra) = $(5,2 \times 10^5 \text{ g} + 95 \times 10^5 \text{ g}) / (80 \times 10^{12} \text{ g.ano}^{-1} + 170 \times 10^{12} \text{ g.ano}^{-1})$]. Fonte: Com base em Schlesinger, 1997.

Figura 1: Principais processos que fazem parte do ciclo biogeoquímico de N.
Fonte: Epstein & Bloom, 2004 com base em Schesinger, 1997.

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGENIO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo natural que consiste na conversão do nitrogênio molecular (N_2) a outras formas amoniacais principalmente amônia (NH_3) e amônio (NH_4^+).

Em nível mundial, dados estimam que a quantidade de nitrogênio fixada biologicamente varia de 139-170 milhões de $Mg \text{ ano}^{-1}$ já a fixação química por fertilizantes nitrogenados contribui com estimados 65 milhões $Mg \text{ ano}^{-1}$, demonstrando a quão vantajosa é a substituição de fertilizantes nitrogenados por bactérias fixadoras de nitrogênio, sendo que esse manejo só na cultura da soja

representa uma economia em torno de 7,46 bilhões de reais na agricultura brasileira (MOREIRA,2008).

Esse processo pode ocorrer por meio de um grande espectro de bactérias do solo, sendo esses gêneros separados entre fixadores simbiotes de nitrogênio, tendo como principais gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, e fixadores de vida livre, como, por exemplo, os gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Bacillus*. Ambos os grupos realizam a FBN utilizando a enzima nitrogenase como redutora e catalisadora da reação, porém o ciclo ocorre de formas diferentes e, conforme condições, podem gerar outros produtos. Na (figura 2 e tabela 1) podem ser vistas algumas diferenças, sumarizadas, entre os dois processos.

Reação	Processo
$N_2 \rightarrow NH_3$	Fixação de nitrogênio
$N_2O \rightarrow N_2 + H_2O$	Redução do óxido nitroso
$N_3^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Redução de azida
$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$	Redução do acetileno
$2 H^+ \rightarrow H_2$	Produção de H_2
$ATP \rightarrow ADP + P_i$	Hidrólise de ATP

Fonte: Burris, 1976

Figura 2: Reações catalisadas pela nitrogenase

Fonte: Epstein & Bloom,2004 adaptado de Burris,1976.

Quadro 1: Principais diferenças entre bactérias associativas e não associativas.

Bactérias simbiotes (<i>Bradyrhizobium</i>)	Bactérias de vida livre associativas (<i>Azospirillum</i>)
Bactéria não possui a enzima nitrogenase fora da rizosfera, a mesma só é gerada quando a bactéria se encontra no interior do nódulo, sob a forma de bacteróide. Processo é anaeróbico. Porém a bactéria é aeróbica.	Possui a enzima nitrogenase em sua célula. Sendo essa bactéria aeróbica.
Não fixa nitrogênio sem estar associada a planta	Fixa nitrogênio sem estar associada a planta
Penetram nos pelos radiculares e formam nódulos	Penetram nos pelos radiculares, mas não formam nódulos
Para fixar nitrogênio precisa da formação de nódulos	Fixam nitrogênio independente da formação de nódulos
A planta tem um papel fundamental na regulação e funcionamento dos nódulos	Planta tem um papel menos importante na regulação da associação

Fonte: ANPII- Associação Nacional dos Produtores de inoculantes, 2019.

2.3.1 Fixação Simbiótica de Nitrogênio

Dentro desse grande espectro de microrganismos alguns formam associações simbióticas com a rizosfera das plantas, principalmente as pertencentes à família *Fabaceae*. Essas bactérias são denominadas coletivamente de rizóbios, grupo que inclui a espécie *Bradyrhizobium*, principal responsável pela FBN na cultura da soja.

Esse processo de fixação ocorre por meio do complexo da enzima nitrogenase, a qual catalisa essa reação $N_2 + 8 e^- + 8 H + 16 ATP = 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$.

A enzima nitrogenase pode ser dividida em dois componentes principais, as proteínas Fe e MoFe. Dentro desse contexto, a proteína Fe é a menor, contando com duas subunidades idênticas, cada unidade possuindo um agrupamento (4Fe e 4S²⁻), os quais participam e contribuem para o processo de oxirredução e conversão do N₂ a NH₃. Já o complexo da proteína MoFe possui quatro subunidades, sendo que cada uma dessas possui duas aglomerações de Mo-Fe-S (EPSTEIN & BLOOM, 2004).

Seguindo esse complexo a ferredoxina entra com a função de doar elétrons para a proteína Fe (figura 3), a qual hidrolisa a moeda energética adenosina trifosfato (ATP) e reduz a proteína MoFe, essa por fim reduz a N₂ e a NH₃ (EPSTEIN & BLOOM, 2004).

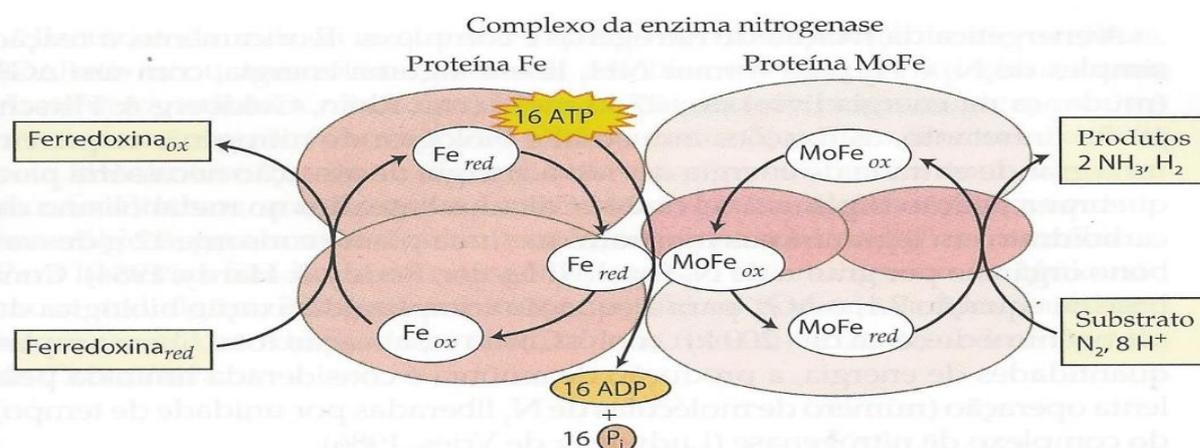


Figura 3: Reação de redução catalisada pela nitrogenase: Ferredoxina reduz a proteína Fe. A ligação e hidrólise de ATP da proteína Fe é considerada causadora de uma mudança na conformação de tal proteína, facilitando as reações de oxi-redução. **Fonte:** Epstein & Bloom, 2004.

Segundo Evans et. Al. (1988, apud, EPSTEIN & BLOOM, 2004) sob condições normais a nitrogenase também reduz H^+ a H_2 gasoso e esse processo pode competir com a redução de N_2 . Dessa forma, de 30 a 60% da energia que o rizóbio fornece para nitrogenase pode ser perdida como hidrogênio molecular (H_2), prejudicando diretamente a FBN (Schubert, Lennigs e Evans, 1978).

Esse processo deve ocorrer na ausência de oxigênio, ou seja, de forma anaeróbica, porque tanto a proteína Fe e como a MoFe são inativadas de forma irreversível quando em contato com o oxigênio.

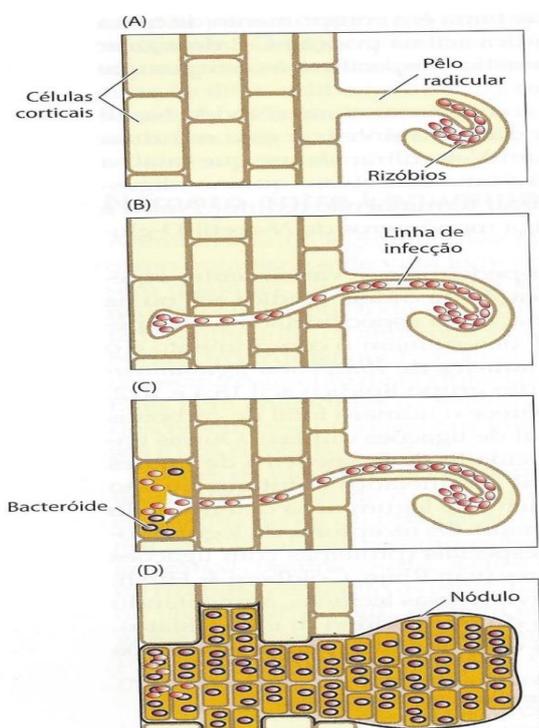
A nitrogenase funciona sobre condições anaeróbicas, porém, a bactéria acaba criando um ambiente externo com 21% de oxigênio para manter o rizóbio vivo, já que esse microrganismo faz respiração aeróbica para obtenção de energia (EPSTEIN & BLOOM, 2004). Acrescenta-se que esse processo de regulação da permeabilidade gasosa é uma característica importante da família *Fabaceae* à qual mantem um nível de oxigênio interno suficiente para respiração do rizóbio, porém baixo para evitar a inativação da nitrogenase.

