SOBREVIVÊNCIA DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. PARA
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM INOCULANTES PREPARADOS
COM SUBSTRATO TURFOSO ENRIQUECIDO COM CARBONO

ANA HELENA BERGAMIN MAROZZI FERNANDES
Engenheira Agrônoma

Orientador: Dr. ELI SIDNEY LOPES

Dissertação apresentada a Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiróz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área
de Concentração: Microbiologia
Agrícola.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Fernandes, Ana Helena Bergamin Marozzi
F363s Sobrevivência de estirpes de Bradyrhizobium sp.
para amendoim (Arachis hypogaea L.) em inoculantes
preparados com substrato turfoso enriquecido com
carbono. Piracicaba, 1989.
63p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Amendoim - Inoculação artificial 2. Bactéria
fixadora de nitrogênio - Sobrevivência 3. Inoculan
te I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei-
roz, Piracicaba

CDD 635.659

SOBREVIVÊNCIA DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. PARA
AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM INOCULANTES PREPARADOS
COM SUBSTRATO TURFOSO ENRIQUECIDO COM CARBONO

ANA HELENA BERGAMIN MAROZZI FERNANDES

Aprovada em: 29/03/1990

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Eli Sidney Lopes

IAC/SAA

Profa. Dra. Elke Jurandi B. M. Cardoso

ESALQ/USP

Profa. Dra. Lázara Cordeiro

UNESP/Rio Claro

Prof. Dr. Eli Sidney Lopes
Orientador

Aos meus pais
e
Aos meus filhos
Ligia
Paula
Bruno
dedico

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Fernando, pela ajuda valiosa, compreensão e amor

A Neis, pelo estímulo nos momentos mais difíceis

Ao Dr. Eli, pela paciência e orientação

Ao pessoal da Seção de Microbiologia do Solo, IAC, pela ajuda prestada

Ao Erivaldo, pelo precioso auxílio nas análises estatísticas

Ao Instituto Agrônomo de Campinas / SA-SP, pela oportunidade oferecida

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pela bolsa concedida

Ao pessoal do CPAP/EMBRAPA

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho

agradeço

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Produção de inoculantes.....	20
3.1.1. Preparo do substrato.....	20
3.1.2. Estirpes empregadas.....	23
3.1.3. Produção do caldo de cultivo.....	24
3.1.4. Mistura do caldo ao substrato.....	24
3.1.5. Avaliação da sobrevivência.....	25
3.2. Teste de Eficiência dos inoculantes.....	26
3.2.1. Preparo dos vasos.....	26
3.2.2. Plantio.....	26
3.2.3. Tratamentos experimentais.....	27
3.2.4. Inoculação dos vasos.....	27
3.2.5. Avaliação.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1. Substrato.....	30
4.2. Avaliação de sobrevivência das estirpes.....	33
4.2.1. Taxa de mortalidade.....	34
4.2.2. Curvas de longevidade dos inoculantes.....	38

4.3. Avaliação da eficiência dos inoculantes.....	45
4.3.1. Avaliação de eficiência de nodulação.....	45
4.3.2. Avaliação de eficiência em fixação de Nitrogênio.....	48
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Características do Grafite FA-2 empregado no trabalho, obtidas a partir de especificação fornecida por Peres Moura Ltda.....	22
Tabela 2. Análise química dos constituintes do solo turfoso usado.....	31
Tabela 3. Características químicas e % de retenção de água apresentadas pela turfa de Badenoch (ROUGHLEY, 1970), usada como suporte de inoculantes na Austrália e pelo solo turfoso empregado neste trabalho.....	32
Tabela 4. Taxa de mortalidade (bactérias $\times$ semanas ⁻¹) das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> usadas nos inoculantes com diferentes concentrações de grafite.....	35
Tabela 5. Médias das taxas de mortalidade (bactérias $\times$ semanas ⁻¹) das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> usadas em inoculantes conservados em duas temperaturas diferentes.....	37

