

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO COM  
*Bradyrhizobium* E *Azospirillum* NA CULTURA DA  
SOJA**

**RICARDO FACHINELLI**

**DOURADOS,  
MATO GROSSO DO SUL  
2018**

**Influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja**

**RICARDO FACHINELLI**

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. GESSÍ CECCON

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

DOURADOS  
MATO GROSSO DO SUL  
2018

**INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* NA  
CULTURA DA SOJA**

por

**Ricardo Fachinelli**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de  
MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em: 26 / 02 / 2018



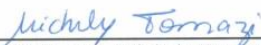
---

Prof. Dr. Gessi Ceccon  
UFGD  
(Orientador)



---

Profa. Dra. Elaine Reis Pinheiro Lourente  
UFGD



---

Profa. Dra. Michely Tomazi  
Embrapa Agropecuária Oeste

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

F139i Fachinelli, Ricardo

Influência da inoculação com Bradyrhizobium e Azospirillum na cultura da soja / Ricardo Fachinelli -- Dourados: UFGD, 2018.

57f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gessi Ceccon

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Fitotecnia. 2. Atividade microbiana do solo. 3. Atividade enzimática. 4. Produção. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

**“Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos”**

**Lao Tsé**

Aos meus amados pais **Marta Maria Boni** e **Domingos Fachinelli Filho** e minha querida tia **Maria Aparecida Fachinelli** (*in memoriam*) que com amor incondicional me ajudaram em tudo e se empenharam para que eu alcançasse mais esta conquista.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de suporte financeiro à pesquisa.

À Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Produção Vegetal, pela qualidade do curso e pela estrutura física, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos seus professores pela contribuição à minha formação profissional.

À Embrapa Agropecuária Oeste, pela colaboração para a execução e realização deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. Gessi Ceccon, pela oportunidade, confiança no meu trabalho, incentivo, estímulo e, principalmente, por todo conhecimento transmitido que foi fundamental à minha formação profissional e pessoal.

À Dra. Michely Tomazi e ao técnico laboratorista Vladimir Andrei Tarasiuk, Embrapa Agropecuária Oeste, e as professoras Dra. Alessandra M. Tokura Alovise e Dra. Daiane Mugnol Dresch pelos ensinamentos e contribuição neste trabalho.

Em especial aos meus amigos e companheiros de mestrado Hadassa K. A. Abreu, Isabella Ribeiro, Luan Marlon Ribeiro, Priscila A. Makino, Renato A. da Luz, Suzana T. S. Pereira, Tatiane S. Jeromini e Thamiris Barbizan que com muita paciência e atenção me acolheram e estiveram sempre dispostos a me ajudar e me apoiar em todas as fases do meu trabalho, sendo essenciais para minha conquista.

Muito obrigada a todos aqueles que confiaram e acreditaram em mim.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURA</b> .....	ix
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 A soja</b> .....	14
<b>2.2 Adubação</b> .....	14
<b>2.3 Bactérias fixadoras de nitrogênio</b> .....	16
<b>2.4 Indicadores de qualidade do solo</b> .....	19
<b>2.5 Biomassa microbiana do solo</b> .....	21
<b>2.6 Atividade enzimática</b> .....	23
<b>Arilsulfatase</b> .....	23
<b>Fosfatases</b> .....	24
<b><math>\beta</math>-glucosidase</b> .....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
<b>3.1 Local e clima</b> .....	25
<b>3.2 Delineamento experimental e tratamentos</b> .....	25
<b>3.3 Caracterização do solo</b> .....	26
<b>3.5 AVALIAÇÕES</b> .....	28
<b>Morfofisiologia de plantas de soja</b> .....	28
<b>Biomassa Microbiana no solo</b> .....	29
<b>Atividade enzimática do solo</b> .....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>4.1 MORFOFISIOLOGIA DE PLANTAS</b> .....	30
<b>4.3 ATIVIDADE MICROBIANA</b> .....	41
<b>4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b> .....	45
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>6. REFERENCIAS</b> .....	50



## LISTA DE FIGURA

- FIGURA 1.** Temperaturas máximas (TM °C) e mínimas (Tm °C) obtidas pela estação experimental da Embrapa CPAO durante a condução do ensaio da soja. Dourados, 2017. Fonte: Embrapa Agropecuária Oeste (2013) .....25

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1.** Histórico de cultivo nos vasos com referência aos tratamentos aplicados nas safras de verão e outono-inverno, nos anos de 2014 a 2017. Dourados, 2017.....26
- QUADRO 2.** Atributos químicos do solo realizada na implantação do experimento. Dourados, MS, 2017.....27
- QUADRO 3.** Altura de plantas (AP), massa verde de haste (MVH) e área foliar por planta (AFPP) de soja em estágio V4, cultivada em arenoso e argiloso, com diferentes tratamentos nas sementes, em Dourados, MS, 2017.....30
- QUADRO 4.** Número de trifólios por planta de soja em estágio fenológico V4, cultivada em arenoso e argiloso sob diferentes tratamentos na semente, em Dourados, MS, 2017.....31
- QUADRO 5.** Variáveis analisadas em plantas de soja cultivada em solo arenoso e argiloso, com diferentes tratamentos nas sementes. Dourados, 2017.....32
- QUADRO 6.** Médias referentes as variáveis avaliadas em plantas de soja no estágio R1, cultivada em solo arenoso e argiloso, com tratamentos nas sementes. Dourados, 2017.....32
- QUADRO 7.** Massa seca de haste e vagens (MSH), número de vagens (NV), massa de 100 grãos (M100G) e produtividade estimada de grãos da soja cv. BRS 360 cultivada em solo arenoso e argiloso, safra 2014/2015. Dourados, MS, 2017.....34
- QUADRO 8.** Massa seca de haste e vagens (PSH), massa de 100 grãos (M100G) e produtividade estimada de grãos da soja cv. BRS 360 com tratamentos nas sementes, safra 2014/2015. Dourados, MS. 2017.....35

- QUADRO 9.** Peso seco de haste e vagens das plantas de soja, cv. BRS 388, analisadas em maturação fisiológica da cultura cultivada em duas classes de solo, safra 2015/2016. Dourados, MS, 2017.....36
- QUADRO 10.** Altura de plantas (AP) massa de 100 grãos (M100), número de grãos por planta (NGPP), número de vagens por planta (NVPP) e produtividade estimada de grãos de soja, cv. BRS 388, em solo arenoso e argiloso, submetidas a inoculação e coinoculação nas sementes na safra 2015/2016. Dourados, 2017.....36
- QUADRO 11.** Altura de plantas de soja (cm) na maturação fisiológica da cultura, referente a safra 2016/2017, cv. BRS 1001 IPRO, inoculadas e coinoculadas nas sementes. Dourados, MS, 2017.....37
- QUADRO 12.** Média de variáveis morfofisiológicas em plantas de soja, cv. BRS 1001 IPRO, na maturação fisiológica da cultura, em solo arenoso e argiloso, submetidas a inoculação e coinoculação nas sementes. Dourados, 2017.....38
- QUADRO 13.** Concentração foliar de nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca) e enxofre (S) na soja em estágio R1, sob cultivo em solo arenoso e argiloso, submetidas a inoculação nas sementes. Dourados, 2017.....39
- QUADRO 14.** Conteúdo de fósforo (P), magnésio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe) e cobre (Cu) em folhas de soja em no estágio R1, submetidas a inoculação nas sementes. Dourados, 2017.....39
- QUADRO 15.** Atributos microbiológicos do solo sob cultivo da soja inoculada e coinoculada em avaliação de pré-plantio e em maturação fisiológica da cultura, 2017.....40
- QUADRO 16.** Atributos microbiológicos do solo sob cultivo da soja inoculada e coinoculada em avaliação de pré-plantio e em maturação fisiológica da cultura, 2017.....42
- QUADRO 17.** Atividade das enzimas  $\beta$ -glucosidase e arilsulfatase sob cultivo da soja em final de ciclo da soja inoculada e co-inoculada. Dourados, 2017.....43
- QUADRO 18.** Atividade da enzima fosfatase ácida sob cultivo da soja em final de ciclo da cultura, sob cultivo em solo arenoso e argiloso, inoculada e co-inoculada nas sementes. Dourados, 2017.....45

## INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO COM *Bradyrhizobium* E *Azospirillum* NA CULTURA DA SOJA

### RESUMO

FACHINELLI, Ricardo, Universidade Federal da Grande Dourados, Janeiro, 2018. **Influência da inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja.** Orientador: Prof. Dr. Gessi Ceccon.

A necessidade de tornar a agricultura mais eficiente com maiores produtividades e menores custos de produção impulsiona a pesquisa para encontrar técnicas de manejos mais eficientes e aplicáveis em larga escala. A inoculação com *Bradyrhizobium* em sementes de soja já está consolidada, mas a inoculação com *Azospirillum* ainda pode ser melhor estudada. Em vista disso, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da combinação de inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* sobre a cultura da soja e sobre os atributos microbiológicos do solo. O trabalho foi desenvolvido na safra 2016/2017, na Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em parcelas subdivididas. Nas parcelas principais foram alocados os dois solos (LVe e LVAd) e nas subparcelas as cinco formas de fornecimento de Nitrogênio à cultura: Adubação nitrogenada na semeadura (CN), inoculação com *Azospirillum brasilense* nas sementes de soja (CA), inoculação com *Bradyrhizobium* nas sementes de soja (CB), inoculação com *A. brasilense* na cultura de inverno e *Bradyrhizobium* nas sementes de soja (CA+CB) e inoculação com *A. brasilense* na cultura de inverno e coinoculação de *Bradyrhizobium* mais *A. brasilense* nas sementes de soja (CA; CB+A). Na soja foram avaliados parâmetros morfológicos em três estádios de desenvolvimento (V4, R1 e maturação fisiológica), e os componentes de produção na colheita. No solo foi avaliada atividade microbiana no início e final do cultivo e a atividade enzimática foi avaliada na colheita da soja. A morfologia de plantas de soja com inoculação isolada e coinoculação de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium* foram equivalentes a adubação nitrogenada. A soja inoculada com *A. brasilense* teve produtividade equivalente a adubação nitrogenada. A inoculação com *A. brasilense* e a coinoculação aumenta a concentração de fosforo nas folhas da soja. A inoculação e coinoculação aumenta o carbono da biomassa microbiana em solo arenoso. A atividade enzimática é maior em solo argiloso.

**Palavras-chave:** Fitotecnia, atividade microbiana do solo, atividade enzimática, produção.

## INFLUENCE OF INOCULATION WITH *Bradyrhizobium* AND *Azospirillum* ON SOYBEAN CULTURE

### ABSTRACT

FACHINELLI, Ricardo, Federal University of Grande Dourados, January, 2018. **Influence of inoculation with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* on soybean culture.** Adivaisor: Prof. Dr. Gessi Ceccon.

The need to make agriculture more efficient with higher productivity and lower production costs drives research to find more efficient and applicable management techniques on a large scale. The inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean seeds is already consolidated, but the inoculation with *Azospirillum* can still be better studied. The objective of this work was to evaluate the influence of the combination of inoculation and co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* on soybean crop and soil microbiological attributes. The work was developed in the 2016/2017 harvest, at Embrapa Agropecuária Oeste, in Dourados, MS. The experimental design was in randomized blocks in subdivided plots. In the main plots were allocated the two soils (LVE and LVAd) and in the subplots the five forms of Nitrogen supply to the crop: Nitrogen fertilization on seeding (CN), inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean seeds (CA), inoculation with *Bradyrhizobium* in soybean seeds (CB), inoculation with *A. brasilense* in winter culture and *Bradyrhizobium* in soybean seeds (CA + CB) and inoculation with *A. brasilense* on winter culture and co-inoculation of *Bradyrhizobium* plus *A. brasilense* on soybean seeds (CA; CB + A). In soybean, morphological parameters were evaluated at three stages of development (V4, R1 and physiological maturation), and the components of production at harvest. In the soil was evaluated microbial activity at the beginning and end of the crop and the enzymatic activity was evaluated in the soybean harvest. The morphology of soybean plants with isolated inoculation and co-inoculation of *A. brasilense* with *Bradyrhizobium* were equivalent to nitrogen fertilization. The soybean inoculated with *A. brasilense* had productivity equivalent to nitrogen fertilization. Inoculation with *A. brasilense* and co-inoculation increases the phosphorus concentration in soybean leaves. Inoculation and co-inoculation increase the carbon of the microbial biomass in sandy soil. The enzymatic activity is higher in clay soil.

Key words: Phytotechnology, soil microbial activity, enzymatic activity, production.

## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é a principal oleaginosa cultivada no mundo, apresentando elevada importância na sua utilização, seja na forma de grãos ou seus derivados, tanto para alimentação humana quanto animal.

Em 2017, o Brasil produziu mais de 100 milhões de toneladas de grãos de soja (CONAB, 2018), sendo o segundo maior produtor mundial, demonstrando a importância da cultura para a economia brasileira. Elevados índices produtivos e amplo estabelecimento da cultura no país é possível devido aos diversos avanços científicos e tecnológicos no sistema de produção da cultura.

A espécie apresenta grande potencial de pesquisas relacionadas a redução do uso de fertilizantes, sem que ocorra reduções na produtividade e qualidade dos grãos. Nesse contexto, a utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio, pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* foi uma das principais tecnologias que alavancaram o cultivo da soja em grande escala no Brasil (HUNGRIA et al., 2005).