Para esse controle interno de oxigênio, os nódulos contêm uma proteína heme a qual se liga ao oxigênio, sendo chamada de leghemoglobina. Essa proteína está presente no citoplasma da célula nodular caracterizando a coloração rosada do rizóbio e sinalizando que essa estrutura está funcional e ativa. A planta hospedeira produz a porção globina da leghemoglobina em resposta a infecção da rizosfera já a bactéria simbiote produz a porção heme formando essa hemoproteína. Segundo Denison e Harter (1995, apud, BRADY; WEIL, 2013), a principal função desse componente seria facilitar a difusão de oxigênio para as células bacterianas simbiotes aeróbicas, ou seja, é um meio de proteger a enzima nitrogenase do oxigênio livre (BRADY; WEIL, 2013).

A infecção da planta hospedeira pelas bactérias ocorre em primeiro estágio devido a liberação de exsudatos da raiz, principalmente (iso)-flavonoides e betaínas, ou seja, por resposta quimiotática, como exemplifica a figura 4. Esses atrativos acabam ativando proteínas específicas dos rizóbios conhecidos como NodD, o qual acaba transcrevendo a produção de outros genes Nod com funções distintas nesse processo de simbiose, sendo a principal função facilitar a ligação do rizóbio às paredes celulares de um pelo radicular.

Fatores Nod são moléculas sinalizadoras oligossacarídeas de lipo-quitina, que geralmente são similares em estrutura. Os tamanhos dos nódulos vão se adaptando conforme a necessidade de nitrogênio e estágio em que a planta infectada se encontra.

O processo de nodulação ocorre aproximadamente duas horas após o contato da bactéria com as raízes. Sendo que os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas dos pelos radiculares, considerada a região preferencial para a infecção da bactéria fixadora (FAGAN, 2007).



A) Ligação dos rizóbios ao pelo radicular, levando o mesmo a se curvar. Degradam a parede do pelo radicular e formam uma veia de infecção.

B) Veia de infecção penetra no córtex da raiz.

C) Os rizóbios entram em uma célula cortical, estimulam a divisão celular e tornam-se bacteróides.

D) Nódulo formado

Figura 4: Processo de infecção e desenvolvimento de um nódulo na rizosfera de plantas da família Fabaceae. **Fonte:** Epstein & Bloom, 2004.

O processo de FBN é semelhante à produção de nitrogênio industrial produzindo amônia (NH_3) a partir de hidrogênio (H_2) e nitrogênio (N_2) molecular. Já os procariotos que realizam a fixação de N_2 , em contraste com os processos industriais, conduzem essas reações por meio de temperatura e pressão do ambiente. O processo de redução do N_2 a NH_3 e posteriormente NH_4^+ pela planta ocorre devido a

simbiose entre as bactérias *Bradyrhizobium elkanii* ou *Bradyrhizobium japonicum* e a raiz da cultura. Com essa associação, as bactérias formam estruturas denominadas de nódulos nas raízes que conseguem captar o N_2 da atmosfera, sendo quem realiza a primeira etapa da conversão são esses microorganismos por meio da enzima nitrogenase. Ocorre a redução do N_2 em NH_3 , após essa redução o NH_3 é absorvido pelo nódulo onde o mesmo incorpora rapidamente moléculas de H^+ , transformando o NH_3 em NH_4^+ que se distribui pela planta hospedeira fornecendo nitrogênio de diversas formas para a mesma (HUNGRIA et al, 2007).

Essas bactérias podem ser aplicadas no tratamento das sementes, de preferência, imediatamente antes da semeadura da cultura. Já existem também sistemas específicos nas semeadoras que permitem aplicar os inoculantes com jato dirigido diretamente no sulco de semeadura.

Dessa forma, a aplicação de inoculantes no solo é de suma importância para o enriquecimento de N do mesmo, levando em consideração que esse processo fixa até $372 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ para cultura da soja, suprimindo a necessidade desse nutriente e tornando desnecessário o uso de fertilizantes nitrogenados nessa cultura (CIAMPITTI et al, 2018).

2.3.2 Fixação Associativa de Nitrogênio

As associações entre bactérias diazotróficas e plantas leguminosas são denominadas comumente de fixação de nitrogênio associativa (EPSTEIN & BLOOM 2004).

Ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada. Isso acontece após a morte dessas bactérias e pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio. Contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (PARANA, 2011).

Neste grupo se encontram as bactérias do gênero *Azospirillum*, que ganharam grande destaque mundial a partir da década de 1970 (DOBEREINER et al., 1976), com a descoberta pela pesquisadora da Embrapa, Dra. Johanna Döbereiner (1924-2000), sobre a capacidade de fixação biológica do nitrogênio dessas bactérias quando em associação com gramíneas (PARANA, 2011).

A localização da bactéria *Azospirillum* na rizosfera de plantas da família *Poaceae* ocorre de forma mais concentrada na superfície das raízes, principalmente em torno da zona de crescimento e nos pelos radiculares (EPSTEIN e BLOOM 2004). Segundo Siqueira e Franco (1988, apud, MELLO, 2012) ocorrem também entre espaços intercelulares ou até dentro de algumas células da raiz e vivem sem estabelecer relações simbióticas.

Esse grupo de bactérias fornece nitrogênio às plantas por meio da seguinte reação $N_2 + 3H_2 + \text{ENERGIA} = 2NH_3$, a qual é realizada pela enzima nitrogenase (MALVOLTA, 2006).

A fixação de nitrogênio por essas bactérias é baixa (entre 5 a 20 kg ha⁻¹ ano⁻¹) quando comparada a necessidade exigida pelas grandes culturas produtoras de grãos, porém o suficiente para suprir esse nutriente em florestas naturais e pastagens (BRADY e WEIL, 2013).

Os incrementos que ocorrem em grandes culturas, provém da produção de fitormônios pela bactéria, os quais auxinas, citocinas e giberelinas auxiliam no desenvolvimento da rizosfera agindo como promotores de crescimento (EPSTEIN e BLOOM, 2004). Esses compostos também na nutrição de plantas e produzem sideróforos, antibióticos, geram a competição por nutrientes e sítios de infecção, características que influenciam no controle biológico de patógenos (MOREIRA et al, 2006).

A partir desses fatores também puderam ser observados efeitos no incremento da absorção da água e minerais, maior tolerância a estresses como salinidade e seca, resultando em uma planta mais vigorosa e produtiva (BASHAN et al., 2004). Essa associação não é considerada uma simbiose verdadeira e sim uma fixação associativa de nitrogênio. Segundo Meert et al. (2020), a técnica de coinoculação aumentou significativamente a produção da cultura da soja quando comparado com apenas a inoculação. Resultados semelhantes também foram encontrados por Galindo et al.

(2018), que observaram que o uso de coinoculação maior peso de grãos, maior número de vagens por planta e maior produção na cultura da soja.

2.3.3 A prática de coinoculação

A técnica de coinoculação, que pressupõe o uso de duas bactérias, tem ganhado atenção da pesquisa. Além de possuir um baixo custo quando comparado aos demais manejos da área, apresenta resultados promissores a curto e longo prazo, trazendo efeitos benéficos ao sistema de cultivo como um todo.

Franzen et al. (2019), estudaram a população de bactérias assimbióticas na camada dos primeiros 5 cm de solo e também a fixação e conversão de N pelas mesmas, durante 6 anos, em diversas regiões dos EUA e em diferentes culturas sob dois sistemas de cultivo (sistema de plantio direto e sistema convencional). Os resultados apontaram uma maior disponibilidade e conversão de N por essas bactérias, que além de converter retém o denominado N microbiano, o qual se perde menos por lixiviação e desnitrificação. Com base nessas informações é possível concluir que no sistema de plantio direto se tem mais nitrogênio disponível para as plantas de forma natural no solo, comprovando a viabilidade da prática de coinoculação e possibilitando a redução dos custos com aplicação de fertilizantes nitrogenados industrializados e também os danos que os mesmos ocasionam ao meio ambiente (FRANZEN et al, 2019).