Tabela 6.Eficiência de nodulação e fixação de nitrogênio de três estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> em inoculantes. Média de 20 repetições.....	51
Tabela 7.Eficiência de nodulação e fixação de nitrogênio de três estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> inoculadas na forma de cultura pura. Média de 5 repetições.....	52
Tabela 8.Efeito da concentração de grafite nos inoculantes sobre a eficiência de nodulação e fixação de nitrogênio. Média de 15 repetições.....	53
Tabela 9.Efeito da temperatura de conservação dos inoculantes sobre a eficiência de nodulação e fixação de nitrogênio. Média de 60 repetições.....	54

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1. Sobrevivência da estirpe SMS-319 de *Bra-*
dyrhizobium sp. para amendoim (*Arachis*
hypogaea L.) em inoculantes com diferen-
tes concentrações de grafite, no perío-
do de 5 a 180 dias após a produção.....42
- Figura 2. Sobrevivência da estirpe SMS-561 de *Bra-*
dyrhizobium sp. para amendoim (*Arachis*
hypogaea L.) em inoculantes com diferen-
tes concentrações de grafite, no perío-
do de 5 a 180 dias após a produção.....43
- Figura 3. Sobrevivência da estirpe SMS-400 de *Bra-*
dyrhizobium sp. para amendoim (*Arachis*
hypogaea L.) em inoculantes com diferen-
tes concentrações de grafite, no perío-
do de 5 a 180 dias após a produção.....44

SOBREVIVÊNCIA DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. PARA AMENDOIM (*Arachis hypogaea* L.) EM INOCULANTES PREPARADOS COM SUBSTRATO TURFOSO ENRIQUECIDO COM CARBONO

Autora: ANA HELENA BERGAMIN MAROZZI FERNANDES

Orientador: Dr. ELI SIDNEY LOPES

RESUMO

Inoculantes para amendoim (*Arachis hypogaea* L.) foram produzidos com substrato turfoso, enriquecido com grafite, em quatro tratamentos: 1) sem grafite; 2) 25% de grafite; 3) 50% de grafite e 4) somente grafite. Três estirpes de *Bradyrhizobium* sp. (SMS-319, SMS-400 e SMS-561) foram inoculadas separadamente, com 3 repetições. Os inoculantes produzidos foram conservados em temperatura ambiente e em geladeira. Amostras foram tomadas aos 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias após a mistura do caldo ao substrato, avaliando-se a sobrevivência das estirpes, através da determinação do número de rizóbios pelo método de diluição e contagem em placas. Aos 300 dias após a produção, instalou-se um ensaio, em vasos de Leonard com solução nutritiva isenta de nitrogênio, para avaliação da eficiência dos rizóbios dos inoculantes armazenados,

incluindo-se tratamentos de inoculação com caldo de cultura pura das mesmas estirpes. As quantidades de inoculantes foram padronizadas para fornecer 10^6 bactérias/vaso.

A sobrevivência das estirpes foi excelente nos inoculantes produzidos sem grafite e nos com adição de 25% de grafite. Os demais tratamentos prejudicaram a sobrevivência das bactérias, sobretudo quando se tinha exclusivamente grafite como substrato. A nodulação e fixação de nitrogênio também foram negativamente afetadas nos inoculantes com 100% de grafite. A conservação em geladeira favoreceu a sobrevivência das três estirpes, porém não interferiu com a nodulação e fixação do nitrogênio.

SURVIVAL OF PEANUT (*Arachis hypogaea* L.)
Bradyrhizobium sp. STRAINS IN PEAT-BASED
INOCULANTS ENRICHED WITH CARBON

Author: ANA HELENA BERGAMIN MAROZZI FERNANDES

Adviser: ELI SIDNEY LOPES

SUMMARY

Substrate for the inoculants was prepared with four levels of graphite additions to peat : 1) no graphite; 2) 25% graphite; 3) 50% graphite and 4) graphite only. Three strains were tested in each treatment. The prepared inoculants were stored in refrigerator and under laboratory conditions. Samples were taken at 5, 15, 30, 60, 90, 120 and 180 days after mixing broth with carrier. Surviving population was determined by the plate count method. Three hundred days after storage an experiment was carried out with N-free nutrient solution in Leonard's jar to evaluate the effectiveness of the rhizobia in the stored inoculants. Treatments with pure strain broth inoculation were included. The amount of each inoculant used was controlled in order to provide 10^6 bacteria/jar.