Neste contexto, alternativas tecnológicas visando o incremento produtivo da soja estão sendo pesquisadas. Dentre elas destacam-se a coinoculação da cultura da soja com bactérias de diferentes estirpes, de modo que esta tecnologia consiste em utilizar a combinação de diferentes microrganismos a fim criar um efeito sinérgico, fazendo com que a produtividade da cultura expresse valores superiores aos verificados quando utilizadas as inoculações de forma isolada.

Pesquisas neste sentido podem contribuir para a maior produtividade da soja e redução dos custos de produtividade, uma vez que técnicas de fornecimento de nitrogênio via utilização de microrganismos são mais baratas que o fornecimento de adubos nitrogenados. Com essas tecnologias biológicas reduz-se, também, o risco de contaminação do ambiente ocasionados pela má utilização de adubos nitrogenados e, dessa forma, contribuir para a sustentabilidade do sistema agrícola.

Com isso, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a influência das combinações de inoculação e coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* sobre a produtividade da soja e sobre os parâmetros microbiológicos do solo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A soja

A soja é uma planta herbácea, classe *Dicotyledoneae*, ordem *Rosales*, família *Fabaceae* (*Leguminosae*), subfamília das *Papilionoideae*, gênero *Glycine*. Seu nome científico é *Glycine max* L. A cultura tem seu centro de origem na China e foi introduzida no continente americano no século XVIII, utilizada como cultura forrageira, tornando-se cultura granífera a partir da década de 1940, nos Estados Unidos da América (CHUNG e SINGH, 2008).

No Brasil, a soja começou a expressar valor comercial em meados da década de 1960. Com destaque produtivo inicial concentrado na região Centro-Sul, até o início dos anos 1980, e com a expansão de fronteiras agrícolas no país tornou-se a cultura de maior importância econômica (EMBRAPA, 2004).

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de soja, produzindo 111 milhões de toneladas e exportando 61,9 milhões de toneladas de grãos de soja em 2017 sendo o Estado de Mato Grosso do Sul o quarto mais produtivo da cultura da soja na Federação (CONAB, 2017), o que demonstra a importância da cultura para o desenvolvimento regional e a necessidade de redução de custos de produção e manejos eficientes na cultura para elevar a produtividade e a lucratividade do agricultor.

Com as tecnologias empregadas na cultura da soja, tanto em manejo como em genética, a possibilidade de expandir seu cultivo em território nacional com elevadas produtividades se tornou realidade. Exemplo disso é o cultivo de soja em solos com texturas arenosas, tidos como não produtivos ou solos pobres nas regiões do Centro-Oeste e em Estados do Nordeste, que atualmente desempenham grande importância na expansão da fronteira agrícola nacional (BRASIL, 2012).

### 2.2 Adubação

Nas últimas décadas, o consumo de fertilizantes no Brasil apresentou o maior índice de crescimento a nível mundial, com acréscimo de 6% ao ano, sendo que no período de 1990 até 2010, o crescimento acumulado foi de 216%. O consumo de Nitrogênio (N) foi de cerca de 3,1 mil toneladas em 2016, sendo que 38% deste total foi adquirido através de importação (ANDA, 2017).

Estudos visando encontrar alternativas para redução na adubação sem reduzir a produtividade são constantes e, dentre os elementos o nitrogênio apresenta resultados positivos. A fixação biológica do nitrogênio, realizada por bactérias diazotróficas é uma alternativa que possibilita a redução do uso de fertilizantes nitrogenados na soja, (REIS, 2007).

O nitrogênio é um dos elementos essenciais para uma elevada produtividade da cultura da soja, que pode ser fornecido via fertilizantes nitrogenados, que são rapidamente assimilados pela planta, porém elevam o custo de produção, além do alto custo de energia para a fabricação desse fertilizante, que a longo prazo apresenta baixa eficiência de uso pelas plantas. O fornecimento de N via inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio, reduz o custo de produção e garante fornecimento constante do elemento até o fim do ciclo da cultura (HUNGRIA et al., 2007).

A soja demanda grandes quantidades de nitrogênio, de modo que para produzir 1.000 kg de grãos são necessários 80 kg de N (HUNGRIA et al., 2001). Para suprir essa necessidade do elemento a cultura, é necessário fornecer uma quantidade superior no momento da adubação, visto que nem todo o material fornecido é propriamente nitrogênio prontamente absorvível pela planta e, ainda, uma porcentagem é perdida ao ambiente. Em contrapartida, a inoculação das sementes de soja com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* fornece, praticamente, todo o nitrogênio que a planta necessita para expressar seu potencial produtivo sem ocasionar perdas de N ao ambiente (TAIZ e ZAIGER, 2013).

A inoculação das sementes de soja com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. proporciona uma fixação biológica do nitrogênio no solo equivalente a 300 kg de N ha<sup>-1</sup>, suprimindo cerca de 94% das necessidades do elemento pela cultura, além de uma economia de US\$ 3,2 bilhões em uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA et al., 2007).

Outras alternativas tecnológicas são estudadas a fim de proporcionar incrementos produtivos para a soja e potencializar a fixação biológica do nitrogênio. Uma destas alternativas é a coinoculação com diferentes microrganismos, que atuando de forma sinérgica, apresentam resultados superiores do que quando inoculados de forma isolada, como ocorre com a combinação entre *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na inoculação das sementes de soja (BARBARO et al., 2011).

Desse modo, o uso de bactérias, promotoras do crescimento de plantas, que visam a aumentar o desenvolvimento da cultura, e eventualmente maximizar o aporte nitrogênio via fixação biológica, representam uma estratégia economicamente viável,

além dos benefícios ambientais associados à redução do fornecimento e eficiência no uso de fertilizantes (HUNGRIA, 2011).

### **2.3 Bactérias fixadoras de nitrogênio**

Aproximações da quantificação da contribuição da fixação biológica do nitrogênio em escala global são apresentadas em vários estudos, mas nenhuma se torna precisa devido ao fato de não haver dados concisos sobre áreas cultivadas com leguminosas e a dispersão de dados para a fixação biológica das culturas não leguminosas, sem contar os ecossistemas que a realizam de forma natural (HERRIDGE et al., 2008), entretanto Galloway et al. (2004), estimam que essa contribuição seja de aproximadamente  $195 \text{ T N}^{-1}$  ao ano.

A capacidade de transformar  $\text{N}_2$  atmosférico em  $\text{NH}_3$  é restrita a um pequeno grupo de organismos, que podem apresentar hábitos de vida livre, associativa ou simbióticas. Um dos organismos fixadores de nitrogênio de caráter simbiótico mais representativos pertence a classe *Rizobia*. São bactérias que residem em estruturas nodulares com acesso a uma abundante fonte de energia disponibilizados pela planta, e um ambiente que forneça proteção ao oxigênio, permitindo o bom funcionamento da enzima nitrogenase, responsável pelo processo de redução do nitrogênio molecular para amônia, forma absorvível pelas plantas (VESSEY et al., 2005).

Atualmente, são conhecidas várias estirpes bacterianas que apresentam a habilidade de fixar o N atmosférico e também apresentam capacidade de promover o crescimento vegetal de outras formas, como a liberação de fitormônios para a planta ou incrementar a disponibilidade de nutrientes (VASSEY, 2003), como ocorre na associação do *Azospirillum* com diversas espécies vegetais, como o arroz, o sorgo e a cana-de-açúcar (VESSEY, 2003; KENNEDY et al., 2004).

#### ***Bradyrhizobium***

Para soja, o gênero *Rizhobium* apresenta a maior afinidade associativa com elevado potencial de fixação do nitrogênio e supri as necessidades da cultura para esse elemento. Nessa associação, os processos que envolvem a fixação biológica do N começam com a infecção da bactéria na planta evoluindo até a fixação do  $\text{N}_2$  atmosférico.



O processo de nodulação tem seu início aproximadamente duas horas após o contato da bactéria com as raízes (CASSINI e FRANCO, 2006). Segundo Bhuvanewari et al. (1980), as regiões de alongamento e as zonas de formação de pequenos pelos radiculares, são consideradas as regiões preferenciais para a infecção da bactéria e desenvolvimento dos nódulos primários, sendo que o processo de infecção pelo rizóbio envolve diferentes agentes sinalizadores entre a planta, a bactéria e ação de fitohormônios (TAIZ e ZIEGER, 2013).

O modelo proposto por Timmers et al. (1999), descreve uma migração da bactéria noduladora em direção as raízes por resposta quimiostática. Isto ocorre pela atração de isoflavonóides e betaínas, bactérias secretadas pelas raízes, sendo que esses estímulos químicos para as bactérias ativam enzimas, que iniciam a transcrição de genes do *fator nod*, determinando a infecção das raízes e seguidamente o enrolamento dos pelos, originando o princípio nodular, que consiste na estrutura base para a formação do nódulo.

Com a evolução da infecção é formado um canal dentro do pelo radicular, enquanto que no periciclo é iniciado o rearranjo do citoesqueleto microtubular, posteriormente acontece ativação das células na parte interna do parênquima cortical, podendo atingir camadas mais profundas, como o periciclo radicular. Sequencialmente, nos pelos radiculares ocorre a infecção, localizada distanciadamente da área radicular ativada. Com a presença do cordão de infecção, a multiplicação de células tetraploides se estende progressivamente para o meio e a parte mais externa do córtex, de acordo com dois gradientes de diferenciação celular, resultando na formação de um primórdio nodular (TIMMERS et al., 1999).

A capacidade de multiplicação celular aumenta com a ação de reguladores vegetais de crescimento dos grupos das auxinas e citocininas, transformando as células tetraploides em meristemáticas, formando assim os nódulos radiculares, com o interior completamente infectado por células bacterianas, os bacteroides (HUNGRIA et al., 1997).

O complexo da enzima nitrogenase é responsável pela fixação de nitrogênio no nódulo, transformando o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ). Esse processo ocorre em ambiente anaeróbio, tendo a leghemoglobina e uma barreira de difusão de oxigênio como reguladores importantes na tensão de oxigênio no interior do nódulo, protegendo o complexo enzima nitrogenase que é irreversivelmente inativado pelo oxigênio (MYLONA et al., 1995).

Na fenologia da soja, os primeiros nódulos ocorrem com a infecção da raiz principal, tornando-se visíveis até o estágio V2. A partir disso, o crescimento nodular em massa e número de nódulos aumenta, atingindo seu auge em R2. Durante o ciclo da cultura tem-se uma contínua formação e renovação dos nódulos no sistema radicular da planta, tornando esse processo dinâmico e responsivo aos fatores edafoclimáticos, e acompanhando as necessidades da planta (CASSINI e FRANCO, 2006).

Com o início do período reprodutivo tem-se um incremento da atividade fotossintética e um decréscimo de infecção e formação de nódulos, uma vez que, há uma competição dos fotoassimilados, que deixam de ser uma fonte energética para os nódulos e passam a se acumular nos órgãos reprodutivos, bem como a remobilização do N de órgãos vegetativos para formação de vagens e grãos (FARGEIX et al., 2004). A partir desse estágio os nódulos começam a apresentar estagnação e redução de seu crescimento em número e massa, uma vez que os nutrientes estão sendo acumulados na semente, e não mais fornecidos as estruturas nodulares.

### *Azospirillum*

Entre as alternativas tecnológicas na agricultura com a finalidade de potencialização na eficiência e uso de fertilizantes químicos, está a utilização de inoculantes a base de bactérias promotoras de crescimento vegetal. Este grupo compreende microrganismos que coexistem de forma associativa na raiz, rizosfera e nos tecidos internos de diferentes órgãos de várias espécies de plantas, com a capacidade de estimular o crescimento e desenvolvimento, através de mecanismos diretos e/ou indiretos, nas plantas inoculadas (HUNGRIA et al., 2010).

De forma direta, essas bactérias atuam na síntese de fitormônios vegetais que, promovem o desenvolvimento da planta graças o suprimento gerado para esses compostos, o que favorece a planta para conseguir explorar o solo e absorver água e nutrientes, aumentando sua resistência a estresses bióticos e abióticos (SINGH et al., 2013) e, também, atuam como agentes de controle biológico por induzirem resistência sistêmica na planta (BASHAN et al., 2014).

De maneira semelhante a utilização de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* como fornecedor de nitrogênio, as bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* merecem atenção, pois promovem a fixação do nitrogênio atmosférico para várias

espécies, incluso leguminosas (FERREIRA et al.,2013) e, também, apresentam a capacidade de produzir e liberar para a planta compostos promotores de crescimento ou, até mesmo, estimular a produção endógena desses compostos (RODRIGUES et al., 2012), reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados, sem diminuir a eficiência da cultura (HUNGRIA et al., 2010).

Há vasta literatura que comprova a eficiência do gênero *Azospirillum*, sobretudo na interação com plantas forrageiras e gramíneas, com várias pesquisas relacionadas a sua capacidade de produção de fitormônios que induz o crescimento radicular e melhoram a absorção de água e nutrientes pelas plantas (DOORNBOS et al., 2012). Estudos demonstraram que alguns destes compostos, produzidos na interação planta-microrganismo, já foram identificados, tais como a auxina, ácido 3-indolacético (AIA) (CROZIER et al., 1988), citocininas (CACCIARI et al., 1989), ácido giberélico (BOTTINI et al., 1989), além de outros compostos indólicos (CROZIER et al., 1988).

De acordo com Araújo et al. (2012) o sinergismo destas bactérias com a produção endógena da planta, pode aumentar a quantidade de compostos promotores de crescimento e auxiliar o desenvolvimento e produtividade das plantas, pois, observou-se sistemas radiculares mais desenvolvidos em plantas de soja que receberam inoculação nas sementes com *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* (BÁRBARO et al., 2009). Paralelo a isso, a produtividade de plantas de feijão (GITTI et al., 2012) e soja (BÁRBARO et al., 2009) foram incrementadas pela inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e maiores valores médios de massa seca de parte aérea foram verificados em plantas de feijão com a inoculação de *Azospirillum brasilense* nas sementes (Gitti et al., 2012).