2.3.4 O registro, a seleção e a produção de inoculantes

O inoculante, por definição legal, como se encontra na legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA, é “todo o produto que contenha microrganismos favoráveis ao crescimento de plantas”. Esse produto pode ser produzido por pessoas físicas ou jurídicas, porém as mesmas são obrigadas a

promover o seu registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, conforme dispuser o regulamento.

No mercado os inoculantes são encontrados em duas formas sólidos (em pó, tendo a turfa como suporte para as bactérias) e fluídos (líquidos, com a bactéria estabilizada em seus processos metabólicos por protetores celulares).

A primeira etapa para a fabricação de inoculantes é a seleção de estirpes, as quais diferem entre si pela capacidade de fixar nitrogênio, capacidade de sobrevivência em condições adversas e capacidade de competição com bactérias nativas do solo também denominadas de estirpes rizobianas. Dentro desse contexto são muitos anos de pesquisa realizados por órgãos como a Embrapa Soja, a Embrapa Cerrados, a Embrapa Agrobiologia e Embrapa Agropecuária de Centro Oeste, bem como a FEPAGRO (P. Alegre, RS), UFLA e o IAC (Campinas, SP), entre outras.

O processo de seleção inicia em casa de vegetação, em vasos com areia e solução nutritiva, após vasos com solo e, posteriormente, testes de campo em diversas regiões do Brasil, com experimentação em redes, por três ou mais anos.

Após selecionadas as estirpes elas são apresentadas na RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), onde se reúnem produtores de inoculantes, pesquisadores e o MAPA.

Se as estirpes apresentadas forem aprovadas é feito o registro no MAPA e, assim, tornando-as aptas a serem produzidas. Por lei no Brasil só é permitida a fabricação de materiais que passem por essa avaliação.

Estas estirpes ficam guardadas em um Banco de Estirpes, localizado na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul - FEPAGRO, em Porto Alegre e anualmente este banco envia as estirpes liofilizadas para as empresas registradas no MAPA.

As estirpes são recebidas por produtores dentro de uma ampola, sendo essa aberta apenas em câmara asséptica (câmara de fluxo laminar) para evitar a contaminação. Após esse procedimento é repicada para tubo ou placa de Petri com meio de cultura apropriado, onde a bactéria irá se desenvolver. A seguir, vai sendo desenvolvida sempre em maior escala, até chegar aos fermentadores para ser cultivada em grande volume de meio de cultura líquido.

Conforme a indústria, há fermentadores de diversos tamanhos, podendo variar de 200 a 2.000 L ou mais. Estes fermentadores são aerados com ar filtrado em filtros absoluto, sendo o caldo permanentemente agitado, visando de obter uma boa homogeneização do crescimento bacteriano.

Após o caldo atingir uma elevada concentração (acima de 5×10^9 bactérias por mL), é feita a segunda etapa do processo que é a mistura com a turfa (inoculante em pó) ou com os protetores celulares (inoculante líquido) (ANAIS DA XVII RELARE, 2016).

No caso do sólido, a turfa é extraída da jazida, seca, moída e tem seu pH corrigido. A seguir é embalada já na embalagem final e enviada para esterilização por raios gama, visando eliminar todos os microrganismos ali existentes, ficando apta a receber a cultura do rizóbio que crescerá livre de competição e antagonistas. Como operação seguinte, o caldo é injetado nos pacotes e o inoculante ficará alguns dias em maturação para que a bactéria se desenvolva na turfa.

Já no inoculante líquido, a bactéria é misturada com substâncias protetoras, também esterilizadas, e em sequência vão para as embalagens finais, que podem ser frascos ou sachês, conforme a empresa.

Todas estas operações são de extrema complexidade e devem ser executadas por pessoal especializado e em ambientes dotados da maior assepsia, pois o risco de contaminação por microrganismos do ar é muito grande.

O inoculante hoje é regulado por lei específica e por diversas portarias do MAPA, visando garantir que o produto chegue dentro das condições especificadas às mãos do agricultor. Os fiscais do Ministério fiscalizam rigorosamente as empresas de inoculantes, coletando amostras que são enviadas ao laboratório de referência para análise oficial. As empresas que tiverem amostras fora do padrão poderão ser penalizadas por multas, embargo do produto ou até suspensão ou cassação do registro (ARAUJO & VASCONCELOS, 2016).

Para obter registro, um inoculante deverá garantir no mínimo 1×10^9 (um bilhão) de células de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* por grama ou mL de produto até o final do prazo de validade, que não poderá ser menor que seis meses. Cada empresa poderá registrar qualquer concentração acima desta, garantindo-a até o vencimento. O inoculante também deverá ter um baixo nível de contaminantes. A legislação exige

que o inoculante não apresente contaminantes abaixo da diluição 1×10^5 (ANAIS DA XVII RELARE, 2016).

2.4 COBALTO E MOLIBDÊNIO NA CULTURA DA SOJA E A SUA RELAÇÃO COM A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGENIO.

O cobalto é um metal originado principalmente da cobaltina e encontra-se abundantemente em minerais e rochas no solo. Seu teor no solo se encontra em média de 10-15 mg kg⁻¹, com maior proporção nos horizontes ricos em matéria orgânica e argila (MALAVOLTA, 2006).

Esse micronutriente tem sido aplicado via tratamento de sementes e via foliar no Brasil, em conjunto com o molibdênio. É absorvido pelas raízes na forma de Co²⁺, considerado móvel no floema, fato que também viabiliza a aplicação foliar. É considerado elemento químico essencial para as plantas da família *Fabaceae* pois está diretamente ligado a síntese de cobalamina e leghemoglobina nos rizóbios, o que tem reflexos na FBN (SFREDO et al, 2010).

O cobalto também ativa várias enzimas entre elas a isomerase da metilmalinil C₆, a qual participa da biossíntese dos núcleos pirrólicos, os quais estão presentes em quantidades significativas na clorofila, ou seja, em todas as plantas verdes (MALVAOLTA, 2006). O Co também tem relação com a indução à absorção de níquel, que é a enzima urease, encontrada em quase todos os solos e possui função de hidrolisar rapidamente a ureia liberando de gás carbônico (CO₂) e NH₃ (MOREIRA et al, 2006).

O Co também é essencial para a fixação de N₂ por bactérias de vida livre e como citado anteriormente e em sistemas simbióticos por fazer parte da vitamina B12 a qual é essencial para a biossíntese da leghemoglobina (MALAVOLTA, 2006).

As últimas recomendações para cobalto foram testadas em 2003 pela Embrapa Soja, recomendando de 2 a 3 g ha⁻¹ para aplicação via semente e foliar.

Conforme Krauskopf (1972), o molibdênio é um ânion no solo e tem sua disponibilidade aumentada com o pH. Os minerais que mais possuem esse metal são

sulfeto molibdenita, molibdatos entre outros. O seu teor no solo é consequência da sua concentração na rocha mãe que a partir do intemperismo vai liberando esse metal. Outras fontes de Mo no solo derivam de ação antropogênica seja pela queima de combustíveis fósseis, fundições, aplicação via tratamento de sementes e via foliar em culturas, e lodo de esgoto (MALAVOLTA,2006). Numa escala mundial esse metal se encontra na faixa de 1 a 2 mg kg⁻¹ no solo. Quando o valor do pH do meio for igual ou maior que 5,0 o molibdênio é absorvido pelas plantas, principalmente, como molibdato (MoO₄²⁻).

O molibdênio tem média mobilidade no floema e mais de 58% do Mo requerido pela soja é absorvido nos primeiros 45 dias de desenvolvimento da cultura. Por ser muito móvel na planta os sintomas de sua deficiência aparecem nas folhas mais velhas. Estes sintomas são caracterizados por plantas amareladas e folhas jovens retorcidas, com manchas necróticas nas margens dos folíolos semelhantes ao do nitrogênio (SFREDO et al, 2010).

Esse micronutriente é um cofator na enzima nitrogenase, redutase do nitrato e oxidase do sulfeto e está diretamente relacionado ao transporte de elétrons durante as reações bioquímicas. Então, considera-se o Mo diretamente relacionado com o metabolismo do N, participando da FBN e da redução do nitrato. Estudos também indicam que plantas bem nutridas desse nutriente tem mais proteínas e ácidos nucleicos, produzindo mais exsudatos que instigam a proliferação de grupos de bactérias na rizosfera, aumentando a deposição e decomposição de matéria orgânica e fornecendo mais nutrientes entre eles indiretamente o nitrogênio (MALAVOLTA, 2006).