Survival of any of the three strains was excellent in the inoculants prepared without graphite addition and with 25% graphite. A negative effect on survival was mainly observed when the substrate was exclusively composed of graphite. Nodulation and nitrogen fixation were also negatively affected in the inoculants with 100% graphite. Storage under refrigerated conditions (4°C) favoured survival of the three strains but did not interfere with their ability to nodulate or the efficiency of N_2 fixation.

1.INTRODUÇÃO

A fixação de nitrogênio por leguminosas é essencial para o incremento de alimentos com alto teor proteico, tanto em sistemas agrícolas de produção de grãos como em pastagens. O estabelecimento de uma nodulação eficiente não pode ser deixado ao acaso, exigindo na maioria das vezes a introdução, no solo, de estirpes de *Rhizobium* mais eficientes, através da inoculação. O êxito dessa prática dependerá muito da qualidade do inoculante empregado, o qual deve ser produzido de maneira a promover a melhor sobrevivência possível dessas estirpes, inclusive após a aplicação dos mesmos à semente.

Diversos fatores podem interferir na sobrevivência da bactéria no inoculante: umidade, temperatura, embalagem e tempo de armazenamento; aeração, composição e quantidade do caldo misturado; qualidade do substrato, entre outros. Dentre estes, a qualidade do substrato (ou veículo) é de fundamental importância para o sucesso econômico da empresa que produz o inoculante. Tradicionalmente, o substrato utilizado é a turfa. No Brasil, porém, devido às condições pedogenéticas, não há ocorrência de turfeiras propriamente ditas. Em substituição à turfa têm-se usado solos com alto teor de carbono. As

características físico-químicas desses solos indicam elevada acidez e alta capacidade de retenção de umidade.

Com a finalidade de melhorar as características do substrato, e conseqüentemente a qualidade dos inoculantes, algumas firmas têm recorrido à adição de carvão moído (LOPES, comunicação pessoal). SPARROW & HAM (1983) observaram boa sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em substratos à base de carvão proveniente de madeira dura. Outros autores têm testado substratos alternativos à turfa, uma vez que esta pode não ser acessível em muitas regiões. PACZKOWSKI & BERRYHILL (1979) testaram 4 tipos de carvão mineral de diferentes fontes de origem e somente 2 deles se mostraram inadequados à sobrevivência da bactéria, provavelmente devido à elevada acidez (nível de pH entre 4,8 e 5,0).

O presente trabalho teve por objetivo verificar se a adição de material carbonáceo a inoculantes turfosos pode promover alterações benéficas em termos de sobrevivência das estirpes de *Bradyrhizobium* atualmente recomendadas para a cultura do amendoim (*Arachis hypogaea* L.).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a antigüidade, é sabido que restos de leguminosas "adubam" o solo: gregos e romanos já as empregavam como adubo verde. Os benefícios, porém, eram verificados empiricamente. Embora não se saiba com exatidão quem constatou pela primeira vez a presença de nódulos nas raízes de plantas leguminosas, gravuras de 1542 evidenciam que já nesse século se tinha conhecimento do fenômeno (FRED et alli, 1932). Esse fato, entretanto, era considerado como uma deformação radicular, ou como consequência de ataque de nematóides (Malpighi, 1795, citado por FRED et alli, 1932).

No final do século passado, Beijerinck conseguiu identificar os nódulos como produto da associação entre a bactéria e a planta, isolando a bactéria em cultura pura, a qual denominou *Bacillus radicola*. Mais tarde, Frank renomeou-a de *Rhizobium leguminosarum* (STEWART, 1966).

Essa associação é do tipo simbiótica mutualística, onde o macrossimbionte (a planta) e o microssimbionte (a bactéria) obtém benefícios. A bactéria fixa o nitrogênio atmosférico (N_2), fornecendo-o à planta, a qual, por sua vez, supre as necessidades da mesma em minerais e substâncias energéticas essenciais. Uma certa

especificidade hospedeira é verificada entre a planta e a bactéria (ALEXANDER, 1965) e grupos funcionais de inoculação cruzada foram determinados (VIDOR et ali, 1983). Esse sistema de classificação têm sido muito discutido e criticado por não ser taxonômico, embora seja o mais prático sistema usado normalmente (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985). Um novo sistema foi proposto, no qual a bactéria que nodula o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e outras leguminosas tropicais continua sem classificação, mas agrupadas como *Bradyrhizobium* spp., antes chamado *Rhizobium* spp. do grupo caupi (JORDAN, 1987).