## **2.4 Indicadores de qualidade do solo**

O solo é ambiente fornecedor de água e nutrientes para as plantas e onde ocorrem reações químicas e bioquímicas que permitem a ciclagem dos elementos constituintes dos materiais orgânicos. O recente conceito de qualidade do solo na agricultura envolve produtividade e melhorias na química, física e biologia das frações do solo, resultando em incremento na qualidade na dinâmica produtiva e conservação da água e do ar (GARBUSU et al., 2011).

Novas tecnologias de manejo são essenciais para reduzir a degradação dos solos pelo aumento dos processos de erosão, perdas de teores de C orgânico e redução da diversidade e da atividade microbiana dos agroecossistemas (MENDES et al., 2015).

Assim, compreender as mudanças que ocorrem nas características biológicas dos solos em função do seu uso e manejo assume grande importância (COSTA et al., 2008). Neste sentido, os indicadores de qualidade do solo são fundamentais para monitorar os impactos, sejam positivos ou negativos, resultantes de fenômenos naturais ou de atividades antrópicas (ARSHAD e MARTIN, 2002). Um bom indicador de qualidade de solo deve ser capaz de refletir o seu funcionamento, identificar as formas de perturbações ou melhorias, ser economicamente viável, ter facilidade de monitoramento, apresentar especificidade individual aos padrões de espaço e tempo e, finalmente, mostrar distribuição universal (HOLLOWAY e STORK, 1991).

Os atributos de qualidade do solo podem ser mensurados através do uso de indicadores físicos, químicos e biológicos, que estão relacionados com atributos que medem ou refletem o status ambiental ou a condição de sustentabilidade do sistema (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007).

Os indicadores mais recomendados para avaliação da qualidade do solo, em função do seu uso e manejo, são aqueles que respondem às variações ambientais e podem variar em curto e médio prazos (PEZARICO et al., 2013). Assim, o uso de atributos microbiológicos para avaliação da qualidade do solo vem sendo progressivamente adotado, por responderem de forma mais rápida às alterações ambientais (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007; LOURENTE et al., 2011).

Os indicadores mais recomendados para avaliação da qualidade do solo, em função do seu uso e manejo, são aqueles que respondem às variações ambientais e podem variar em curto e médio prazos (PEZARICO et al., 2013). Assim, o uso de atributos microbiológicos para avaliação da qualidade do solo vem sendo progressivamente adotado, por responderem de forma mais rápida às alterações ambientais (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007; LOURENTE et al., 2011). Dentre estes atributos podem ser utilizados, carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS), respiração basal ou atividade metabólica (C-CO<sub>2</sub>), quociente metabólico ( $qCO_2$ ) e quociente microbiano ( $qMIC$ ). Além das atividades enzimáticas do solo correspondentes à  $\beta$ -glucosidase (ciclo do carbono), fosfatase (ciclo do fósforo) e arilsulfatase (ciclo do enxofre) como medidas da qualidade do solo.

Lopes et al. (2013a, 2013b) propuseram uma estratégia para a interpretação dos valores dos atributos microbiológicos em Latossolos de textura argilosa, baseada nos princípios da calibração de nutrientes, contrapondo a uma identificação de uma situação observada em condições de campo, possibilitando a construção de todo um procedimento de calibração, relacionando os atributos microbiológicos à produtividade das culturas e aos teores de matéria orgânica do solo (MOS).

O funcionamento biológico dos solos de Cerrado possui algumas peculiaridades (MENDES et al., 2015) que podem levar a interpretações errôneas dos indicadores biológicos. Áreas nativas do Cerrado com teores de matéria orgânica semelhantes aos das áreas cultivadas apresentam consistentemente menores atividades de  $\beta$ -glicosidase (LOPES et al., 2013a; PEIXOTO et al., 2010). Essa observação, que poderia ser considerada uma anomalia (STOTT et al., 2010), está na realidade relacionada com a quantidade e qualidade dos resíduos vegetais retornados ao solo, que são mais complexos nas áreas nativas do que nas áreas agrícolas (PEIXOTO et al., 2010), resultando em redução da atividade da  $\beta$ -glucosidase, uma enzima que atua na etapa final de decomposição da celulose (TABATABAI, 1994).

Deste modo, para avaliar a qualidade dos solos agrícolas, faz-se mais coerente e adequado utilizar as classes de interpretação baseadas no rendimento das culturas e na matéria orgânica, do que o uso dos solos sob vegetação nativa como referência. A tabela de referência utilizada como base para interpretação dos bioindicadores do solo argilosos no Cerrado foi proposta por Lopes et al. (2013a), enquanto que para solos arenosos ainda não há estudos que possibilitem parâmetros de referência.

## **2.5 Biomassa microbiana do solo**

A biomassa microbiana do solo (BMS) é considerada a parte viva e ativa da matéria orgânica do solo (MOS), desempenhando importante papel nas funções-chave, como o controle da decomposição e o acúmulo de matéria orgânica no ambiente, regulação do fluxo de matéria e energia do solo, ciclagem de nutrientes, solubilização de nutrientes (ROSCOE et al., 2006)

Para determinar o teor de carbono presente na biomassa, é utilizado o método de fumigação – extração descrito por Vance et al. (1987), que se baseia no fato do carbono presente nos microrganismos mortos pela fumigação ser liberado para o solo. O carbono da biomassa microbiana do solo (C-BMS), proporcional a menor fração de C orgânico do

solo, apresentando rápida ciclagem, podendo ser utilizado como indicador dos níveis da matéria orgânica do solo, ou como índice da sustentabilidade do sistema de produção (MELE e CARTER, 1993).

Igualmente a isto, é comumente avaliada a respiração basal ou atividade metabólica (C-CO<sub>2</sub>), que reflete diretamente a atividade dos microrganismos e informa quanto à atividade biológica do solo (ROSCOE et al., 2006). Deste modo, a respiração basal (C-CO<sub>2</sub>), corresponde ao valor obtido da medição de CO<sub>2</sub> emanado das amostras não fumigadas durante o período de incubação, refletindo a atividade microbiana, pela sua respiração (BALLOTA et al., 1998).

Da mesma forma que outras atividades metabólicas, a respiração resulta do estado fisiológico das células e é influenciada por diversos fatores, como a umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes no solo. Valores elevados da liberação de C-CO<sub>2</sub> implicam em uma maior atividade biológica, que está diretamente relacionada com a disponibilidade de carbono no solo (MERCANTE et al., 2006).

O quociente metabólico ( $qCO_2$ ) é um índice que combina os resultados de biomassa microbiana com as determinações das taxas de respiração, representado pela taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana. Ou seja, é a razão entre a respiração basal e a biomassa microbiana do solo, por unidade de tempo (ANDERSON e DOMSCH, 1990). Ele expressa quanto de CO<sub>2</sub> é liberado pela biomassa microbiana em função do tempo, representando a taxa de respiração específica da biomassa microbiana (ALVES et al., 2011).

Já o quociente microbiano ( $qMIC$ ), reflete a eficiência da conversão do carbono da MO em C microbiano e pode indicar situação em que a microbiota esteja enfrentando algum tipo de estresse. Desta forma, quando o ambiente se mostra mais estável, seus valores tendem a crescer (MERCANTE et al., 2006). O  $qMIC$  reflete o percentual de reserva do carbono orgânico total no solo, de modo que em áreas com atividade microbiana reduzida conseqüentemente apresentam baixos valores de quociente microbiano, indicando menor reserva de compostos orgânicos nessas áreas (CARNEIRO et al., 2009), enquanto que altos índices de  $qMIC$  indicam que a matéria orgânica do solo é ativa e está sujeita a ser decomposta pela microbiota.

A biomassa microbiana e a respiração basal, assim como seus índices derivados de  $qMIC$  e  $qCO_2$ , são determinações importantes no estudo da dinâmica e comportamento da matéria orgânica do solo (ROSCOE et al., 2006).

## 2.6 Atividade enzimática

No solo ocorrem reações químicas e bioquímicas que possibilita a ciclagem e reutilização de nutrientes na natureza e dentre os constituintes do solo que possibilitam esse processo existem moléculas de caráter proteico, especializadas em catalisar reações químicas, denominadas enzimas, que nos ciclos biogeoquímicos, transformam o material orgânico, aceleram a ciclagem dos nutrientes e servem de parâmetros para a identificação da qualidade biológica do solo (BALOTA et al., 2013).

Os microrganismos são responsáveis pela maior parte das enzimas presentes no solo, podendo estar presentes no interior celular ou ligadas a membrana externa celular, na solução do solo, adsorvidas à superfície de minerais de argila ou substâncias húmicas ou em espaços interlamelar de minerais de argila (MARGON e FORNASIER, 2008).

A atividade enzimática de um solo pode fornecer informações úteis do ponto de vista de sua qualidade, uma vez que, boa parte dessa atividade está relacionada à formação de complexos com a MO e com a fração argila, indicando se o manejo adotado favorece uma estabilização da matéria orgânica e de outras propriedades estruturais do solo (DICK e BURNS, 2011).

### **Arilsulfatase**

A arilsulfatase é constituída por um grupo enzimático que catalisam a hidrólise de ésteres de aril-sulfatos orgânicos. Estas enzimas são encontradas em plantas, microrganismos e animais e são responsáveis por parte da ciclagem do enxofre nos solos, mineralizando o S orgânico para sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ), forma absorvível pelas plantas (TABATABAI, 1994).

Uma parte considerável das arilsulfatases presentes no solo são secretadas por bactérias em resposta a limitação do S (MCGILL e COLLE, 1981), sendo normalmente correlacionadas com a biomassa microbiana e o nível de imobilização do S (KLOSE e TABATABAI, 1999).

## **Fosfatases**

A denominação genérica do grupo de enzimas que catalisam a hidrólise dos ésteres e anidros de fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) é a fosfatase. De acordo com os compostos que hidrolisam, essas enzimas são classificadas como: pirofosfatases, metafosfatases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases e fosfotriesterases. Pela ação das fosfatases, as moléculas orgânicas que apresentam fosfato como radical livre sofrem ciclagem, e liberam álcool e ácido fosfórico. Como a maioria dos solos agricultáveis são ácidos, principalmente em condições tropicais e subtropicais, se utiliza avaliar o comportamento da fosfatase ácida (BALOTA et al., 2013).

Com papel fundamental no ciclo do fósforo (P) nos solos, as fosfatases, são relacionadas com a deficiência de P e o crescimento das plantas. A atividade desta enzima está relacionada com os teores de P inorgânico presente nos solos, de modo que a adubação pode influenciar sua atividade, que geralmente aumenta após adição de pequenas doses de fertilizantes e decresce com doses mais elevadas (SKUJINS, 1967).

## **$\beta$ -glucosidase**

Sendo umas das mais comuns e predominantes enzimas do solo a  $\beta$ -glucosidase realiza a hidrólise limite da celulose, com importância marcada na hidrólise e biodegradação de vários resíduos nos ecossistemas (TABATABAI, 1994), apresentando como produto final a glicose, importante fonte de C para os microrganismos do solo.

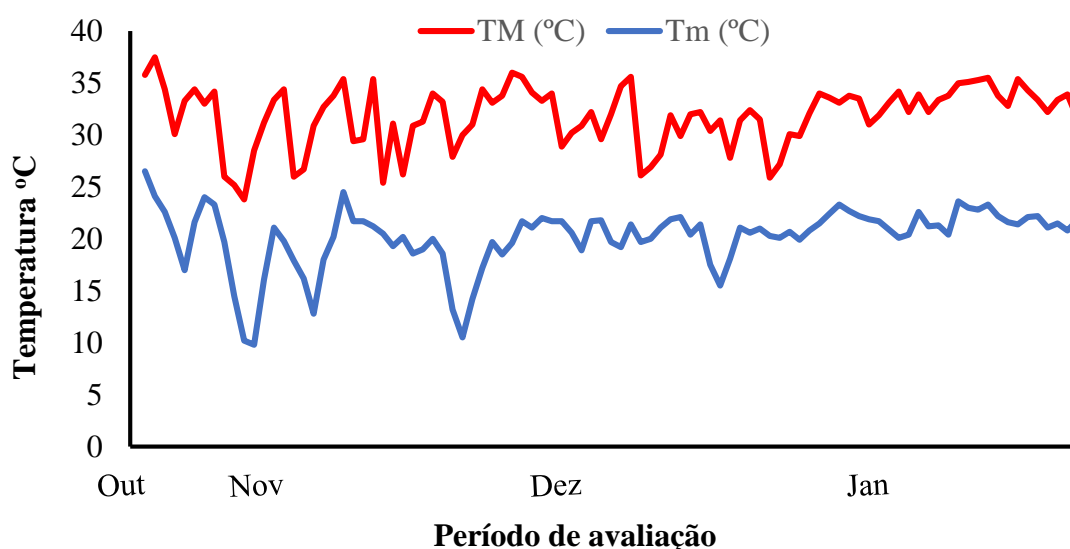
A  $\beta$ -glucosidase pode dar uma ideia da atividade biológica passada, e da capacidade do solo em estabilizar a matéria orgânica. Esta enzima pode ser utilizada para detectar o efeito do manejo do solo e como indicadora da qualidade do solo, bem como relações com o teor de matéria orgânica do solo (ACOSTA-MARTINEZ e TABATABAI, 2000).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e clima

O experimento foi conduzido na Embrapa Agropecuária Oeste, em Dourados, MS, no período correspondente a safra de verão 2016/2017. O ensaio foi realizado em casa telada não climatizada com cobertura de vidro, de modo a permitir a luminosidade ambiente, e com laterais revestidas com arame galvanizado, possibilitando a livre circulação de ar, para não causar sombreamento nas culturas.