As últimas recomendações para molibdênio foram testadas em 2003 pela Embrapa Soja, cuja recomendação é de 15 a 25 g ha⁻¹ para aplicação via semente e foliar.

Estudos indicam resultados positivos da aplicação de CoMo tanto em componentes de rendimento quanto no teor de N foliar em diversas culturas. Na cultura da soja o cobalto aplicado de forma isolada não apresentou resultados significativos no rendimento de grãos (SFREDO et al, 2010). Assim, é importante a aplicação de ambos micronutrientes em conjunto devido a sua importância para a fixação de nitrogênio, levando em consideração que a resposta da soja a esses

nutrientes depende das características de cada solo e presença quantitativa dos mesmos (SFREDO et al, 2010).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na área didática experimental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul - Campus Ibirubá, localizado a 28°39'2.45"S de latitude, 53° 6'23.43"O de longitude e altitude de 466 m.

O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico que são solos derivados do basalto da formação da serra geral, de textura muito argilosa e com elevados teores de Fe_2O_3 .

Segundo o sistema de Köppen, o Rio Grande do Sul se enquadra na zona fundamental temperada ou "C" e no tipo fundamental "Cf" ou temperado úmido. No Estado este tipo "Cf" se subdivide em duas variedades específicas, ou seja, "Cfa" e "Cfb". Sendo na região do município de Ibirubá, temperado com características de subtropical úmido "Cfa".

Previamente à instalação do experimento foram realizados manejos de dessecação da aveia preta, e controle de plantas daninhas com a utilização de pulverizador hidráulico com pontas leque simples, plano angulado modelo Hypro 3D – 020, a uma pressão de 2,0 bar atingindo uma vazão de 100 L ha^{-1} a uma velocidade de 7,5 km h^{-1} . Para esse manejo utilizou-se a técnica de aplicação sequencial de herbicidas, consistindo em uma eficiência maior no processo com uma palhada uniforme facilitando a semeadura. Na primeira aplicação realizada foi Glifosato 3,5 L ha^{-1} + 2,4D 1,8 L ha^{-1} + Cletodim 0,4 L ha^{-1} e para a aplicação sequencial Imazetaphir 1 L ha^{-1} .

A recomendação de adubação química foi realizada baseando-se no resultado laboratorial das análises de solo, o qual foi amostrado nas camadas de 0 a 10 e 10 a 20 cm (Tabela 1). Somente os resultados da camada de 0-10 cm foram utilizados para calcular a adubação. De posse do laudo, foi necessária apenas a aplicação de potássio (K), sendo utilizado na forma de cloreto de potássio (KCl), cuja formula é 00-

00-60, na dose de 133,00 kg ha⁻¹ o equivalente a 80 kg ha⁻¹ de K₂O₅ a lanço manualmente de acordo com o Manual de Adubação e Calagem para os estados do RS e SC, visando 4,8 t ha⁻¹ como estimativa de rendimento de grãos de soja.

Tabela 1 : Propriedades químicas do solo na camada de 0-10 e de 10-20cm de profundidade, da área experimental do IFRS-Campus Ibirubá. Ibirubá-RS, 2019.

PROF.	Argila	pH água	P	K	Al	Ca	Mg	M.O.	V	Co	Mo
cm	%		mg dm ⁻³			cmol _c dm ⁻³		%		mg kg ⁻¹	
0-10cm	54	5,7	51	136	0	5,86	2,94	2,7	55	24,49	165,22
10-20cm	66	5,5	20	55	0	5,26	2,62	2,3	29	21,77	55,07

A semeadura do experimento foi realizada no dia 24/10/2019, utilizando uma semeadora da marca Vence Tudo composta por 7 linhas e espaçamento entre linhas de 45 centímetros. O número de sementes depositadas foi baseado nas recomendações do portfólio da empresa detentora e calculada seguindo o laudo de germinação e vigor resultando na densidade de 18 sementes por metro linear da cultivar de soja DM 53i54 IPRO. As sementes foram tratadas on farm, em máquina dosadora por canecos. A calda do tratamento foi composta por fungicidas Fludioxonil (25 g L⁻¹) + Metalaxil-M (37,5 g L⁻¹) 2 mL kg⁻¹, inseticida Fipronil (250 g L⁻¹) 2 mL kg⁻¹ e água 1 mL.kg⁻¹.

As parcelas foram dimensionadas em 7 linhas de semeadura x 6 metros de comprimento, correspondendo a 18,9 m², totalizando uma área experimental de 680,40 m². O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, em arranjo experimental de faixas, com 12 tratamentos em 3 blocos/repetições. Os tratamentos estão descritos no (quadro 2).

Quadro2: Tratamentos aplicados no experimento contendo cada um 3 repetições totalizando 36 parcelas.

1. Sem inoculante + Testemunha
2. Sem inoculante + CoMo TS
3. Sem inoculante + CoMo V3-V4
4. Sem inoculante + CoMo TS + CoMo V3-V4
5. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + Testemunha
6. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo TS
7. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo V3-V4
8. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo TS + CoMo V3-V4
9. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + Testemunha
10. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo TS
11. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo V3-V4
12. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo TS + CoMo V3-V4

*TS- tratamento de sementes

*CoMo- produto a base de cobalto e molibdênio

*V3-V4- estádios fenológicos onde foi aplicado o produto terceiro nó visível e quarto nó visível.

Para os tratamentos que incluíam a aplicação dos micronutrientes cobalto e molibdênio (CoMo) via tratamento de sementes, o molibdato de sódio 130 g L^{-1} e sulfato de cobalto 13 g L^{-1} , foram adicionados após o tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas, sendo feito individualmente em cada tratamento com uma seringa, na dose de 2 mL kg^{-1} de semente.

Por último, imediatamente antes da semeadura foram realizadas as inoculações. As bactérias utilizadas foram do gênero *Azospirillum brasiliense* estirpes ABV5 e ABV6 com garantia de $2 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$, na dose de 2 mL kg^{-1} resultando em 74.055,55 células viáveis por semente, e *Bradyrhizobium elkanii*, estirpes semia-587 e semia-5019 com garantia de $5 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$, na dose de $2,5 \text{ mL kg}^{-1}$ resultando em 2.315.673,45 células viáveis por semente, ambos produtos de natureza física líquida e dosados com seringa. Em diversos testes essas estirpes demonstraram a melhor capacidade de fixação de nitrogênio e desenvolvimento radicular de *fabaceas* e *poaceas*, sendo assim as estirpes mais comuns utilizadas a nível de campo apresentando uma alta capacidade de competição com bactérias nativas do solo o que acabou acarretando na seleção das mesmas para uso no trabalho.

Nos tratamentos que envolviam a aplicação foliar de CoMo, a operação foi realizada com um pulverizador costal com bico tipo leque e vazão média de 120 l ha^{-1} , na dose de 200 mL ha^{-1} . Esse manejo foi realizado em 28/11/2019, 35 dias após a

semeadura quando a cultivar encontrava-se nos estádios V3-V4 identificados quando a planta apresentar quatro nós visíveis e três trifólios totalmente abertos.

Aos 50 dias após a semeadura (DAS), quando as plantas encontravam-se em estágio fenológico V5-V6 foi realizada a primeira etapa de avaliações, sendo essas, massa seca de raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSA), número de nódulos (NN) e massa seca de nódulos (MSN). Para essa avaliação foram coletadas, com auxílio de pá de corte, 10 plantas de forma casual em cada parcela. Para a avaliação de matéria seca da parte aérea e radicular, a planta de soja foi cortada na região do colo do caule a qual divide parte aérea e raiz. Após a coleta e separação foi realizada a lavagem das raízes em água corrente sobre uma peneira para evitar a perda de nódulos e objetivando remover o excesso de solo, para facilitar a coleta e separação dos nódulos. Posteriormente, esses materiais (raízes e parte aérea) foram colocados na estufa 65°C até se obter o peso constante. Após, o material foi retirado da estufa e realizou-se a pesagem, utilizando uma balança analítica para os nódulos e balança digital para os demais componentes.