A maioria das leguminosas cultivadas nodula e consegue obter boa parte do nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento através da fixação. Para o amendoim, MOAWAD et ali (1986) observaram uma fixação de até 186 kg de N/ha com o uso de inoculante turfoso, em solos arenosos do Egito. Esses autores citam dados de outros estudos onde se constatou uma fixação de 240 kg de N/ha, o que representou 80% do nitrogênio necessário à cultura. A principal vantagem da fixação do nitrogênio é a economia de adubo nitrogenado que deveria ser aplicado ao solo a fim de se fornecer à planta o nitrogênio requerido. O amendoim extrai grandes quantidades de nitrogênio do solo. Para produção de 1800kg de vagens/ha é necessário aplicar-se 70kg de N (GIARDINI, 1980).

Para que a fixação biológica seja explorada em seu máximo potencial é preciso que se estabeleça nas raízes das plantas leguminosas uma boa nodulação, induzida

por estirpes eficientes em fixar nitrogênio. Essa nodulação pode ser natural, quando a população existente no solo é suficientemente grande para permitir tal fenômeno. Quando isto não ocorre, ou quando as estirpes do solo não são eficientes, torna-se necessário recorrer a métodos artificiais de introdução de estirpes selecionadas (LOPES et alli, 1976). A prática da inoculação é bastante divulgada e adotada para a maior parte das leguminosas de interesse econômico (VIDOR et alli, 1983).

Segundo FRED et alli (1932), as primeiras formas de inoculação de sementes de leguminosas consistiam em métodos de transferência de solos, isto é, tratamento de uma área cultivada com grande quantidade de solo, acima de 4 ton/ha, retiradas das redondezas das raízes de uma boa cultura da leguminosa, ou pequenas quantidades aplicadas às sementes na forma de pasta. O uso de cultura pura para inoculação data do final do século passado, no início em forma de suspensão em água e aplicação direta nas sementes, e depois em outros suportes sólidos - solo esterilizado, gelatina, ágar, turfa (ROUGHLEY, 1970).

Vários tipos de inoculantes são citados: líquidos, agarizados, liofilizados, granulares e em pó (WILLIAMS, 1984).

Os inoculantes líquidos somente são usados em laboratórios e casas de vegetação, ou no preparo comercial de inoculantes (WILLIAMS, 1984). Já os inoculantes agarizados, além dos altos custos de produção, são difíceis de serem aplicados às sementes e

ocasionam alta mortalidade da bactéria em períodos de seca (VINCENT et alli, 1962). Para regiões tropicais e subtropicais culturas liofilizadas parecem ser indicadas pela maior proteção proporcionada contra ressecamento, de preferência utilizando-se óleo vegetal para suspensão das células e aplicação às sementes (KREMER & PETERSON, 1983). O processo de liofilização, entretanto, exige equipamentos especiais e técnicos com muita prática, o que encarece o custo de produção (WILLIAMS, 1984). Inoculantes granulares têm sido indicados para casos especiais quando os métodos tradicionais de inoculação parecem ser desfavoráveis - sementes tratadas, sementes muito pequenas, necessidade de altas dosagens. A sua principal vantagem é a aplicação direta no sulco do plantio, o que pode ser feito pelos mesmos equipamentos de semeadura ou de aplicação de defensivos (BARKSDALE, 1977; BEZDICEK et alli, 1978; WILLIAMS, 1984). Vários autores tem obtido resultados favoráveis em estudos sobre o uso desse tipo de inoculante (GAULT, 1981; KOLING et alli, 1984).

Os inoculantes preparados em substratos sólidos são os mais aceitos e difundidos (ROUGHLEY, 1970), devido às facilidades de produção, armazenamento e manuseio dos mesmos (MALLORCA, 1984). A turfa tem sido o material mais utilizado como suporte para esse tipo de inoculante, porque oferece alta proteção à bactéria contra ressecamento, tanto no armazenamento como nas sementes (PUGASHETTI et alli, 1971), e favorece a multiplicação e sobrevivência do *Rhizobium* após a mistura do caldo

(ROUGHLEY, 1970), devido às suas características físico-químicas.