**FIGURA 1.** Temperaturas máximas (TM °C) e mínimas (Tm °C) obtidas pela estação experimental da Embrapa CPAO durante a condução do ensaio da soja. Dourados, 2017. Fonte: Embrapa Agropecuária Oeste (2013).

#### 3.2 Delineamento experimental e tratamentos

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com parcelas subdivididas (2 x 5) com 6 repetições. A parcela principal foi composta por dois solos, um com textura argilosa (Latosolo Vermelho eutrófico - LVe) e o outro com textura arenosa (Latosolo Vermelho Amarelo distrófico - LVAd), e, como nas subparcelas, foram alocados os tratamentos de inoculação na soja e na cultura de outono-inverno, sendo: adubação química nitrogenada na semeadura das soja e no milho safrinha (CN),

inoculação com *Azospirillum brasilense* apenas na soja (CA), inoculação com *Bradyrhizobium* apenas na soja (CB), inoculação com *A. brasilense* no milho safrinha e com *Bradyrhizobium* na soja (CA+CB) e inoculação com *A. brasilense* no milho safrinha e coinoculação de *Bradyrhizobium* com *A. brasilense* na soja (CA; CA+CB).

### 3.4 Histórico dos cultivos em vasos

Os tratamentos foram implantados em outubro de 2014 com a cultura da soja, tendo a soja cv. BRS 360 cultivada no verão e o, milho híbrido DKB 390PRO consorciado com *Brachiaria brizantha* cv. Paiaguás durante o outono-inverno, seguindo uma sucessão de cultivos, até a soja no verão 2016/2017 (Quadro 1).

**QUADRO 1.** Histórico de cultivo nos vasos com referência aos tratamentos aplicados nas safras de verão e outono-inverno, nos anos de 2014 a 2017. Dourados, 2017

Ano	2014/2015		2015/2016		2016/2017	
	Verão (soja)	Inverno	Verão (soja)	Inverno	Verão (soja)	Inverno
<b>CN</b>	BRS360	Milho+Braquiária	BRS388	Milho+Braquiária	BRS 1001PRO	BRS 1001PRO
<b>CA</b>	BRS360	Milho+Braquiária	BRS388	Milho+Braquiária	BRS 1001PRO	BRS 1001PRO
<b>CB</b>	BRS360	Milho+Braquiária	BRS388	Milho+Braquiária	BRS 1001PRO	BRS 1001PRO
<b>CA+CB</b>	BRS360	Milho+Braquiária	BRS388	Milho+Braquiária	BRS 1001PRO	BRS 1001PRO
<b>CA+CB+A</b>	BRS360	Milho+Braquiária	BRS388	Milho+Braquiária	BRS 1001PRO	BRS 1001PRO

Com Nitrogênio em safra de verão e inverno (CN); Com *Bradyrhizobium* na safra de verão (CB); Com *Azospirillum* na safra de verão (CA); Com *Azospirillum* na safra de inverno e *Bradyrhizobium* na safra de verão (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A).

### 3.3 Caracterização do solo

Foram utilizados dois tipos de solo, classificados de acordo com Santos (2013) como sendo um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico (LVAd), textura arenosa (72,6% de areia e 22,3% de argila), e outro um Latossolo Vermelho Eutrófico típico (LVE), textura argilosa (16% de areia e 72,3% de argila). Ambos os solos foram coletados em lavouras de cultivos anuais, em áreas onde não havia histórico de inoculação com microrganismos.

Os solos foram colocados em vasos de PVC de 60 cm de altura e 40 cm de diâmetro onde foram colocados 60 kg de solo seco ao ar.

Antes da implantação da cultura foi realizada a correção da acidez e padronização da fertilidade (Quadro 2). Na semeadura da soja foi realizada uma adubação com 2,5 g vaso<sup>-1</sup> (equivalente a 200 kg ha<sup>-1</sup>) do formulado NPK 0-20-20.

**QUADRO 2.** Atributos químicos do solo realizada na implantação do experimento. Dourados, MS, 2017

Solo	pH	P (Mehlich <sup>-1</sup> )	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	K <sup>+</sup>	CTC efetiva	V	C total
	CaCl <sup>2</sup> (1:2,5)	(mg dm <sup>-3</sup> )	.....(cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ).....			.....(%).....		
<b>Argiloso</b>	5,5	39,794	4,99	1,20	0,20	6,4	60,1	1,28
<b>Arenoso</b>	5,9	29,184	3,39	0,86	0,16	4,4	63,4	0,61

Potencial hidrogeniônico do solo (pH); Fósforo (P); Cálcio (Ca<sup>2+</sup>); Magnésio (Mg<sup>2+</sup>); Potássio (K<sup>+</sup>); Capacidade de troca catiônica (CTC); Porcentagem de saturação por bases (V%); Carbono orgânico total (C%).

### 3.4 Metodologia de inoculação

As estirpes utilizadas para a inoculação de *A. brasilense* foram AbV5 e AbV6 com 2x10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>, e para os tratamentos com *B. japonicum* foram as estirpes de *B. elkani* (587) e *B. japonicum* (5080) com 6x10<sup>1</sup> UFC g<sup>-1</sup>, obtidas de produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2011).

A soja foi semeada no dia 18 de outubro de 2016, sendo abertos sulcos de 3 a 4 cm onde foram colocadas 10 sementes por vaso para avaliação dos tratamentos. A cultivar de soja utilizada foi a BRS 1001 IPRO, com tolerância ao herbicida glifosato e controle de lagartas, ciclo precoce, com tipo de crescimento indeterminado e grupo de maturidade relativa 6.2. Apresenta, também, moderada resistência ao nematoide de galhas *Meloidogyne javanica* (EMBRAPA, 2015).

Foram separadas 500 g de sementes, que foram previamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio, a 3%, por 10 minutos, seguida de tríplice lavagem com água destilada. Os tratamentos compostos por inoculação com *B. japonicum*, foram inoculados com 6 g de inoculante turfoso, na proporção de 60 g de inoculante para cada 50 kg de sementes, imediatamente antes da semeadura.

Os tratamentos submetidos a inoculação com *A. brasilense* foram aplicados no momento da semeadura, sendo que cada semente foi inoculada com 0,5 mL de solução da suspensão comercial. Em seguida os sulcos foram fechados com solo e a primeira irrigação foi realizada 15 horas após a semeadura.

Quinze dias após a semeadura, foi realizado o desbaste, deixando seis plantas por vaso.

A umidade do solo foi mantida próximo de 80 % da capacidade de campo, aplicando-se água da chuva, por gotejamento captada por calhas na própria casa telada.

O controle de pragas e plantas infestantes foi realizado manualmente, durante todo o período de cultivo.

### **3.5 AVALIAÇÕES**

#### **Morfofisiologia de plantas de soja**

No estágio V4 foram coletadas duas plantas de cada vaso para determinação de altura de plantas (AP), número de folíolos por planta (NFPP), número de trifólios (NT), área foliar (AF), massa verde (MVH) e seca de haste (MSH) e o teor de massa seca de folhas (TMSF) e de hastes (TMSH). A altura de plantas foi avaliada com régua entre o colo da planta até a inserção do último trifólio e o número de folíolos (em V4 e R1), número de vagens e de grãos por planta foram quantificados manualmente.

No estágio R1, foram coletadas duas plantas para determinação de altura de plantas, diâmetro de haste (DH), número de folíolos, área foliar, massa seca de haste (PSH), massa seca de folhas (PSF) e concentração foliar de nutrientes. A área foliar foi determinada por projeção da sombra, com o equipamento LI-3100C, LI-COR sendo os valores expressos em cm<sup>2</sup>. O diâmetro da haste das plantas, foi avaliado com auxílio de paquímetro digital, Digimess<sup>®</sup>, na altura do colo da planta, sendo os resultados expressos em milímetros (mm).

Na maturação fisiológica, foram avaliadas três safras de soja referentes ao ensaio, de modo que coletaram-se as duas plantas por vaso com as quais determinou-se altura final de planta, número de vagens por planta, número de grãos por vagem, rendimento de matéria seca de haste e vagens, peso total de grãos e produtividade estimada.

A massa de plantas foi quantificada em balança digital e posteriormente acondicionada em estufa com circulação de ar forçada à 60 °C, por 72 horas, até atingir massa seca constante e os resultados expressos em gramas (g), sendo aferidos nos estágios fenológicos V4, R1 e em maturação fisiológica da cultura.

#### **Diagnose foliar no estágio reprodutivo**

Para a diagnose da concentração nutricional foliar em estágio R1, as plantas foram coletadas e os folíolos com pecíolos destacados e lavados com água destilada, secas em estufa com circulação de ar forçada à 60 °C, por 72 horas, as amostras foram moídas em moinho de facas tipo Willye, malha de 20 mesh. A determinação do nitrogênio foi realizada pela técnica proposta por Kjeldahl em 1883, e a determinação dos demais nutrientes das plantas (fósforo, potássio, cálcio, enxofre, magnésio, zinco, ferro, cobre) foram realizadas segundo metodologias descritas por Malavolta et al. (1997).

### **Biomassa Microbiana no solo**

Foram realizadas duas avaliações da atividade da biomassa microbiana, com profundidade de 0-10 cm, uma avaliação sete dias antes da semeadura da safra 2016/2017 e outra ao fim do ciclo da cultura da soja, sete dias antes da colheita, em janeiro de 2017. A atividade da biomassa microbiana foi obtida pelo método da fumigação-extração, proposto por Vance et al. (1987) e Tate et al. (1988) e o quociente metabólico ( $qCO_2$ ), definido pela relação entre a respiração e a biomassa, foi determinado, conforme Anderson e Domsch (1990), pela equação:  $\mu\text{g C-CO}_2 \cdot \text{g solo fresco}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} / \text{mg biomassa} \cdot \text{C} \cdot \text{g solo}^{-1}$ .

### **Atividade enzimática do solo**

Sete dias antes da colheita da soja, foram coletadas amostras de solo, com trado de rosca manual, na profundidade de 0-10 cm, levadas ao laboratório e realizadas as determinações da atividade das enzimas Fosfatase, Arilsulfatase e  $\beta$ -glucosidase de acordo com a metodologia descrita por Tabatabai (1994).

## **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ , utilizando o programa SISVAR (Ferreira, 2011).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 MORFOFISIOLOGIA DE PLANTAS

A altura de plantas, massa verde de haste e área foliar por planta foram influenciadas pelo tipo de solo estudado, de forma que, os maiores valores foram observados quando a planta foi cultivada em solo argiloso (Quadro2). O número de trifólios por planta, em estágio fenológico V4, foi influenciado pelas inoculações realizadas (Quadro 3).

**QUADRO 3.** Altura de plantas (AP), massa verde de haste (MVH) e área foliar por planta (AFPP) de soja em estágio V4, cultivada em arenoso e argiloso, com diferentes tratamentos nas sementes, em Dourados, MS, 2017

Solo	AP ----(cm)----	AFPP ----(cm <sup>2</sup> )----	MVH ----(g)----
Arenoso	12,43 b	152,64 b	5,99 b
Argiloso	13,92 a	184,52 a	7,76 a
Média	13,17	169,58	6,87
CV (%)	13,40	30,81	49,44

Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Coeficiente de variação em porcentagem (CV%).

Para altura de plantas (AP), área foliar por planta (AFPP) e massa verde de haste (MVH) os maiores valores foram observados no solo argiloso (Tabela 2). O solo argiloso tem maior capacidade de manter a fertilidade, o que se torna uma característica favorável no cultivo de plantas. Isso ocorre pelo fato de solos com teores de argila elevados apresentarem maior quantidade de cargas elétricas para retenção de nutrientes que apresentam maiores teores de areia (Quadro 1). Estes últimos estes são mais propensos ao processo de lixiviação dos nutrientes, justamente por possuírem menor quantidade de cargas elétricas. Com maior quantidade de cargas e estabilidade na retenção de nutrientes, solos argilosos apresentam maior probabilidade de eficiência para o fornecimento de elementos químicos essenciais para o desenvolvimento e crescimento vegetal. Desse modo, o processo de irrigação dos vasos pode ter contribuído para intensificar o processo de lixiviação dos nutrientes fornecidos na adubação, gerando uma menor disponibilidade nutricional na solução do solo para as plantas cultivadas em solo arenoso.

Quando analisado o efeito das inoculações sobre a cultura em estágio V4, evidencia-se que o tratamento CB induz o maior número de trifólios que os tratamentos CN e CA (Quadro 4). Estes resultados, no entanto, não influenciaram a área foliar ( $\text{cm}^{-2}$  planta $^{-1}$ ) denotando não ocorrer redução na área fotossintética das plantas mesmo com um número variado de folhas.

**QUADRO 4.** Número de trifólios por planta de soja em estágio fenológico V4, cultivada em arenoso e argiloso sob diferentes tratamentos na semente, em Dourados, MS, 2017

Tratamento	Número de trifólios
CN	44,6 b
CB	67,2 a
CA	46,3 b
CA+CB	49,0 ab
CA+CB+A	55,1 ab
Média	52,4
CV (%)	30,6

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%).

Sabe-se que para um adequado desenvolvimento inicial é relevante o bom estabelecimento da cultura e um incremento fotossintético pode ser ocasionado a partir do aumento de folhas da planta, fornecendo maior quantidade de fotoassimilados para o desenvolvimento radicular e da parte aérea da planta (DARTORA, 2015). Deste modo, os tratamentos CB, CA+CB e CA; CB+CA, podem proporcionar maior acréscimo no número de folhas.