A colheita da soja foi realizada dia 03/03/2020 de forma manual, sendo coletadas as 3 linhas centrais do experimento em 3 metros de comprimento (totalizando uma área de amostragem de 4,05 m²). As plantas coletadas foram trilhadas e subsequentemente avaliados os componentes de rendimento: produtividade (P) da soja em kg ha⁻¹ e peso de mil grãos (PMG). Também foi realizada a coleta de 5 plantas por parcela para contar o número de vagens e grãos por vagem (NVG). Para a estimativa da produtividade, foi realizada a correção de impureza e de umidade a 13%. A umidade dos grãos foi determinada usando medidor Motonco modelo 919S, sendo usados 250 g de grãos por amostra. Para peso de mil grãos, procedeu-se a contagem manual de grãos, e quantificação da massa.

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos pelo teste F foram submetidos à comparação de médias pelo teste de Tukey (p<0,05). Utilizou-se o software Sisvar (FERREIRA, 2019).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar as variáveis de massa seca de raízes (MSR), massa seca de parte aérea (MSPA), número de nódulos por planta (NNP) e massa seca de nódulos por planta (MSNP), como podem ser visualizados na (tabela 2), a única variável a apresentar diferença significativa a 5% de significância foi a massa seca de nódulos por planta (MSNP).

Tabela 2: Massa seca de parte aérea e de raízes somadas às variáveis relacionadas a nodulação (nº de nódulos por planta e massa seca de nódulos por planta) em soja cultivada em sistema de semeadura direta usando diferentes aplicações de inoculantes e cobalto e molibdênio. Ibirubá, RS, safra 2019/2020.

Tratamentos	Massa seca de parte aérea(g)	Massa seca de raízes(g)	Nº de nódulos por planta	Massa seca de nódulos planta (mg)
1.Sem inoculante + testemunha	85,16 ns	20,03 ns	18,50 ns	64,53 ab
2.Sem inoculante + CoMo TS	103,60	21,46	18,26	57,19 ab
3.Sem inoculante + CoMo V3-V4	91,03	20,76a	22,20	82,55 a
4.Sem inoculante + CoMo TS + CoMo V3-V4	76,86	17,66	18,00	56,92 ab
5. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + Testemunha	91,96	19,30	18,26	51,99 ab
6. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo TS	95,86	19,76	17,63	59,32 ab
7. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo V3-V4	100,53	22,53	19,40	68,57 ab
8. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo TS + CoMo V3-V4	96,73	21,83	15,30	50,46 b
9. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + Testemunha	121,73	23,70	19,83	55,84 ab
10. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo TS	87,73	18,80	16,70	72,43 ab
11. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo V3-V4	83,80	19,03	22,00	49,47 b
12. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo TS + CoMo V3-V4	98,56	20,90	18,40	62,42 ab
CV (%)	18,57	16,82	24,64	17,52
MÉDIA	94,47	20,48	18,7	60,97

ns: média não significativo pelo teste F.

Salienta-se que as variáveis apresentadas na tabela 2 foram as que apresentaram maior dificuldade durante a coleta, pois é necessário muito cuidado na amostragem de raízes e de nódulos. Normalmente os estudos que abordam essas avaliações são conduzidos em casa de vegetação em vasos com areia e substratos, visando facilitar a coleta de raízes para manter o maior número de componentes da mesma para a amostragem (DE OLIVEIRA et al, 2018; FACHINELLI et al, 2020). O presente experimento foi conduzido em condição de campo em um Latossolo que predominava a fração argila, assim, raízes mais finas e alguns nódulos podem ter permanecido no solo e não terem sido computados na determinação. No entanto, como os cuidados foram padrões, se pressupõe que o erro associado a essas considerações tenha sido o mesmo para todos os tratamentos.

Embora não tenha ocorrido diferenças significativas nas avaliações, as médias variaram tanto nos tratamentos quanto nas variáveis testadas podendo se observar que na massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSR), os valores variaram entre 76,86 g e 121,73 g para MSPA e 17,66 g a 23,70 g MSR, demonstrando que o tratamento 9 composto por *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + Testemunha foi 58,37% maior em MSPA e 34,20% em MSR que o tratamento 4, onde não foi realizada a inoculação e foram realizadas aplicações de cobalto e molibdênio no tratamento de sementes e em aplicação aérea nos estádios fenológicos V3-V4.

Referente à nodulação, foi possível observar em estudos que um parâmetro para identificar se ocorreu uma boa infecção na raiz da soja é se ter um número de 15 a 30 nódulos viáveis ou o equivalente ao peso de 100 a 200 mg de nódulos secos por planta, portando um tamanho igual ou superior a 2 mm (HUNGRIA et al,2017). Já estudos mais recentes demonstram que um número maior de nódulos resulta em melhor eficiência sendo computados até 58 nódulos por planta em situação de estudo sob estresse hídrico (CEREZINI et al, 2020), já em situação onde não se teve a indução ao estresse hídrico o número de nódulos chegou a 113 por planta (FERREIRA, 2019), outro estudo realizado por (BIRELO et al, 2015) apresentou até 281 nódulos. Dentro deste contexto os resultados do trabalho apresentaram um número baixo de nódulos oscilando de 15,30 NNP no tratamento 8 *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo TS + CoMo V3-V4 até 22,20 no tratamento 3, sem inoculante + CoMo

V3-V4. Essa variável não apresentou resultados significativos estatisticamente, porém foi possível observar uma diferença de 45,09%.

Referente à massa seca dos nódulos por planta, o tratamento 3 sem inoculante + CoMo V3-V4 82,55 mg foi superior ao tratamento 8 *Bradyrhizobium elkanii* + CoMo TS + CoMo V3-V4 50,46 mg e tratamento 11 *Bradyrhizobium elkanii* + *Azospirillum brasiliense* + CoMo V3-V4 49,47 mg, e os demais não diferiram entre si. Porém mesmo havendo essa significância, os valores de massa foram inferiores aos encontrados em outros estudos (HUNGRIA et al, 2007, CERZINI et al, 2020).

Esse resultado remete à observação de que houve uma baixa eficiência de infecção pelas bactérias inoculadas na presente safra, o que pode ter ocorrido principalmente devido às adversidades climáticas no início e decorrer do desenvolvimento da cultura. Também existe a hipótese de se ter uma população de rizóbios no solo em razão de sucessivos cultivos da cultura de soja e que essas são capazes de colonizar as raízes e garantir a FBN interferindo diretamente nos resultados como verificou Campos et al, (2006).

Ainda, essa observação evidencia que mesmo o solo estando com níveis altos de cobalto e molibdênio, ocorreram incrementos quando feita a aplicação do produto de forma aérea V3-V4, observando-se também resultados melhores, porém não significativos em MSR e NNP. Alguns autores obtiveram resultados positivos na aplicação desses micronutrientes observando aumentos de até 240 kg ha⁻¹ de grãos (NETO et al, 2012). Em outros estudos, resultados positivos quanto ao teor desses micronutrientes em grãos, folhas e produção, não significativos estatisticamente, também foram observados, porém, apresentaram uma produção de 140 kg ha⁻¹ a mais quando comparado a testemunha (GRUBERGER, 2016).

Os demais dados apresentados na tabela 3 referentes a produtividade (P), número de grãos por vagem (NGV) e peso de mil grãos (PMG) não apresentaram influência significativa dos tratamentos. De forma geral todas as análises realizadas apresentaram valores médios baixos quando comparados aos estudos de Bulegon et al, (2016); Zuffo et al, (2018), onde foram obtidas produções de até 4.865 kg ha⁻¹. Nas condições desses trabalhos não ocorreram estresses abióticos, como excesso e déficit hídrico que reduzem a infecção de bactérias na raiz. O déficit reduz a atividade de enzimas como a nitrogenase e demais processos fisiológicos, chegando a níveis

de 35% a menos de biomassa e 47% de nódulos quando comparado a plantas inoculadas que não sofreram estresse hídrico (CERIZINI et al, 2020). Já o excesso de chuvas que ocorreram no início do desenvolvimento da cultura, pode ter reduzido os níveis de oxigênio no solo afetando também a viabilidade da bactéria, que é aeróbica, e o seu potencial inicial de infecção (LIMA et al, 1998, MOREIRA et al, 2019).

Tabela 3: Componentes de rendimento da cultura da soja, número de grãos por vagem (NGV), peso de mil grãos (PMS) e produtividade (P), cultivada em sistema de semeadura direta. Usando diferentes aplicações de inoculantes e cobalto e molibdênio. Ibirubá, RS, safra 2019/2020.