Três fases são destacadas na produção de inoculantes (ROUGHLEY, 1970; DATE & ROUGHLEY, 1977; ROUGLEY & PULSFORD, 1982): a) preparo do substrato; b) preparo e mistura do caldo nutritivo e c) controle de qualidade.

O preparo do substrato turfoso inicia-se com a coleta da turfa do local de origem. Após isso ela é posta a secar ao ar, no campo, para drenagem do excesso de água e retirada de materiais de tamanho maior (DATE, 1977). Então ela será seca em estufa de ar forçado até atingir cerca de 5% de umidade. A temperatura de secagem não pode exceder os 100 graus Celsius, pois acima disto ocorre degradação tóxica (ROUGHLEY, 1970). Uma vez seca, a turfa será moída de tal modo a ficar constituída por partículas que passem em peneira de 200 "mesh". Essas partículas aderem bem à semente e não ocasionam "embaralhamento" quando umidecidas (ROUGHLEY, 1976). Nesse ponto, deve-se verificar a acidez do material, pois níveis de pH abaixo de 6,5 são prejudiciais ao desenvolvimento do *Rhizobium*. Caso haja necessidade de neutralização, deve-se usar um material que não vá interferir com a sobrevivência da bactéria, tal como o CaCO_3 (MALLORCA, 1984).

Diversos autores têm verificado que a esterilização da turfa promove uma melhor sobrevivência da bactéria. A escolha do método de esterilização deve levar em conta possíveis efeitos no que se refere a mudanças de características físico-químicas da turfa, ocasionando algum

prejuízo ao *Rhizobium* (STRIJDOM & DESCHODT, 1976). A aplicação de óxidos de etileno ou brometo de metila resulta em problemas de toxidez para a bactéria, uma vez que esses produtos têm grande penetração e são persistentes na turfa (DATE, 1977). Esterilização por vapor fluente ou autoclavagem são maneiras práticas, porém, STRIJDOM & DESCHODT (1976) chamam a atenção para possíveis efeitos negativos do calor sobre a turfa (desbalanço nutricional, liberação de produtos tóxicos, etc.). LOPES et alli (1980) verificaram melhor sobrevivência de *Rhizobium japonicum* em turfa irradiada do que em turfa não estéril ou autoclavada. PARKER & VINCENT (1981) observaram que, devido à natureza orgânica da turfa, a esterilização por radiação gama não é completa. Nas dosagens utilizadas rotineiramente na Austrália (5 Mrad) sobrevivem *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Mixobactérias* e *Amoeba*, que são resistentes à radiação, mas que têm pouca ou nenhuma interferência com a sobrevivência do *Rhizobium*. Esses autores consideram que não se justifica, portanto, aumento na dosagem, o que pode acarretar problemas de toxidez na turfa e difícil constatação de contaminações ulteriores em produções comerciais. STRIJDOM & van RENSBURG (1981) também não consideram indispensável a esterilização total da turfa e alertam para os efeitos do calor sobre a turfa. Verificaram eles igual sobrevivência do *Rhizobium* em turfas irradiadas na dose de 5 Mrad e vapor fluente (124 °C por 3 h e meia).

Nem sempre a turfa é prontamente disponível (KANDASAMI & PRASAD, 1971; HALLIDAY & GRAHAM, 1978;

PACZKOWSKI & BERRYHILL, 1979) e nestes casos outros materiais têm sido avaliados para uso como substrato de inoculantes. Outras vezes, apesar da turfa estar disponível, ela não é de boa qualidade para esse fim. Neste caso, vários autores têm sugerido a adição de certos materiais a fim de melhorar as características da turfa. Gunny & Jordan (1954, citados por MALLORCA, 1984) investigaram a possibilidade de se adicionar carvão à turfa, obtendo resultados favoráveis dependendo do tempo e da temperatura de armazenamento dos inoculantes. LUGO et alli (1984) testaram adição de restos orgânicos à turfa e obtiveram resultados satisfatórios até mistura de 50% de cada. AARONS & AHMAD (1986) não conseguiram aumento da sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em turfas da Jamaica enriquecidas com 1% de sacarose (peso/volume).