Os dados obtidos corroboram com o estudo de Bulegon et al. (2016), que ao trabalhar com formas de coinoculação (sulco e sementes), não verificaram diferenças entre o tratamento controle e as inoculações isoladas ou combinadas, para área foliar e massa seca da parte aérea de plantas de soja em estágio V4. Entretanto, observaram que no estágio V6 a coinoculação com *B. japonicum* nas sementes proporcionou incremento de 14,2% a inoculação para área foliar.

A avaliação para área foliar, massa verde de folha, massa seca de folha, massa seca de haste, teor de massa seca de folhas e o teor de massa seca de haste não diferiram estatisticamente para as formas de inoculação (Quadro 5). As variáveis analisadas em estágio fenológico V4 não são influenciadas pelos tratamentos testados.

**QUADRO 5.** Variáveis analisadas em plantas de soja cultivada em solo arenoso e argiloso, com diferentes tratamentos nas sementes. Dourados, 2017

Variável	Média	Coefficiente de variação (%)
Área foliar (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	690,21	45,48
Massa verde de folhas (g planta <sup>-1</sup> )	10,26	44,97
Massa seca de folhas (g planta <sup>-1</sup> )	2,16	44,74
Massa seca de haste (g planta <sup>-1</sup> )	1,12	47,26
Teor de massa seca de folha (%)	21,17	12,48
Teor de massa seca de haste (%)	16,35	20,11

Médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

No estágio R1 as inoculações isoladas ou em combinações, bem como o uso de fertilizantes nitrogenados não influenciaram as avaliações sobre as características morfológicas da soja (Quadro 6). Deste modo, pode-se afirmar que todas as combinações de inoculação testadas são igualmente equivalentes a adubação nitrogenada para as variáveis mensuradas, tanto no cultivo em solo arenoso quanto em solo argiloso.

**QUADRO 6.** Médias referentes as variáveis avaliadas em plantas de soja no estágio R1, cultivada em solo arenoso e argiloso, com tratamentos nas sementes. Dourados, 2017

Variável	Média	Coefficiente de variação (%)
Altura de planta (cm planta <sup>-1</sup> )	46,94	13,4
Diâmetro de haste (mm planta <sup>-1</sup> )	4,04	21,61
Número de trifólios (unitário)	98,03	25,15
Massa verde de haste (g planta <sup>-1</sup> )	28,98	33,22
Massa verde de folha (g planta <sup>-1</sup> )	33,51	28,39
Massa seca de haste (g planta <sup>-1</sup> )	22,56	41,59
Massa seca de folha (g planta <sup>-1</sup> )	6,61	33,99
Área foliar por planta (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	1137	34,07
Teor de massa seca de folhas (%)	19,41	11,17
Teor de massa seca de haste (%)	17,21	15,86

Médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .



No estágio R1, a inoculação isolada de *A. brasilense*, as variáveis biométricas foram equivalentes a utilização de ureia, a inoculação convencional com *B. japonica* e ao processo de coinoculação. Isso pode ser explicado pelas características que estes microrganismos proporcionam diretamente ao desenvolvimento das plantas, como a fixação biológica do N em si, produção e liberação de fitormônios e solubilização de fosfatos, ou por mecanismos indiretos, como aumento da resistência da a estresses bióticos e abióticos (BULGARELLI et al., 2013).

De acordo com a literatura as bactérias endofíticas, como *A. brasilense*, sintetizam e liberam fitormônios para as plantas, como auxinas, citocininas, giberilinas e promovem a regulação da biossíntese de etileno, além de liberar uma variedade de moléculas bioativas (YANG et al., 2009). Com isso, os produtos metabólicos destas bactérias, que atuam sinergicamente aos fitormônios produzidos pela planta, proporcionam incrementos no volume radicular das plantas, favorecendo a absorção de água, nutrientes e fertilizantes, elevando a eficiência do uso do solo e produção vegetal.

Deste modo, como não ocorreu diferença estatística para os parâmetros avaliados, pode-se inferir que há uma compatibilidade associativa entre a cultivar de soja BRS1001 IPRO com as estirpes AbV5 e AbV6, de modo que o sinergismo molecular entre planta-bactéria é bem-sucedido e culmina na expressão dos mecanismos de promoção de crescimentos proporcionados pelas bactérias, em resposta ao uso dos solos arenoso e argiloso pela planta, igualando-se ao processo associativo com o *B. japonicum*, já recomendado para cultura, e a adubação com ureia na dose estudada.

Isso pode ser reforçado pela ampla capacidade associativa que o *A. brasilense* apresenta com diversas plantas não gramíneas, como em trabalho conduzido por Madhaiyan et al. (2010), em que foi estudada a inoculação desta bactéria em três culturas, e observaram que ocorreu um aumento da parte aérea de tomateiro, de pimentão vermelho e do volume radicular de arroz, além de elevar a porcentagem de nitrogênio nas plantas de tomate, demonstrando a variedade de associações bem sucedidas com diversas plantas.

Entretendo, sabe-se que fatores edafoclimáticos e de manejos da cultura podem influenciar na eficiência dos microrganismos. Estes fatores ocorreram no trabalho realizado por Perez (2014), que ao trabalhar com inoculações e adubação nitrogenada em feijoeiro, cultivar Pérola, verificaram que a produção de massa seca da parte aérea foi superior quando houve a inoculação com *B. tropici* e *A. brasilense* associados. Todavia, a população final de plantas de feijão submetidas ao tratamento inoculado apenas com *A. brasilense* foi menor do que aos demais tratamentos, o que pode ter proporcionado

melhores condições de uso e exploração do solo pelas plantas, resultando em um maior acúmulo de massa seca final.

Para os dados referentes a biometria de plantas e índices de produtividade da cultura em maturação fisiológica, tem-se os dados de dois anos agrícolas anteriores ao ensaio realizado, de modo que, além da safra 2016/2017 (Quadros 11 e 12), são apresentados os dados referentes as safras 2014/2015 (Quadros 7 e 8) e 2015/2016 (Quadros 9 e 10).

As avaliações realizadas em maturação fisiológica da cultura da soja cv. BRS 360, referente a safra 2014/2015, não apresentaram interação pelo teste de médias aplicado para os tipos de solo e inoculações. Entretanto, foi observado efeito isolado do tipo de solo para os valores de peso seco de hastes e vagens, número de vagens, peso de grãos e produtividade estimada (Quadro 7) e os tratamentos de inoculação utilizados apresentaram efeito significativo para peso seco de haste e vagens, peso de grãos e produtividade estimada (Quadro 8) pelo teste de médias a nível de significância de  $p < 0.05$ .

**QUADRO 7.** Massa seca de haste e vagens (MSH), número de vagens (NV), massa de 100 grãos (M100G) e produtividade estimada de grãos da soja cv. BRS 360 cultivada em solo arenoso e argiloso, safra 2014/2015. Dourados, MS, 2017

Solo	PSH (g)	NV ----	M100G (g)	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
Arenoso	32,81 b	70,60 b	13,88 b	1105 b
Argiloso	47,64 a	103,36 a	18,61 a	1481 a
Média	40,22	86,98	16,65	1293
CV(%)	25,61	22,15	32,16	32,16

Coefficiente de variação em porcentagem (CV%).

Em solo argiloso as plantas de soja apresentaram maior produtividade massa seca remanescente no solo, sendo representada pelo peso de haste e vagens, de modo a potencializar a ciclagem de nutrientes e incrementar a cobertura do solo (Quadro 7). Os índices produtivos de número de vagens e peso de cem grãos, também foram superiores em solo argiloso, o que garante incrementos no potencial produtivo da cultura e, embasando a maior produtividade estimada nesta classe de solo.

Ocorreu efeito significativo referente aos tratamentos de inoculação para peso seco de haste e vagens (PSHV), massa de cem grãos (M100G) e produtividade estimada (Quadro 8). Os restos culturais, representados por PSHV, peso de cem grãos e

produtividade estimada apresentaram maiores valores quando a cultura foi submetida aos tratamentos CB e CA; CB+A, sem diferir estatisticamente do tratamento CA, demonstrando uma capacidade de incremento de matéria seca para restos culturais e no potencial produtivo superiores a adubação nitrogenada para a cv. BRS 360, garantido a não substituição da inoculação por *Bradyrhizobium* pela adubação nitrogenada na cultura.

Vale ressaltar que o tratamento CA referente a inoculação isolada da soja com *Azospirillum* apresentou uma redução de produtividade equivalente a 350 kg há<sup>-1</sup>, mesmo sendo estatisticamente igual ao tratamento CB, mas que em vias praticas representa um equivalente de 5,8 sacas há<sup>-1</sup>, demonstrando a necessidade das pesquisas e do discernimento do responsável técnico da cultura para empregar o melhor manejo.

**QUADRO 8.** Massa seca de haste e vagens (PSH), massa de 100 grãos (M100G) e produtividade estimada de grãos da soja cv. BRS 360 com tratamentos nas sementes, safra 2014/2015. Dourados, MS. 2017

Tratamento	PSHV (g)	M100G (g)	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
CN	33,31 b	13,74 b	1094 b
CB	48,27 a	19,92 a	1586 a
CA	39,13 ab	15,53 ab	1236 ab
CA+CB	34,07 b	13,05 b	1039 b
CA+CB+A	46,33 a	18,99 ab	1512 ab
Média	40,22	16,65	1293
CV	25,61	32,16	32,16

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); . Coeficiente de variação (CV%).

De forma semelhante a esses resultados Pardino e Primieri (2015) verificaram incremento nos valores de peso de mil grãos e na produtividade da soja cv. NA 5909 ao avaliar o efeito da coinoculação das sementes de soja, sendo os tratamentos compostos pela inoculação com *Bradyrhizobium* e a coinoculação superiores ao tratamento testemunha.

Quando analisados os valores referentes ao cultivo da soja, cv. BRS 388, para a safra 2015/2016, observou-se efeito isolado apenas para a variável tipo de solo em relação as avaliações realizadas para o peso seco de haste e vagens (Quadro 9), sendo que os demais parâmetros avaliativos não foram influenciados pelas classes de solo de cultivo e nem para as formas de inoculação e adubação nitrogenada (Quadro 10).

**QUADRO 9.** Peso seco de haste e vagens das plantas de soja, cv. BRS 388, analisadas em maturação fisiológica da cultura cultivada em duas classes de solo, safra 2015/2016. Dourados, MS, 2017

Solo	Peso seco de haste e vagens (g planta <sup>-1</sup> )
Arenoso	13,27 b
Argiloso	17,77 a
Média	15,52
C.V.(%)	32,59

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Coeficiente de variação (CV%).

Diferentemente da safra anterior, na qual ocorreu diferença significativa para inoculação em relação a adubação nitrogenada para peso de cem grãos e produtividade estimada, na safra 2015/2016 com a cv. BRS 388, ocorreu uma equiparação dos tratamentos com as diferentes formas de inoculação ao fornecimento de N via ureia no momento da semeadura (Quadro 10).

**QUADRO 10.** Altura de plantas (AP) massa de 100 grãos (M100), número de grãos por planta (NGPP), número de vagens por planta (NVPP) e produtividade estimada de grãos de soja, cv. BRS 388, em solo arenoso e argiloso, submetidas a inoculação e coinoculação nas sementes na safra 2015/2016. Dourados, 2017

	Altura de plantas (cm)	Peso de 100 grãos (g)	Número de grãos por planta ----	Número de vagens por planta ----	Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )
Média	60,86	11,3	197,68	65,89	1.691
CV (%)	15,15	32,59	34,6	35,68	28,08

Coeficiente de variação em porcentagem (CV%).

Para esta cultivar, não foram influenciadas pelos tratamentos a altura de plantas, a massa de cem grãos, o número de grãos por vagem, o número de vagens por planta e produtividade estimada. Isso pode ser explicado pela afinidade que ocorre entre os microrganismos e a planta e que potencializam a atividade da bateria e liberação de N para a planta, de modo que a cv. BRS 360 possa apresentar uma relação simbiótica mais eficiente com estes microrganismos que a cv. BRS 388.

Para as avaliações biométricas realizadas na maturação fisiológica da cultura, referente a safra 2016/2017, a cv. BRS 1001 IPRO a inoculação influenciou apenas a altura final das plantas (Quadro 11). As variáveis número de vagens, número de grãos, peso seco de haste e vagens, peso de grãos e produtividade estimada não apresentaram diferenças significativas pela estatística seja em função do solo de cultivo ou a forma de inoculação nas sementes (Quadro 12), evidenciando a equivalência das formas de inoculação ao fornecimento de N via adubação com ureia.

**QUADRO 11.** Altura de plantas de soja (cm) na maturação fisiológica da cultura, referente a safra 2016/2017, cv. BRS 1001 IPRO, inoculadas e coinoculadas nas sementes. Dourados, MS, 2017

Tratamento	Altura de plantas ----- (cm) -----
CN	70,97 a
CB	58,54 b
CA	60,85 b
CA+CB	56,95 b
CA+CB+A	60,41 b
Média	61,55
CV(%)	9,01

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%).

De forma semelhante aos dados obtidos para altura de plantas por Bulegon et. al. (2016) que ao estudarem o efeito da inoculação isolada e combinada de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em duas cultivares de soja, BMX Turbo e CD250, verificaram que as variedades apresentaram respostas diferentes as inoculações estudadas. A cultivar BMX Turbo apresentou maior altura de plantas, com efeito dos tratamentos, quando inoculada com *Azospirillum*, corroborando com os dados obtidos quando a BRS1001 IPRO. Ainda, o número de vagens não sofreu efeito dos tratamentos e nem das cultivares estudadas por estes autores.