Tratamentos	Nº de grãos por vagem	Peso de mil grãos (g)	Produtividade (sc ha ⁻¹)
Sem inoculante + Testemunha	2,41 ns	138,43 ns	23,99 ns
2.Sem inoculante + CoMo TS	2,41	140,66	25,58
3.Sem inoculante + CoMo V3-V4	2,30	137,83	21,04
4.Sem inoculante + CoMo TS + CoMo V3-V4	2,44	136,56	24,82
5. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + Testemunha	1,91	139,30	16,29
6. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo TS	2,15	135,40	22,96
7. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo V3-V4	2,24	134,36	20,04
8. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + CoMo TS + CoMo V3-V4	2,26	136,83	19,24
9. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + Testemunha	2,05	132,26	20,77
10. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo TS	2,27	140,93	22,81
11. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo V3-V4	2,41	138,93	17,46
12. <i>Bradyrhizobium elkanii</i> + <i>Azospirillum brasiliense</i> + CoMo TS + CoMo V3-V4	2,32	139,56	25,24
CV (%)	9,24	4,85	23,59
MÉDIA	2,26	137,59	21,68

ns: média não significativo pelo teste F.

Na safra 2019/20, período em ocorreu o desenvolvimento do estudo, foi verificada uma má distribuição hídrica, sendo assim em alguns meses foram registrados acumulados elevados de precipitação e, em outros, grande déficit, fatores

esses que podem ter afetado diretamente nos resultados obtidos nesse trabalho (Figura 5 e Figura 7).

A semeadura da cultura foi realizada dia 24/10/2019, onde no início de seu desenvolvimento sofreu com chuvas torrenciais (Figura 5 e Figura 7). Essa condição ocorreu em todo o estágio fenológico inicial de desenvolvimento o que prevaleceu até o fim da primeira quinzena do mês de novembro, período em torno de 22 dias, quando as plantas se encontravam em estágio V1-V2. Após esse período, as precipitações foram adequadas apenas no mês de janeiro, nos meses de dezembro, fevereiro e março as somas foram baixas, resultando em um déficit hídrico para a cultura (Figuras 5 e 7).

Para a soja atingir seu máximo potencial produtivo são necessários de 450 a 800 mm durante seu ciclo, sendo em média 625 mm, quantidades essas que variam de acordo com os tratos culturais, ciclo da cultivar, tipo de crescimento e condições climáticas (EMBRAPA,2011). Conforme as (Figuras 5 e 6), o acumulado de precipitação no decorrer de todo o experimento foi de 519,35mm, o que comprova que o problema não foi um evento de estiagem e sim a má distribuição do regime hídrico, sendo essa deficiência dos 22 aos 77 dias da cultura, e após os 89 dias até o final de seu ciclo (Figuras 5 e 7), período onde ocorrem os estádios de florescimento e enchimento de grãos da cultura da soja, e conseqüentemente a maior demanda de N e eficiência da FBN (ZAPATA et al, 1987), o que comprometeu o desenvolvimento dos legumes e grãos.

As altas temperaturas no solo podem ter contribuído para a redução do processo de infecção, e simbiose das bactérias com a planta. Fatos estes os quais podem se atribuir aos resultados obtidos no presente trabalho.

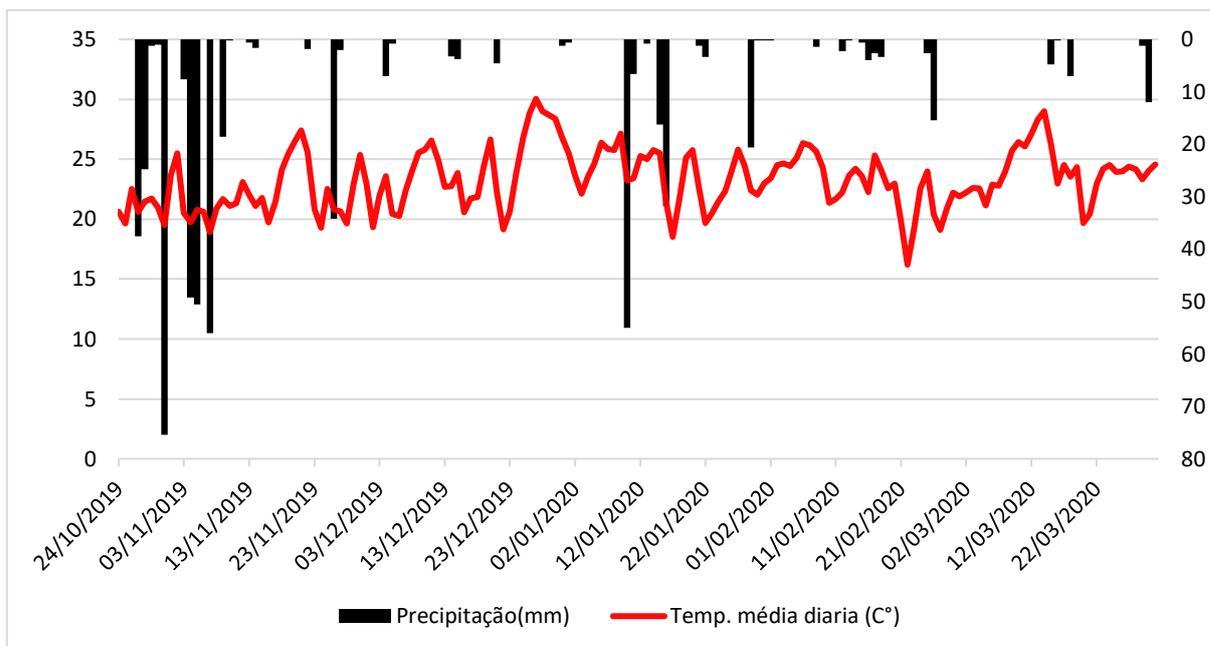


Figura 5: Precipitação e temperaturas no decorrer da instalação, desenvolvimento e conclusão do experimento em dias após a semeadura. Fonte: Instituto nacional de meteorologia – INMET, dados da estação automática do IFRS- Campus Ibirubá, 2019/2020.

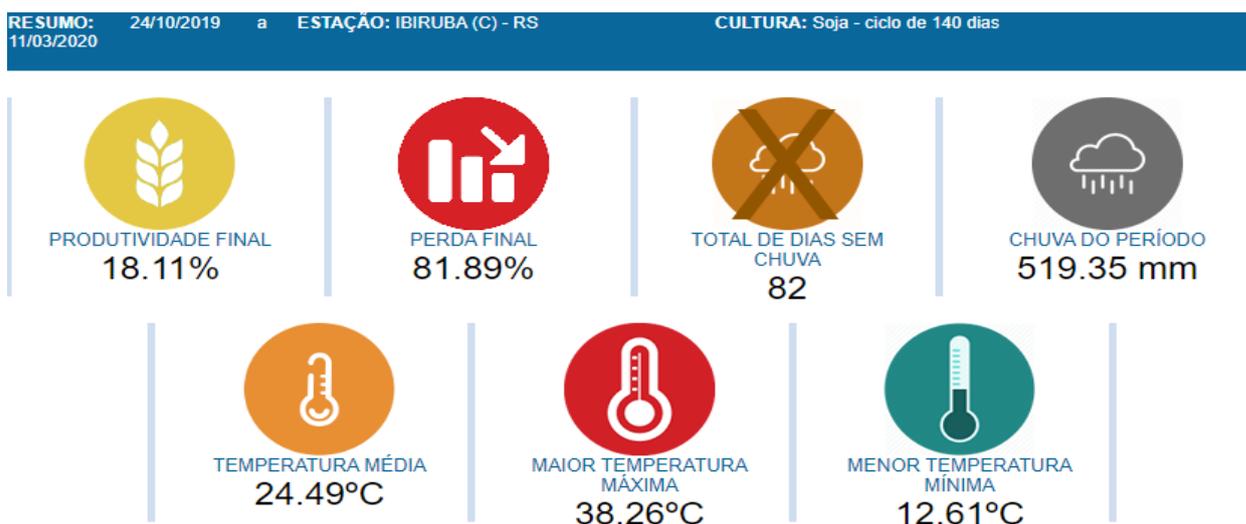


Figura 6: Dados da estação meteorológica automática de Ibirubá, gerados pelo software SISDAGRO no decorrer do experimento instalado. Fonte: SISDAGRO- Sistema de suporte a decisão agropecuária. Fonte: Instituto nacional de meteorologia – INMET, dados da estação automática do IFRS- Campus Ibirubá, 2019/2020.