Quando se trata de avaliar outros materiais para uso como suporte de inoculantes em substituição à turfa algumas características precisam ser consideradas em relação à natureza do mesmo (MALLORCA, 1984; WILLIAMS, 1984): a) deve ter alta capacidade de reter água; b) deve ser disponível em quantidade suficiente no local e a baixo custo; c) deve ser de fácil processamento; d) deve não conter elementos ou substâncias tóxicas; e) deve servir como meio nutritivo para crescimento da bactéria; f) deve favorecer e sustentar a sobrevivência de *Rhizobium* durante o armazenamento e distribuição dos inoculantes, bem como nas sementes inoculadas.

PUGASHETTI et alli (1971) testaram celulose

em pó e obtiveram bons resultados comparados aos obtidos com a turfa. Porém, não se tem informação a respeito do uso comercial desse tipo de inoculante. Resíduos industriais orgânicos têm despertado o interesse de muitos pesquisadores como possíveis substitutos da turfa. RIZK et alli (1975) observaram a formação de compostos fenólicos em concentrações desfavoráveis ao crescimento do *Rhizobium*, durante o processamento de farelo de trigo para produção de inoculantes. MORETTI & SAITO (1978) não conseguiram bom desempenho da torta de filtro - resíduo da indústria açucareira - em termos de sobrevivência das estirpes de *Rhizobium phaseoli* empregadas. Outros autores conseguiram, entretanto, sobrevivência de *Rhizobium japonicum* nesse material. WILLIAMS & MALLORCA (1980) testaram o uso de torta de filtro autoclavada (121 °C por 3 h) e não esterilizada em comparação a uma turfa australiana. Verificaram que houve aumento na população, com boa sobrevivência, até 150 dias após a produção, tanto para a turfa como para a torta de filtro autoclavada. Porém, quando esta foi usada sem esterilização apresentou acentuada queda de crescimento da bactéria. O nível de pH subiu a níveis críticos (cerca de 9,1 após 3 dias) devido à presença de contaminantes, o que os autores consideraram a causa provável do insucesso. STEIN et alli (1980) verificaram pelo uso de torta de filtro autoclavada (121 °C por 3 h) e irradiada com raios Gama (dose de 5 Mrads, pelo menos 1 mês antes do uso) que o método de esterilização não interfere na sobrevivência do *Rhizobium* nos inoculantes

assim produzidos. Concluem eles que a torta de filtro pode ser um substituto da turfa como substrato para inoculantes em regiões onde existe esse produto em abundância, desde que seja esterilizada. PHILIP & JAHURI (1983) atenta para o fato de que o uso de torta de filtro resolve o problema também do seu acúmulo nas indústrias açucareiras. Consideram eles que esse material deve ser bom para sustentar altas taxas populacionais da bactéria, devido à sua alta capacidade de reter água e conteúdo de matéria orgânica suficiente para o crescimento da bactéria por longo período pela lenta liberação de nutrientes. Efeitos repressivos ao crescimento de possível conteúdo de metais pesados ou não, oriundos do processo de produção de açúcar podem ser minimizados com adição de carvão, que é um bom absorvente dessas substâncias estranhas. Os autores obtiveram bons resultados dessa maneira (torta de filtro + carvão) em inoculantes contendo *Rhizobium* e *Azotobacter*. GRAHAM (1989) verificou que bagaço de cana, outro resíduo da indústria canavieira, não é viável para uso como substrato de inoculantes. RAMIREZ et alli (1983) testaram a viabilidade de uso de lírio aquático (*Eichornia crassipes*), "in natura" e na forma de composto, verificando que "in natura" pode ser uma boa alternativa, porém compostado não.