Para o número de vagens não foram observadas diferenças estatística para o tipo de solo e inoculação testado, diferentemente dos dados obtidos por Braccini et. al. (2016), que estudando a coinoculação e modos de aplicação, verificaram que um valor maior referente ao número de vagens por planta se dá quando a soja está inoculada unicamente com *B. japonicum*, seja ele líquido ou turfoso, sem diferir estatisticamente da

associação de três doses de *B. japonicum* na semente com 2 doses de *A. brasilense* no sulco de semeadura, cabe ressaltar que a utilização destes microrganismos responde de forma diferente de acordo com o local e condições de cultivo.

O número de grãos por planta não teve influência de solo e nem pela forma de fornecimento de nitrogênio para planta, demonstrando que a resposta a inoculação e adubação nitrogenada depende da cultivar utilizada. A BRS 1001 IPRO alcançou produtividade semelhante nos tratamentos CN e nos tratamentos com inoculante (Quadro 12). Da mesma forma, o resíduo fornecido pelos restos culturais de haste e vagens da soja demonstrou não apresentou significância no teste de medias. Isso demonstra a capacidade de incremento de material orgânica do solo, cobertura do solo e fonte de matéria base para ciclagem e reincorporação de nutrientes, proporcionada pelas técnicas de inoculação estudadas são equivalentes ao fornecimento de N para a cultura da soja, proporcionando os mesmos benefícios as culturas seguintes.

**QUADRO 12.** Média de variáveis morfofisiológicas em plantas de soja, cv. BRS 1001 IPRO, na maturação fisiológica da cultura, em solo arenoso e argiloso, submetidas a inoculação e coinoculação nas sementes. Dourados, 2017

Variável	Média	Coefficiente de variação (%)
Número de vagens por planta	79,05	28,98
Número de grãos	152,49	27,88
Peso seco de haste e vagens (g planta <sup>-1</sup> )	21,42	30,73
Peso de 100 grãos (g 100 grãos <sup>-1</sup> )	15,02	27,03
Produtividade (kg ha <sup>-1</sup> )	3758	27,03

Médias não diferiram entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

Estes dados corroboram com o estudo realizado por Battisti et. al. (2016) que avaliando a inoculação isolada e a coinoculação de *Bradyrhizobium* com diferentes doses de *Azospirillum*, não verificaram efeito dos tratamentos sobre o número de vagens por planta e na produtividade final dos tratamentos na cultura da soja.

A massa de 100 grãos e a produtividade não teve efeito de solo tampouco pela fonte de nitrogênio para a planta, seja ela mineral ou proveniente das combinações inoculativas. Discordando dos resultados obtidos por Braccini (2016) no qual observou que a massa de mil grãos da soja apresentou efeito do uso isolado de *Bradyrhizobium* liquido ou turfoso ou três doses de *Bradyrhizobium* com duas doses de *A. brasilense* no sulco de semeadura. Essas formas de inoculação promoveram acréscimos significativos, sendo a coinoculação 36% mais produtiva que o tratamento com adubação nitrogenada,

demonstrando benefícios tanto da inoculação como da coinoculação para as áreas de cultivos da soja.

## 4.2 DIÁGNOSE FOLIAR

De acordo com os resultados obtidos com a diagnose foliar das plantas de soja (Quadro 13) em estágio vegetativo R1, não foi observado diferença estatística para nitrogênio, potássio, cálcio e enxofre em função do tipo de solo e tratamentos de inoculação nas sementes. Isso indica que ocorre uma equivalência no acúmulo dos nutrientes na parte aérea das plantas com fornecimento pela ureia e os tratamentos de inoculação em ambos os solos cultivados para a planta no estágio reprodutivo.

**QUADRO 13.** Concentração foliar de nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca) e enxofre (S) na soja em estágio R1, sob cultivo em solo arenoso e argiloso, submetidas a inoculação nas sementes. Dourados, 2017

	N	K	Ca	S
	(%)	.....(g kg <sup>-1</sup> ).....		
Média	3,86	7,27	17,83	2,35
CV (%)	10,46	36,05	8,77	9,06

Coefficiente de variação (CV%).

Os dados obtidos corroboram com os encontrados por Bulegon et al. (2015), que ao trabalhar com duas variedades de soja, sob efeito de adubação nitrogenada, inoculação e coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*, verificaram que em estágio vegetativo R1 não ocorreu diferença estatística quanto ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea das plantas de soja. Entretanto, os autores relatam que houve menor índice de abortamento de vagens e maior acúmulo de N nos grãos no tratamento com inoculação com *B. japonicum* para a cultivar CD 250. De acordo com os autores, esse fato pode estar ligado ao aporte de N e fornecimento pela simbiose, onde o mesmo é exigido em grande quantidade na manutenção e formação das vagens pela cultura da soja, visto que, normalmente nessa fase se tem redistribuição do N na planta.

Discordando dos resultados observados, Schneider et al. (2017) ao avaliar doses de *Azospirillum* inoculado de forma isolada ou associado com *Bradyrhizobium* para a coinoculação, verificaram que o acúmulo de N em tecido foliar das plantas de soja varia

de acordo com as combinações das doses de inoculantes em estágio V5. Entretanto, quando analisados em R2, a concentração de N no tecido foliar das plantas foi, estaticamente igual para todas as combinações de inoculação avaliadas. Em R2 é quando se tem um elevado acúmulo de matéria seca e nutrientes pela planta. Esse processo se inicia em folhas, hastes e raízes e, a partir desse momento, passa a translocar parte dos nutrientes, inclusive o N, para as flores e depois para vagens e sementes, diminuindo assim o teor de N nas folhas (FAGAN et al. 2007).

Entretanto, ao avaliar os teores de cálcio da parte aérea sob a influência da inoculação da soja com *B. japonicum* e *A. brasilense*, Garcia (2015) verificou que a inoculação gerou efeito significativo apenas para o acúmulo deste nutriente em tecido foliar, no estágio R2, quando inoculada com *A. brasilense* com dose de 400 mL ha<sup>-1</sup> do inoculante (11% superior ao valor médio referente ao tratamento testemunha). Os demais nutrientes tiveram acúmulo classificados como suficientes para um bom desenvolvimento da cultura, sem diferir de acordo com os tratamentos.

Quanto aos dados obtidos na diagnose foliar para a concentração de potássio, os valores encontrados estavam a baixo dos esperados para a cultura da soja em estágio vegetativo R1, que de acordo com indicações propostas por Rajj et al. (1996) indicam valores no intervalo de 17 a 25 g.kg<sup>-1</sup> de K. Estes baixos valores podem ser explicados pela metodologia utilizada no preparo das amostras de folha, uma vez que ocorreu a lavagem das mesmas com água destilada, o que pode ter acarretado no desprendimento do nutriente do tecido foliar, reduzindo sua concentração na parte aérea das plantas e, sendo evidenciadas com a análise química laboratorial.

Verificou-se, ainda, com a diagnose foliar maior concentração de fósforo (3,31 g Kg<sup>-1</sup>) nas plantas submetidas a inoculação com *Bradyrhizobium* e a menor concentração (2,78 g Kg<sup>-1</sup>) foi observada no tratamento com adubação nitrogenada (Quadro 14). Apenas o magnésio diferiu estatisticamente apresentando maiores valores (8,61 g Kg<sup>-1</sup>; 8,64 g Kg<sup>-1</sup>) quando a cultura foi adubada com nitrogênio ou inoculado com *Bradyrhizobium*.



**QUADRO 14.** Conteúdo de fósforo (P), magnésio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe) e cobre (Cu) em folhas de soja em no estágio R1, submetidas a inoculação nas sementes. Dourados, 2017

Tratamento	P	Mg	Zn	Fe	Cu
	(g Kg <sup>-1</sup> )	(g Kg <sup>-1</sup> )	(g Kg <sup>-1</sup> )	(g Kg <sup>-1</sup> )	(g Kg <sup>-1</sup> )
CN	2,78 b	8,61 a	55,33 a	156,51 ab	7,09 a
CB	3,31 a	8,64 a	54,34 ab	162,54 ab	6,82 ab
CA	3,01 ab	7,77 b	47,11 ab	179,98 ab	6,87 ab
CA+CB	2,94 ab	8,09 ab	49,35 b	144,29 b	6,23 b
CA+CB+A	3,17 ab	7,2 b	50,66 a	184,71 a	6,48 ab
Média	3,04	8,06	53,36	165,6	6,7
CV (%)	13,11	15,76	12,55	19,41	10,89

Médias seguidas por letra iguais diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%); Fósforo em gramas por quilograma de matéria seca (P); Magnésio em gramas por quilograma de matéria seca (Mg); Zinco em gramas por quilograma de matéria seca (Zn); Ferro em gramas por quilograma de matéria seca (Fe); Cobre em gramas por quilograma de matéria seca (Cu).

O ferro diferiu estatisticamente para tratamento, apresentando o maior valor (184,71 g Kg<sup>-1</sup>) sob a inoculação com *Azospirillum* em cultura antecessora e coinoculação na cultura da soja e o menor valor (144,29 g Kg<sup>-1</sup>) foi observado no tratamento com inoculação com *Azospirillum* em cultura antecessora e inoculação com *Bradyrhizobium* na soja. O zinco e o cobre apresentaram o maior valor (55,33 g Kg<sup>-1</sup> e 7,09 g Kg<sup>-1</sup>), respectivamente quando submetidos a adubação nitrogenada e o menor valor (49,35 g Kg<sup>-1</sup> e 6,23 g Kg<sup>-1</sup>) sob o tratamento com inoculação com *Azospirillum* em cultura antecessora e inoculação com *Bradyrhizobium* na soja.

### 4.3 ATIVIDADE MICROBIANA

O tipo de solo influenciou as variáveis microbiológicas estudadas (Quadro 15). O solo argiloso proporcionou maior teor de carbono da biomassa microbiana (C-BMS) independente da presença ou ausência de inoculação.

Quando avaliado o C-BMS nos solos em pré semeadura verificou-se diferenças significativas em relação aos tratamentos em solo argiloso e diferenças menos discrepantes em solo arenoso, de modo a inferir que a flora bacteriana não estava constante em solo argiloso. Isso porquê, em início de cultivo na safra de verão 2016/2017, os solos já apresentavam efeito dos cultivos e inoculações anteriores a este ensaio,

demonstrando uma identidade de estabilização própria de cada tratamento e favorecimento da estabilidade do C-BMS promovida pela textura de cada tipo de solo.

Para a avaliação do C-BMS (Quadro 15) nos resultados obtidos durante a implantação da soja verificaram-se valores superiores em solo argiloso, enquanto que no período de avaliação em final de ciclo da cultura houve uma tendência de equivalência dos valores entre os solos. Entretanto, na avaliação de final de ciclo da soja, verificou-se maior quantidade de C-BMS quando as plantas foram cultivadas em solo arenoso, com destaque para o incremento do C-BMS no tratamento CA;CB. Esse resultado é possível por que, na safra de inverno, houve o plantio de milho consorciado com braquiária, inoculada com *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* na soja, que neste tratamento apresentou um acréscimo de 118%, sem diferir estatisticamente da do tratamento CA;CB+A, que apresentou um acréscimo de 266% no C-BMS em solo arenoso. Os demais tratamentos que receberam inoculação isolada ou adubação nitrogenada, foram inferiores.

**QUADRO 15.** Atributos microbiológicos do solo sob cultivo da soja inoculada e coinoculada em avaliação de pré plantio e em maturação fisiológica da cultura, 2017

Carbono da biomassa microbiana (C-BMS) ( $\mu\text{g C g}^{-1}\text{solo seco}$ )									
Tratamento	Antes do semeio				Final de ciclo				
	Argiloso		Arenoso		Argiloso		Arenoso		
CN	201,64	a B	121,12	b A	121,28	a C	126,84	a B	
CB	463,88	a A	102,23	b A	303,1	a A	135,38	b B	
CA	127,21	a C	97,98	a A	188,21	a B C	137,36	a B	
CA+CB	255,75	a B	113,54	b A	215,38	a B	247,14	a A	
CA+CB+A	105,04	a D	52,71	b A	189,16	a B C	193,35	a AB	
Média	163,51				185,72				
CV%	20,75				20,83				
Respiração basal (C-CO <sub>2</sub> ) ( $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}\text{solo dia}^{-1}$ )									
Tratamento	Antes do semeio				Final de ciclo				
	Argiloso		Arenoso		Argiloso		Arenoso		
CN	15,97	a B	15,94	a A	6,38	a B	7,56	a A	
CB	19,35	a B	18,31	a A	3,53	b B	12,18	a A	
CA	26,93	a A	14,61	b A	13,26	a A	9,06	b A	
CA+CB	18,09	a B	15,63	a A	15,92	a A	11,71	b A	
CA+CB+A	15,14	a B	13,07	a A	77,14	b B	11,37	a A	
Média	17,3				9,81				
CV%	20,46				27,69				

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%).

Com a análise de C-BMS no final do ciclo da cultura inoculada no ato da semeadura para o solo de textura argilosa, observou-se uma variação menor dos valores, seja de incremento ou redução para a variável, destacando o acréscimo de 47% e 80% nos tratamentos CA e CA; CB+A, respectivamente, em relação aos obtidos no período de pré-*semeio* da soja.