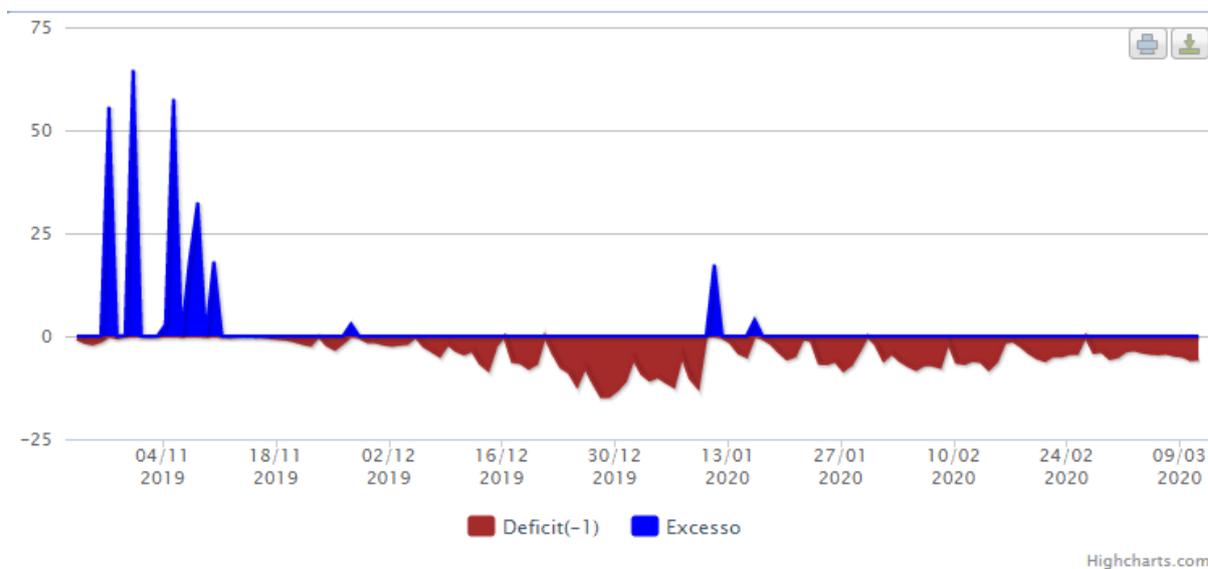


Figura 7: Relação de excesso e deficiência hídrica em milímetros, gerados pelo software SISDAGRO no decorrer do experimento instalado. Fonte: SISDAGRO- Sistema de suporte a decisão agropecuária. Fonte: Instituto nacional de meteorologia – INMET, dados da estação automática do IFRS - Campus Ibirubá, 2019/2020.

Os dados das figuras 6 e figura 7 podem ajudar a explicar o quanto a produção da cultura foi afetada no decorrer de seu desenvolvimento (estimativa 81,89%), e em quais períodos se teve excesso e déficit hídrico, fatores que interferiram na eficiência da nodulação e desenvolvimento da cultura e conseqüentemente sua produção final.

5. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos no presente trabalho foi possível constatar que em anos de estiagem a aplicação de cobalto e molibênio na dose de 200 mL ha⁻¹ realizado 35 dias após a semeadura da soja apresentou resultados positivos na variável massa seca de nódulos por planta, porém não resulta em aumento de produtividade final.

Quanto às demais variáveis analisadas, essas não foram influenciadas pelos tratamentos estudados, tanto pela prática de inoculação *Bradyrhizobium elkanii* ou coinoculação em conjunto com *Azospirillum brasiliense* como a aplicação de CoMo.

6. REFERÊNCIAS

AMIS, AGRICULTURAL MARKET INFORMATION SYSTEM. **Market monitor n° 68 – Agriculture**, 2019. Roma: AMIS, 2019. Disponível em: < http://www.amis-outlook.org/#jfmulticontent_c363419-5>. Acesso em: 21/05/2019.

ABISOLO, 5., 2019, São Paulo. **5º Anuário Brasileira das Indústrias de Tecnologia em Nutrição Vegetal: O Mercado de Insumos para a Indústria de Tecnologia em Nutrição Vegetal: Nitrogenio**. São Paulo: Gráfica Cromosete, 2019. 167 p. Disponível em: <www.abisolo.com.br>. Acesso em: 26/10/2019.

ANPII, 2019, São Paulo. Curso EAD, Associação Nacional de Produtores de Inoculantes - Fixação Biológica de Nitrogênio. Disponível em: <https://anpii.eadplataforma.com/curso/iniciacao-fixacao-biologica-do-nitrogenio-fbn/>. Acesso em: 05/09/2019.

ANAIS DA XVII RELARE, 17., 2016, Londrina. **Anais da XVII RELARE Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola: Coinoculação da soja e do feijoeiro com rizóbios e Azospirillum brasilense**. Curitiba Pr: Embrapa Soja, 2013. 113 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142753/1/Doc-369-DIGITAL.pdf>>. Acesso em: 27/10/2019.

ANAIS DA XVII RELARE, 369., 2016, Londrina. Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, **Padronização e Difusão de Tecnologias de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 113 p. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1044383/1/Doc369DIGITAL.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2019.

BRASIL. Ali Aldersi Saab. Assessoria de Gestão Estratégica (age Mapa) (Comp.). O mercado de fertilizantes no Brasil: Diagnósticos e propostas de políticas. **Revista de Política Agrícola**: Publicação da Secretaria de Política Agrícola do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília-df, v. 17, n. 2, p.6-39, 1 abr. 2008. Publicação Trimestral. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/revista-de-politica-agricola/revista-de-politica-agricola-n2-2008.pdf>>. Acesso em: 17/10/2019.

BRASIL. Marco Antonio Nogueira. Embrapa. **Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com Bradyrhizobium Azospirillum na cultura da soja na safra 2017/18 no estado do Paraná**. 143. ed. Londrina: Marisa Yuri Horikawa, 2018. 16 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/182652/1/CT143-OL.pdf>>. Acesso em: 21/10/. 2019.

BRADY, Nyle; WEIL, Raymond. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos: Nitrogenio no Sistema Solo**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2013. 686 p. Tradução de: Igor Fernando Lepsch.

BASHAN, Yoav; HOLGUIN, Gina; DE-BASHAN, Luz E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian journal of microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521-577, 2004. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/b700/3fcea39123eae12bf84ee55f31b0505592ef.pdf>>. Acesso em: 28/10/2019.

BIRELLO, A. C. et al. Nodulação e crescimento de raízes de soja em função da escarificação e da gessagem. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 7.; MERCOSOJA, 2015, Florianópolis. Tecnologia e mercado global: perspectivas para soja: anais. Londrina: Embrapa Soja, 2015., 2015.

BULEGON, Lucas Guilherme et al. Componentes de produção e produtividade da cultura da soja submetida à inoculação de Bradyrhizobium e Azospirillum. **Terra Latinoamericana**, v. 34, n. 2, p. 169-176, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792016000200169&lang=pt>. Acesso em: 17/03/2021

CAMPOS, Ben-Hur Costa de; GNATTA, Valderi. Inoculantes e fertilizantes foliares na soja em área de populações estabelecidas de Bradyrhizobium sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 1, p. 69-76, 2006.

CERETTA, C.A.; PAVINATTO, A.; PAVINATTO, P.S.; MOREIRA, I.C.L.; GIROTTO, E, TRENTIN, E. E. **Micronutrientes na soja: produtividade e análise econômica**. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p. 576-581, 2005. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/29313/S0103-84782005000300013.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 01/05/2019

CEREZINI, Paula et al. Soybean tolerance to drought depends on the associated Bradyrhizobium strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-10, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-020-00375-1>>. Acesso em: 26/12/2020.

CESB. Comitê estratégico soja Brasil. Case campeão sul e nacional: safra (2019-2020). Sorocaba, Brasil. **CESB**, 2020. 27p. Disponível em: <<http://www.cesbrasil.org.br/wp-content/uploads/2020/07/Case-SUL-NACIONAL-Ricardo-Balardin-1.pdf>>. Acesso em: 18/03/2021.

COSTA., J.A, **Cultura da Soja**, José Antonio Costa. Porto Alegre, p 233,1996.

CESB, SOJA: QUEBRANDO RECORDES :**CESB: 10 anos de máxima produtividade** / Realização Comitê Estratégico Soja Brasil (CESB); Patrocinadores Basf, Bayer, Syngenta et al. – Brasil: [s.n.], p 216, 2018. Disponível em: <<http://www.cesbrasil.org.br/wp-content/uploads/2018/11/LIVRO-CESB.pdf>>. Acesso em: 25/05/2019.