Outro material que tem merecido destaque como substituto da turfa, sobretudo em locais onde se encontram disponíveis em grande quantidade, é o carvão. DESCHODT & STRIJDOM (1976) avaliaram a sobrevivência de uma estirpe de *Rhizobium meliloti* e uma de *Rhizobium* tipo *caupi*

em mistura de carvão vegetal, carvão mineral (bentonita), grãos de alfafa e sacarose (proporção de 2:2:1 e 1% de sacarose em peso) com 50% de umidade, obtendo bons resultados em relação à turfa sul-africana comumente usada naquela região. HALLIDAY & GRAHAM (1978) verificaram que certos carvões não são favoráveis à sobrevivência de *Rhizobium*, sobretudo após inoculação de sementes porque resistem ao umedecimento. PACZKOWSKI & BERRYHILL (1979) avaliaram o potencial para uso como inoculante de *R. phaseoli* de carvão mineral (bentonita, antracita e betuminoso) de diferentes origens. Dentre os 8 testados somente dois não se prestaram ao uso devido à acidez elevada (pH menor que 5,0). BHATNAGAR et alii (1982) consideram o carvão muito promissor para uso como substrato de inoculantes, sobretudo devido à sua capacidade de absorver compostos tóxicos e promover a sua melhor aeração do meio, o que irá conduzir a melhor sobrevivência da bactéria. Esses autores testaram a adição de 0,5% de K_2HPO_4 em peso ao carvão e bentonita. Em ambos os casos houve uma melhor sobrevivência de *R. japonicum* por longo tempo, provavelmente por ter aumentado a disponibilidade de fósforo à nutrição da bactéria e mantido alta a umidade, devido à presença de bentonita. CRAWFORD & BERRYHILL (1983) observaram que inoculantes de *Rhizobium phaseoli* à base de carvão podem ser boa alternativa, mas somente quando a turfa for realmente inviável de ser usada, pois a proteção desta contra ressecamento da bactéria, após inoculação da sementes, é muito melhor.

Solos minerais tem sido empregados como substrato para inoculantes desde há muito tempo. CHAO & ALEXANDER (1984) avaliaram a possibilidade do uso de solos minerais como inoculantes de *Rhizobium*, concluindo que, desde que a sobrevivência da bactéria em sementes inoculadas com solo mineral foi boa e solos minerais são mais prontamente acessíveis e baratos do que a turfa, alguns deles devem ser avaliados quanto a praticidade do uso como inoculante. Os autores chamam atenção para alguns detalhes, como minimização de efeitos deletérios devido à secagem rápida pode ser conseguida com o uso de solos mais argilosos e condução da seleção de estirpes para resistência ao ressecamento.

Meios estritamente minerais também podem servir de substrato para inoculantes. GRAHAM-WEISS et alli (1987) estudaram vermiculita (silicato de Mg, Fe e Al) não sómente como substrato, mas também como meio suporte para fermentação direta das culturas bacterianas. Para isso, vermiculita foi moída (45/80 mesh) e autoclavada com 1,5 ml de meio de cultura por grama. O tamanho das partículas proporcionou alta retenção de umidade no material e boa aderência à semente; a sobrevivência da bactéria no material também foi satisfatória e o tempo de fermentação foi semelhante àquele gasto quando do uso de "shakers". Após 7 dias, houve diminuição da população na semente, e os autores atribuíram isso a 3 fatores: ressecamento, desagregação do inoculante da semente e liberação de substâncias tóxicas pelas sementes.

Embora sempre se procurem alternativas para turfa como substrato no uso de materiais naturais, que são mais baratos, alguns autores sugerem o uso de veículos sintéticos. DOMMERGUES et alli (1979) e JUNG et alli (1982) desenvolveram veículos sintéticos baseados em gel-polimerizado (poliacrilamida, xantan e alginato), sugerindo que salvo os custos de produção, tais materiais poderiam ser preferíveis à turfa pois apresentam maior grau de estabilidade em suas características e garantem melhor sobrevivência em períodos bem mais longos de armazenamento. SPARROW & HAM (1983) encontraram, no entanto, problemas de contaminação bacteriana quando do uso desses veículos sintéticos como inoculantes.