De maneira geral, exceto para o  $q_{MIC}$ , os maiores valores de C-BMS, C-CO<sub>2</sub> e  $q_{CO_2}$  ocorreram no solo argiloso. Isso se deve ao fato de que em solo argiloso o teor de matéria orgânica ser mais elevado que em solo arenoso, pois a argila atua na proteção da matéria orgânica retardando sua decomposição, formando, assim, microhabitats para os microrganismos dentro da estrutura do solo.

Para o solo argiloso o tratamento CA proporcionou melhor incremento na atividade da C-BMS, uma vez que, após a inoculação e cultivo sob esse tratamento, mesmo com uma redução do C-BMS, obteve-se redução favorável para as variáveis C-CO<sub>2</sub> e  $q_{CO_2}$  e, ainda uma elevação no valor de  $q_{MIC}$  (Quadro 15), por haver redução no nível de stress do ambiente com os microrganismos.

Já no tratamento com histórico de inoculação associado a coinoculação, os dados demonstram que ocorreu uma elevação dos valores de C-BMS que, também elevaram os valores de respiração basal e cociente de respiração com elevação discreta do carbono orgânico, possivelmente pelo estresse no ambiente.

Quando comparado os tratamentos em função dos atributos biológicos, no solo arenoso ao final do ciclo da soja, observa-se que em todas as formas de inoculação ocorreu um acréscimo do C-BMS, com redução dos valores de C-CO<sub>2</sub> (Quadro 14) e  $q_{CO_2}$ , mantendo constante a  $q_{MIC}$  (Quadro 16), por haver maior equilíbrio do ambiente em função das inoculações realizadas.

No solo arenoso o tratamento CA:CB, aumentou os valores de C-BMS e reduziu dos valores de C-CO<sub>2</sub> e  $q_{CO_2}$ , promoveu um aumento nos valores de  $q_{MIC}$ , indicando favorecimento deste tratamento para a atividade microbiológica do solo, sendo um manejo importante para o solo e para a cultura.

No presente trabalho ocorreu incremento dos valores de C-BMS quando realizada a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio e promotoras de crescimento nos todos os tratamentos em solo arenoso. Dessa forma, pode-se inferir, com os dados do presente trabalho, que o processo de inoculação foi um fator a elevar esse parâmetro nos solos de cultivo.

Quanto ao uso de nitrogênio mineral, em ambos os tipos de solo ocorreu redução dos valores da atividade da C-BMS, entretanto Yanna et al. (2013) avaliando a atividade destes microrganismos em solos sob cultivos florestais, observaram que não ocorreram grandes mudanças na biomassa microbiana do solo com a adição de nitrogênio. O resultado obtido por estes pesquisadores sugere que a C-BMS pode não ser tão sensível à adição de nutrientes como outros trabalhos apresentam, e sim ao tipo de cultivo empregado na área.

**QUADRO 16.** Atributos microbiológicos do solo sob cultivo da soja inoculada e coinoculada em avaliação de pré plantio e em maturação fisiológica da cultura, 2017

Quociente metabólico ( $qC-CO_2$ ) ( $\mu g C-CO_2 \mu g^{-1} C-BMS h^{-1}$ )									
Tratamento	Antes do semeio				Final de ciclo				
	Argiloso		Arenoso		Argiloso		Arenoso		
CN	33,59	a B	59,2	a A	22,76	a A B	25,73	a B	
CB	17,89	a B	74,91	a A	4,78	b C	37,4	a A	
CA	95,15	a A	72,63	a A	28,61	a A	27,53	a B	
CA+CB	25,72	a B	66,52	a A	31,07	a A	19,9	b A B	
CA+CB+A	164,08	a A	59,14	b A	15,23	b B C	24,96	a A B	
Média			66,88				23,8		
CV%			82,74				24,06		
Quociente microbiano ( $qMIC$ ) (%)									
Tratamento	Antes do semeio				Final de ciclo				
	Argiloso		Arenoso		Argiloso		Arenoso		
CN	1,3734	b B	3,5755	a A	0,0419	b B	0,2221	a B	
CB	3,1204	a A	2,92	a A	0,1157	b A	0,2235	a B	
CA	0,0701	b B	2,5843	a A	0,0757	b A B	0,2241	a B	
CA+CB	1,5542	b B	2,8354	a A	0,0749	b A B	0,3515	a A	
CA+CB+A	0,3439	b B	3,0619	a A	0,0697	b A B	0,3287	a A	
Média			2,2239				0,1737		
CV%			27,98				15,39		

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%).

A variação verificada dos resultados obtidos, apresentando redução de valores entre o início e final do ciclo, podem ser explicados pelo fato de que as análises foram realizadas em vasos onde já havia sendo cultivado culturas de soja e consorcio de milho com braquiária, visto a finalidade de ocorrer o histórico de inoculação nos tratamentos.

#### 4.4 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Houve interação significativa entre inoculação e tipos de solo para as enzimas  $\beta$ -glucosidase, arilsulfatase e fosfatase ácida.

Para a enzima  $\beta$ -glucosidase todas as médias encontradas foram classificadas como “adequadas” para o solo argiloso de acordo com a interpretação proposta por Lopes et al. (2013a). Neste solo, argiloso, destaca-se o tratamento com inoculação isolada por *B. japonicum*, diferindo dos demais tratamentos (Quadro 17). Embora não haja uma tabela de parâmetros para essas variáveis em solo arenoso, os valores encontrados para esta enzima, foram inferiores em relação aos encontrados em solo argiloso e entre os tratamentos, sendo o tratamento composto por adubação com N estatisticamente superior para essa avaliação. Em ambos os solos, o tratamento composto por histórico de inoculação com *A. brasilense* e coinoculação demonstrou valores inferiores aos demais tratamentos.

**QUADRO 17.** Atividade das enzimas  $\beta$ -glucosidase e arilsulfatase sob cultivo da soja em final de ciclo da soja inoculada e co-inoculada. Dourados, 2017

Tratamentos	$\beta$ - glucosidase (mg p-nitrofenol kg <sup>-1</sup> de solo h <sup>-1</sup> )		Arilsulfatase (mg p-nitrofenol kg <sup>-1</sup> de solo h <sup>-1</sup> )	
	Arenoso	Argiloso	Arenoso	Argiloso
CN	204,58 a B	868,341 b A	107,71 b B	127,96 a A
CB	154,22 c B	947,05 a A	107,28 b B	115,59 a A
CA	159,44 bc B	792,67 c A	112,94 ab B	122,64 b A
CA+CB	190,30 b B	817,194 c A	107,70 b A	11,45 b A
CA+CB+A	150,80 c B	819,477 c A	117,20 a B	125,81 a A
Média	510,409		116,229	
CV	4,08		3,92	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%).

A enzima  $\beta$ -glucosidase está relacionada ao ciclo do carbono, de modo que, quando mais elevado seu valor, maior a atividade decompositora da matéria orgânica do solo, e liberação do carbono orgânico. Relacionando a atividade desta enzima com a atividade da C-BMS nota-se um paralelo ente ambos no solo argiloso, uma vez que se faz coerente o tratamento CA apresentar maiores valores nas duas avaliações. Isto indica que a decomposição orgânica e formação de C está sendo efetiva neste tratamento.

De acordo com os dados, a atividade da enzima arilsulfatase, apesar de apresentar valores estatisticamente diferentes, encontram-se com atividade “adequada” para o solo argiloso, de acordo com a classificação proposta por Lopes et al. (2013a), apresentando valores superiores a 90 mg de p-nitrofenol kg<sup>-1</sup> de solo h<sup>-1</sup>. Em solo arenoso, o tratamento CA;CB+A foi superior aos demais tratamentos estudados. Assim, a coinoculação em sequência a cultivo de gramínea inoculada com *A. brasilense* aumenta a atividade desta enzima, favorecendo o ciclo do enxofre na camada 0,0 - 0,1 m do solo.

A atividade da enzima fosfatase ácida, em solo argiloso apresentou nível de atividade “baixo”, de acordo com o proposto por Lopes et al. (2013). Entretanto, em solo arenoso a atividade foi menor que em solo argiloso. É possível que em solos com uma textura arenosa, por apresentarem uma menor capacidade de retenção de água que solos argilosos, ocorreu um comprometimento da atividade enzimática. A enzima necessita estar na solução do solo, sendo necessário que o substrato possa difundir-se ou mover-se até a enzima por fluxo de massa para que possa ser transformado (SCHMITZ, 2003).

Em solo arenoso foi observado um resultado discrepante para enzima fosfatase ácida quando avaliada sob o tratamento referente a adubação nitrogenada, por meio da adição de ureia ao solo (Quadro 18). Esse dado pode ser explicado pelo fato de essa enzima ser mais atuante em solos com caráter mais ácido e a adubação com ureia pode ter gerado uma redução do pH neste meio, uma vez que de acordo com Caires et al. (2015) o uso de fertilizantes contendo amônio ou ureia acarretam na acidificação do solo, principalmente quando são empregadas doses elevadas no sistema de produção.

Com menor quantidade de cargas, o solo arenoso foi acidificado em sua camada superficial com a hidrólise da ureia, de forma que os íons H<sup>+</sup> liberados no sistema passaram a ocupar as cargas negativas existentes nas partículas coloidais deste solo, potencializando a atividade da fosfatase ácida. O mesmo efeito não foi observado em solo argiloso, uma vez que neste solo há maior quantidade de cargas coloidais e maior poder tampão do solo, o que reduziu o efeito acidificante da dose de ureia aplicada ao tratamento, bem como não potencializou a atividade da enzima.

**QUADRO 18.** Atividade da enzima fosfatase ácida sob cultivo da soja em final de ciclo da cultura, sob cultivo em solo arenoso e argiloso, inoculada e co-inoculada nas sementes. Dourados, 2017

Tratamentos	Fosfatase (mg p-nitrofenol kg <sup>-1</sup> de solo h <sup>-1</sup> )	
	Arenoso	Argiloso
CN	68,49 a B	128,96 c A
CB	4,097 b B	156,51 b A
CA	9,455 b B	202,37 a A
CA+CB	14,59 b B	143,51 bc A
CA+CB+A	12,61 b B	139,86 c A
Média	88,051	
CV	8,1	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ . Com Nitrogênio (CN); Com *Bradyrhizobium* (CB); Com *Azospirillum* (CA); Com *Azospirillum* na safrinha e *Bradyrhizobium* na safra (CA+CB); Com *Azospirillum* na safra de inverno e com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na safra de verão (CA+CB+A); Coeficiente de variação (CV%).

Em solo argiloso, esta atividade enzimática apresentou diferença estatística para o tratamento inoculado com *A. brasilense*, o que pode ser embasado por estudo conduzido por Verma et al. (2001) que avaliando estirpes de bactérias promotoras de crescimento em arroz comprovaram a capacidade destas bactérias em solubilizar o fosfato mineral adjacente a rizosfera, aumentando a disponibilidade de fósforo para o crescimento microbiano e/ou vegetal. Como neste tratamento há a presença apenas de *A. brasilense*, a probabilidade de maior solubilização de fosfato pode ser um fator que incrementou a atividade da enzima fosfatase ácida neste solo, elevando seu valor em relação aos demais tratamentos, e, por consequência, elevando a concentração de fosforo disponível na solução do solo no sistema.

Lisboa et al. (2012) verificaram que a atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase apresentou maiores índices em área de plantio direto, sendo superior, inclusive, que os resultados obtidos em campo natural. De forma paralela se obteve os resultados para fosfatase ácida. Para a atividade da arilsulfatase, observou-se valores superiores nos tratamentos em que não ocorreu o revolvimento do solo, sendo que em alguns períodos, o plantio direto apresentou valores estatisticamente superiores ao campo nativo de referência. Estudos como esse ajudaram a comprovar a eficiência de um sistema para a manutenção da atividade enzimática do solo, de modo a permitir mais estudo para confirmação da eficiência enzimática com outras práticas agrícolas, como a inoculação e o sistema de sucessão de cultivos entre soja e milho consorciado com forrageiras.

Avaliando os atributos biológicos do solo na cultura do café, em Minas Gerais, sob diferentes manejos de cultivo, Lammel et al. (2015) observaram o maior valor de C

da biomassa microbiana quando o café é cultivado de forma consorciada com *Arachis pintoii*, enquanto que a maior concentração de N da biomassa microbiana se dá em cultivo convencional. Para análises da atividade enzimática do solo, observaram que a enzima Sulfatase apresenta maior atividade em cultivo orgânico e de café consorciado com *B. decumbens* e a aril-sulfatase apresenta maior atividade em café sob manejo orgânico e consorciado com *B. decumbens*. Com isso pode-se inferir que o cultivo consorciado com espécies do gênero *Brachiaria* potencializa a atividade das enzimas fosfatase e arilsulfatase, o que pode ter incrementado os resultados obtidos neste estudo, uma vez que a soja estava em cultivo de sucessão ao milho consorciado.



## 5. CONCLUSÕES

A soja apresenta produtividade equivalente quando inoculada e não adubada com ureia em semeadura.

A inoculação de sementes de soja com *Azospirillum brasilense* apresenta resultados de equivalência a soja inoculada com *Bradyrhizobium* e ao processo de coinoculação.

O cultivo da soja reduz a atividade microbiana do solo em solos de textura arenosa e argilosa.

A inoculação com *Bradyrhizobium* na soja em sistema de sucessão com milho safrinha consorciado apresenta maior sustentabilidade para a biomassa microbiana do solo.

Solo argiloso cultivado com soja apresenta maior atividade da biomassa microbiana e maior atividade das enzimas arilsulfatase,  $\beta$ -glucosidase e fosfatase ácida que o solo arenoso.

## 6. REFERENCIAS

ACOSTA-MARTINEZ, V. & TABATABAI, M.A. Enzyme activities in a limed agricultural soil. **Biology and Fertility of soils**, 31:85-91, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Adubos**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/>>. Acesso em: jan. 2018.