CELLA, Daltro; DE LIMA ROSSI, Mário César. Análise do mercado de fertilizantes no Brasil. **Revista Interface Tecnológica**, v. 7, n. 1, p. 41-50, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/291971265_O_MERCADO_DE_FERTILIZANTES_NO_BRASIL_E_AS_INFLUENCIAS_MUNDIAIS>. Acesso em: 17/10/2019.
DE OLIVEIRA DAPUNICENA, Diego; DE OLIVEIRA, Renato Cassol. Nodulação de variedades de soja transgênica. **Revista Cultivando o Saber**, v. 1, n. 4, p. 96-103, 2018. Disponível em: <<https://cultivandosaber.fag.edu.br/index.php/cultivando/article/view/903/826>>. Acesso em: 16/03/2021.

CIAMPITTI, Ignacio A.; SALVAGIOTTI, Fernando. New insights into soybean biological nitrogen fixation. *Agronomy Journal*, v. 110, n. 4, p. 1185-1196, 2018.
DAFERT, F.W., Relatório anual do Instituto Agronômico do Estado de São Paulo, Campinas, 1982, 26p. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/325373466_New_Insights_into_Soybean_Biological_Nitrogen_Fixation>. Acesso em: 27/03/2021.

EMBRAPA, SOJA. Tecnologias de produção de soja—região central do Brasil 2012 e 2013. **Londrina: Embrapa Soja**, n. 15, p. 261, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44954/1/TEC.-PROD.15.pdf>>. Acesso em: 08/07/2020.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologia de Produção de Soja** – Região Central do Brasil. Londrina: Embrapa Soja, Embrapa Cerrados: Embrapa Agropecuária Oeste: Fundação meridional, p. 239, 2004.

FERREIRA, Matheus Martins et al. Desempenho agrônomo da soja pelo manejo de Glyphosate e da co-inoculação. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/19652/DIS_PPGAGRONOMIA_2019_FERREIRA_MATHEUS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17/03/2021.

FERREIRA, Daniel Furtado. SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. *REVISTA BRASILEIRA DE BIOMETRIA*, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. 2019. ISSN 1983-0823. Disponível em: <<http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>>. Acesso em: 30/03/2021.

FACHINELLI, Ricardo; CECCON, Gessi. Coinoculação com Bradyrhizobium e Azospirillum na soja em sucessão ao milhosafrinha em solo arenoso e argiloso. **Embrapa Agropecuária Oeste-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2020. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1124553/1/37067.pdf>. Acesso em: 16/03/2021.

FAGAN, Evandro Binotto et al. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja- Revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, 2007. Disponível em: <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2481/0>. Acesso em: 04/12/2019.

FEALQ., **Brasil a pátria do agro meio século de evolução do agronegócio brasileiro (1967-2017)** / organização e edição de Marlene Simarelli. Piracicaba. FEALQ, 2018, 112p. Disponível em: http://www.confaeab.org.br/wp-content/uploads/2018/08/brasil_patriadoagro.pdf. Acesso em: 10/10/2019.

FRANZEN, David W.; INGLETT, Patrick; GASCH, Caley K. Asymbiotic Nitrogen Fixation is Greater in Soils under Long-Term No-Till Versus Conventional Tillage. **Soil Science Society of America Journal**, v. 83, n. 4, p. 1148-1152, 2019.

GALINDO, Fernando S. et al. Technical and economic viability of co-inoculation with Azospirillum brasilense in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 22, n. 1, p. 51-56, 2018.

GITTI, D.C. Inoculação e Coinoculação na Cultura da Soja. Maracaju. **Fundação MS** (safra 2015/2016) p15-23, 2016. Disponível em: <http://www.fundacaoms.org.br/base/www/fundacaoms.org.br/media/attachments/234/234/newarchive-234.pdf>. Acesso em: 01/05/2019.

GRUBERGER, Gabriel Asa Corrêa. **Enriquecimento de sementes de soja com cobalto e molibdênio**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-19052017-144600/en.php>. Acesso: 17/03/2021.

HUNGRIA, Mariangela; CAMPO, Rubens José; MENDES, I. de C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2001. 48 p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/459673/1/circTec35.pdf>. Acesso em: 08/05/2019.

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

HUNGRIA, Mariangela. Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, 2011.

Disponível em:
<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29676/1/Inoculacao-com-azospirillum.pdf>>. Acesso em: 27/10/2019.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia, 2020. Disponível em:
<http://www.inmet.gov.br/sonabra/pg_dspDadosCodigo_sim.php?QTg4Mw==>.
Acesso em: 25/06/2020.

LAMOND, R.E.; WESLEY, T.L. Adubação nitrogenada no momento certo para soja de alta produtividade. **Informações Agrônomicas** v.95, p.6-7, 2001. Disponível em:
<[http://www.ipni.net/publication/iabrasil.nsf/0/23E7264630AABD6383257AA30063E74D/\\$FILE/Page6-7-95.pdf](http://www.ipni.net/publication/iabrasil.nsf/0/23E7264630AABD6383257AA30063E74D/$FILE/Page6-7-95.pdf)>. Acesso em: 08/05/2019.

LIMA, S. C.; LOPES, E. S.; LEMOS, E. G. M. Caracterização de rizóbios (*Bradyrhizobium japonicum*) e produtividade da soja. **Scientia Agricola**, v. 55, n. 3, p. 360-366, 1998. Disponível em:
<https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90161998000300003>. Acesso em: 17/03/2021.

MALAVOLTA, Eurípedes. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Agronômica Ceres, 2006.

MEERT, Leandro et al. Inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* na cultura da soja. 2020.

MOREIRA, Fatima Maria de Souza; MOREIRA, José Oswaldo Siqueira. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Editora Ufla, 2006. 729 p. Disponível em:
<http://www.esalq.usp.br/departamentos/lso/arquivos_aula/LSO_400%20Livro%20-%20Microbiologia%20e%20bioquimica%20do%20solo.pdf>. Acesso em: 28/10/2019.

MOREIRA, Wellington Marcelo Queixas. **Metabolismo respiratório de bradirrízobios durante processos in vitro e simbiótico analisado por pcr quantitativo em tempo real**. 2009. Acesso em:
<<https://www.fcav.unesp.br/Home/download/pgtrabs/micro/m/3747.pdf>>. Disponível em: 17/03/2021.

MOREIRA, F. M. S. **Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas**. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros. Lavras: UFLA, 2008. 768 p.; p.13-42.

MELLO, Naiana. **Inoculação de azospirillum brasilense nas culturas de milho e trigo**. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2012. Disponível em:
<http://tede.upf.br/jspui/bitstream/tede/527/1/2012Naiana_de_Mello.pdf>. Acesso em: 28/10/2019.

NETO, Durval Dourado et al. Adubação mineral com cobalto e molibdênio na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 2741-2751, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/273692325_Adubacao_mineral_com_cobalto_e_molibdenio_na_cultura_da_soja>. Acesso em: 17/03/2021

PÍPOLO, Antonio Eduardo et al. **Teores de óleo e proteína em soja: Fatores envolvidos e qualidade para a indústria**. 86. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 16 p. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/130450/1/comunicado-tecnico-86OL.pdf>>. Acesso em: 01/12/2019.

SBCS., Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Manual de calagem e adubação para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Núcleo Regional Sul. Comissão de Química e Fertilidade do Solo RS/SC, **SBCS** p.376, 2016.

SFREDO, Gedi Jorge; OLIVEIRA, Maria Cristina Neves de. **Soja Molibdênio e Cobalto**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 36 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18872/1/Doc_322_online1.pdf>. Acesso em: 28/10/2019.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243341/pdf/aem00209-0238.pdf>>. Acesso em: 15/09/2019.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia vegetal**. Universitat Jaume I, 2006.

USDA, United States Secretary of Agriculture. World Agricultural Production. Circular series, march 2021, pg33 tabela 11. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 15/03/2021.

ZAPATA, F., DANSO, S.K.A., HARDARSON, G. and Fried, M. (1987), **Time Course of Nitrogen Fixation in Field-Grown Soybean Using Nitrogen-15 Methodology**¹. *Agron. J.*, 79: 172-176. Disponível em: <<https://doi.org/10.2134/agronj1987.00021962007900010035x>>. Acesso em: 26/12/2020

ZUFFO, Alan Mario et al. Response of early soybean cultivars to nitrogen fertilization associated with *Bradyrhizobium japonicum* inoculation. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 48, n. 4, p. 436-446, 2018. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632018000400436&lang=pt>. Acesso em: 17/03/2021