ALVES, T. D. S.; CAMPOS, L. L.; ELIAS NETO, N.; MATSUOKA, M.; LOUREIRO, M. F. Biomassa e atividade microbiana de solo sob vegetação nativa e diferentes sistemas de manejo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 2, 2011.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Application of eco-physiological quotiens ( $qCO_2$  and  $qD$ ) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, p.251-255, 1990.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biology and Fertility of soils**, v.1, p. 81-89, 1985.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

ARAUJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; DA SILVA, E I. F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.521-527, 2012.

ARSHAD, M.; MARTIN, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 88, n. 2, p. 153-160, 2002.

BALOTA, E. L.; NOGUEIRA, M. A.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M.; FAGOTTI, D. S.; MELO, G. M. P.; SOUZA, R. C. MELO, W. J. Enzimas e seu papel na qualidade do solo. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 8. P. 189-249, 2013.

BÁRBARO, I. M.; BARBARO JUNIOR, L. S.; TICELI, M.; MACHADO, P. C.; MIGUEL, F. B. Resultados preliminares da coinoculação de *Azospirillum* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, p. 1-6, 2011.

BÁRBARO, I. M.; MACHADO, P. C.; BÁRBARO JUNIOR, L. S.; TICELLI, M.; MIGUEL, F. B.; SILVA, E J. A. A. Produtividade da soja em resposta a inoculação padrão e coinoculação. **Colloquium Agrariae**, v.5, p.1-7, 2009.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. B. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, p. 1-33. 2014.

BHUVANESWARI, T. V.; TURGEON, B. G.; BAUER, W. D. Early Events in the Interfection of Soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, v. 66, p. 1027-1031, 1980.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, p.45-47, 1989.

BRACCINI, A. L.; MARIUCCI, G. E. G.; SUZUKAWA, A. K.; LIMA, L. H. S.; PICCININ, G. G. Coinoculação 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**. ISSN: 1983-1471 – Online. v.15, n.1, jan./mar., p.27-35, 2016.

BULEGON, L. G.; GUIMARÃES, V. F.; EGEWARTH, V. A.; SANTOS, M. G.; HELING, A. L.; FERREIRA, S. D.; WERGRAT, A. P. G. S.; BATTISTUS, A. G. Crescimento e trocas gasosas no período vegetativo da soja inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v.4, n.5, p.277-286, set/out. 2016.

BULEGON, L. G.; RAMPIM, L.; KLEIN, J.; KESTRING, D.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; INAGAKI, A. M. 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. 2015.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807-838, 2013.

CACCIARI, I; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant Soil**, v. 115, p.151-153, 1989.

CAIRES, E. F.; HALISKI, A.; BINI, A. R.; SCHARR, D. A. Surface liming and nitrogen fertilization for crop grain production under no-till management in Brazil. **European Journal of Agronomy**, v. 66, p. 41-53, (2015).

CARNEIRO, M. A. C.; SOUZA, E. D. D.; REIS, E. F. D.; PEREIRA, H. S.; AZEVEDO, W. R. D. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 147-157, 2009.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. **Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos**. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, J.; BORÉM, A. (Ed.). Viçosa: UFV, p. 143-170. 2006.

CHUNG, G.; SINGH, R. J. Broadening the genetic base of Soybean: a multidisciplinary approach. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 27, n. 5, p. 295-341, 2008.

CONAB - Companhia nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – Oitavo levantamento / maio 2017. V.4 – Monitoramento Agrícola - SAFRA 2016/17.** ISSN 2318-6852, p.1-144, 2017.

COSTA, F.S.; BAYER, C.; ZANATTA, J.A. & MIELNICZUK, J. Estoque de carbono orgânico no solo e emissões de dióxido de carbono influenciadas por sistemas de manejo no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.323-332, 2008.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.2833-2837, 1988.

DARTORA, J. Potencial de promoção de crescimento por estirpes de bactérias associativas na cultura do milho. **Tese**. Unioeste, 103 p. 2015

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 227-243. 2012.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA SOJA. **PRODUTOS E SERVIÇOS**. 2015. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/1823/soja--brs-1001ipro>>. Acesso em: dez. 2017.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Tecnologias de produção de soja na região central do Brasil**. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 18 de maio de 2017.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q. D. J. V.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia – PUC - RS**. v.14, n.1, p. 89-106. 2007.

FARGEIX, C.; GINDRO, K.; WIDMER, F. Soybean (*Glycine max*L.) and bacteroid glyoxylate cycle activities during nodular senescence. **Journal Plant Physiology**, v.161, p.183–190, 2004.

FERREIRA, A. S.; PIRES, R. R.; RABELO, P. G.; OLIVEIRA, R. C.; LUZ, J. M. Q.; BRITO, C. H. Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103-108. 2013.

FERREIRA, D. F. SISVAR. Sistema para análise de variância. Lavras: UFL/DEX, 2000, CD-ROM.

GALLOWAY, J. N.; DENTENER, F. J.; CAPONE, D. G.; BOYER, E. W.; HOWARTH, R. W.; SEITZINGER, S. P.; ASNER, G. P.; CLEVELAND, C. C.; GREEN, P. A.; HOLLAND, E. A.; KARL, D. M.; MICHAELS, A. F.; PORTER, J. H.; TOWNSEND,

A. R.; VOROSMARTY, C. J. Nitrogen cycles: past, present and future. **Biogeochemistry**, v. 70, p. 153–226, 2004.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. & EPELFDE, L. Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. **Applied Soil and Ecology**, v. 49, p.1-4, 2011.

GARCIA, A. Doses de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento das plantas, na produção e qualidade fisiológica de sementes de soja / Ariani Garcia. **Dissertação**. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistema de Produção, 2015.

GITTI, D. C.; ARF, O.; KANEKO, F. H.; RODRIGUES, R. A. F; BUZETTI, S.; PORTUGAL, J. R.; CORSINI, D. C. D. Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. **Revista Agrariam**, v.5, p. 36-46, 2012.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**, v. 311, p.1–18, 2008.

HOLLOWAY, J.D.; STORK, N.D. The dimensions of biodiversity: the use of invertebrates as indicator of human impact. In: HAWKSWORTH, D. L. (ed.). **The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture**. Wallingford: CAB International. p. 37-63, 1991.

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. 80p. (Documentos, 283). 2007.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35; Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13), 48 p. 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425. 2010.

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. and Newton, W.E. (Ed.). *Nitrogen fixation in agriculture: forestry ecology and environment*. Dordrecht, **Kluwer Academic Publishers**, p. 25-42, 2005.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. **Tecnologia de coinoculação da soja com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*: incrementos no rendimento com sustentabilidade e baixo custo**. XXXIII Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil – Londrina, PR, 2013.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKES, M. L. Nonsymbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1229–1244, 2004.

LAMMEL, D. R.; AZEVEDO, L. C. B.; PAULA, A. M.; ARMAS, R. D.; BARETTA, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Microbiological and faunal soil attributes of coffee cultivation under different management systems in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, p. 1519-6984, 2015.

LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; SILVEIRA, A. O.; MARTINS, A. F.; SELBACH, P. A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 45-55, 2012.

LOPES, A. A. de C.; SOUSA, D. M. G. de; CHAER, G. M.; REIS JUNIOR, F. B. dos; GOEDERT, W. J.; MENDES, I. de C. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 2, p. 461-472, 2013a.

LOPES, A. A. de C.; SOUSA, D. M. G. de; CHAER, G. M.; REIS JUNIOR, F. B. dos; GOEDERT, W. J.; MENDES, I. de C. Interpretation of microbial soil indicators as a function of crop yield and organic carbon in Cerrado Soils. **CSA News**, v. 58, n. 4, p. 12, 2013b.

LOURENTE, E. R. P.; MERCANTE, F. M.; ALOVISI, A. M. T.; GASPARINI, A. S.; GOMES, C. F.; NUNES, C. M. Atributos microbiológicos, químicos e físicos do solo sob diferentes sistemas de manejo e condições de Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 20-28, 2011.

MADHAIYAN, M. POONGUZHALI, S.; KANG, B. G.; LEE, Y. J.; CHUNG, J. B.; SA, T. M. Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. **Plant and Soil**, Crawley, v. 328, n.1, p. 71–82, 2010.

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

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº13**, de 24/03/20011. Diário Oficial da União – Sessão 1. ISSN 1677-7042 -Nº 58. Brasília, 2011.

MENDES, I. C.; SOUZA, D. M. G.; REIS JUNIOR, F. B. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 32, n. 1/2, p. 185-203, jan./ago. 2015.

MERCANTE, F.M.; OTSUBA, A.A.; SILVA, R.F.; HERNANI, L.C.; OLIVEIRA, H. Monitoramento de parâmetros microbiológicos em área manejadas sob plantio direto na Bacia Hidrográfica do Alto Taquari, MS. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, **Boletim Informativo 38**, 2006.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, 1995.

NOGUEIRA, M.A.; ALBINO, U.B.; BRANDÃO-JÚNIOR, O.; BRAUN, G.; CRUZ, M.F.; DIAS, B.A.; DUARTE, R.T.; GIOPPO, N.M.R.; MENNA, P.; ORLANDI, J.M.; RAIMAM, M.P.; RAMPAZO, L.G.L.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.E.Z.; VIEIRA, F.P.; TOREZAN, J.M.D.; HUNGRIA, M. & ANDRADE, G. Promising indicators for assessment of groecosystems alteration between natural, reforested and agricultural land use in southern Brazil. **Agriculture Ecosystem and Environment**, 115:237-247, 2006.

OLIVEIRA, J. R. A. O impacto de sistemas integrados de lavouras e pastagens na biomassa-C e na atividade biológica de um Latossolo Vermelho-Escuro de Cerrado. **Tese de Mestrado**. Brasília, Universidade de Brasília, 2000. 115p.

PEIXOTO, R. S.; CHAER, G. M.; FRANCO, N.; REIS JUNIOR, F. B. dos; MENDES, I. C.; ROSADO, A. S. A decade of land use contributes to changes in the chemistry, biochemistry and bacterial community structures of soils in the Cerrado. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 3, p. 403-413, Oct. 2010.

PEREZ, A. R.; Coinoculação de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro cultivado sob duas lâminas de irrigação: produção e qualidade fisiológica de sementes. **Dissertação**. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidade: Sistemas de Produção, 2014.

PEZARICO, C. R.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M.; DANIEL, O. Indicadores de qualidade do solo em sistemas agroflorestais. *Revista de Ciências Agrárias*. - **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, n.1, p. 40-47, 2013.

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. Estimulantes. In: RAIJ, B.van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. rev. Campinas: IAC. 1997. p. 93-95 (Boletim Técnico, 100).

REIS, V. M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. *Seropédica*, Embrapa Agrobiologia. 22p. (Documentos 232). 2007.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da coinoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Jornal**, v. 28, p.196-202, 2012.

ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B.; SANTOS, J. C. F.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana do solo: fração mais ativa da matéria orgânica. In: ROSCOE, R.; MERCANTE, F. M.; SALTON, J. C. (Ed.). **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas: modelagem matemática e métodos auxiliares**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. p. 163-198.

SCHMITZ, J. A. K. **Indicadores biológicos de qualidade do solo**. 2003. 234f. Tese (Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

SCHNEIDER, F.; PANIZZON, L. C.; SORDI, A.; LAJÚS, C. R.; CERICATO, A.; KLEIN, C. Eficiência agronômica da cultura da soja (*Glycine max* (L) Merrill) submetida a coinoculação. **Revista Scientia Agraria**, vol. 18, n. 4, p 72-79. ISSN 1983-2443. 2017.

SINGH, R. K.; MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant rowth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Bioscience Journal**, v. 5, p. 8-14. 2013.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E. (Orgs.). Cerrado correão do solo e adubação. 2 ed. Brasília- DF: Embrapa informação tecnológica, 2004.

STOTT, D. E.; ANDREWS, S. S.; LIEBIG, M. A.; WIENHOLD, B. J.; KARLEN, D. L. Evaluation of  $\beta$ -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. **Soil Science Society of America Journal**, v. 74, n. 1, p. 107-119, 2010.

TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: WEAVER, R.W.; SCOTT, A. & BOTTOMELEY, P.J.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, M. A. eds. Methods of soil analysis: **Microbiological and Biochemical Properties**. Madison, Soil Science Society of America, 1994. p. 778-835. (Special Publication, Microbial and Biochemical Proprietis 5).

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**, 5° ed., Porto Alegre: Artemed, 2013. 954p.

TATE, K. R.; ROSS, D. J.; FELTHAM, C. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures, **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, p.329-335, 1988.

TIMMERS, A.C.J.; AURIAC, M. C.; TRUCHET, G. Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-medicago* interection relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Great Britain: the Company of Biologists limited**. V. 126, p. 3617-3628. 1999.

VANCE, C. P. Root–bacteria interactions: symbiotic N<sub>2</sub> fixation. In *Plant Roots: The Hidden Half* (Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi, eds.), p. 839–867. Dekker, New York, 2002.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.703-707, 1987.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHL, A.K. Evaliiation of plant giowth-promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Bioteclmology**. Amsterdam. v.91, p.127-141, 2001.



VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil** v. 255, p. 571–586, 2003.

VESSEY, J. K.; PAWLOWSKI, K.; BERGMAN, B. Root-based N<sub>2</sub>-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. **Plant Soil**, v. 274, p. 51–78, 2005.

WARKENTIN, B. The changing concept of soil quality. **Journal of Soil Water Conservation**, v. 50, p.226-228, 1995.

YANG, J.; KLOPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 1-4, 2009.