A fase seguinte da produção de inoculantes -preparo do caldo nutritivo- pressupõe que as estirpes de *Rhizobium* que serão empregadas tenham sido selecionadas previamente, segundo critérios baseados em: a) capacidade infectiva ou infectividade; b) habilidade de formar nódulos, fixando quantidades apreciáveis de nitrogênio (ROUGHLEY, 1970; ROUGHLEY & PULSFORD, 1982); c) capacidade de sobreviver no substrato por longo tempo (ROUGHLEY, 1970); e d) capacidade de tolerar, sem perder suas características, condições adversas no solo, tais como: ressecamento (CHAO & ALEXANDER, 1984); acidez elevada e altos teores de Al e Mn trocáveis (ANDREW, 1977), sobretudo para regiões tropicais.

Uma vez selecionadas, essas estirpes devem ser mantidas de forma a preservar suas características,

evitando o aparecimento de mutantes (VINCENT, 1970).

O meio de cultivo mais utilizado é o YMB (caldo de manitol, extrato de levedura e sais) recomendado por VINCENT (1970). LOPRETO et alli (1972) verificaram que estirpes de *R. japonicum* de crescimento lento tiveram sua velocidade de crescimento aumentada quando se substitui o manitol por glicerol como fonte de carbono.

A multiplicação das culturas de *Rhizobium* pode ser feita em pequena escala, utilizando-se frascos erlenmeyer com tampão de algodão, mantidos sob agitação a 28 °C (WILLIAMS, 1984). Em escala comercial, equipamentos de fermentação são necessários. Fermentadores com 1000 a 9000 litros de capacidade são usados de acordo com a capacidade da indústria. *Rhizobium* é uma bactéria microaerofílica e, portanto, a exigência de oxigênio é satisfeita na velocidade mínima necessária para evitar sedimentação das células no fundo do frasco (SOMASEGARAN e HALLIDAY, 1982), quando se empregam dispositivos de agitação/aeração.

Geralmente é recomendado que o caldo contenha cerca de 10^9 células/ml no momento da mistura (ROUGHLEY, 1970; DATE e ROUGLEY, 1977). Porém, em estudos mais recentes, SOMASEGARAN e HALLIDAY (1982) verificaram ser possível produzir inoculantes com caldo diluído e subsequente crescimento do *Rhizobium* na turfa. O processo prevê a obtenção de caldo com crescimento máximo de células da estirpe desejada (ao redor de 10^9 células/ml) para depois diluir esse caldo em água estéril até se ter cerca de 10^4 células/ml. O caldo diluído é então misturado ao

substrato esterilizado que, após o período de cura, apresentará população de 10^9 células/g do substrato. Segundo os autores a turfa por si só é capaz de promover o crescimento do *Rhizobium*, fornecendo os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Esse método tem a vantagem de baratear os custos de produção em dois aspectos pelo menos: suprime a necessidade de aparelhos fermentadores de grande capacidade, geralmente muito caros; e permite satisfazer exigências nutricionais específicas de certas estirpes que preferem outros açúcares como fonte de carbono (arabinose, galactose, etc.) muito caros para uso em larga escala (SOMASEGARAN, 1985).

O processo de mistura do caldo produzido com o substrato vai depender das condições de esterilidade do mesmo. Substratos esterilizados por radiação gama geralmente são embalados previamente, e assim, o caldo deverá ser misturado assépticamente por meio de "injeção" (PARKER & VINCENT, 1981). Para o caso de substratos autoclavados ou não esterilizados a mistura costuma ser feita em bandejas. Possíveis contaminações dos substratos autoclavados por microrganismos aéreos nesse sistema parece não representar grande problema, uma vez que estes não são propriamente competidores do *Rhizobium* nem irão interferir muito quando da contagem em placas para controle de qualidade do inoculante (SOMASEGARAN, 1985).

ROUGHLEY (1970) e DATE & ROUGHLEY (1972) recomendam que, para as turfas australianas, a quantidade de caldo a ser misturada deve ser tal que permita umidade

final no produto em torno de 40-50 % . Porém, essa quantidade pode variar de acordo com a capacidade de retenção de água do substrato empregado.

A última fase da produção de inoculantes refere-se ao controle de qualidade, que consiste na avaliação da sobrevivência do *Rhizobium* no mesmo, ao sair da fábrica e no momento de ser utilizado. Para inoculantes preparados com substrato esterilizado, pode-se efetuar contagem direta em placas do número de células viáveis/g de inoculante úmido ou contagem indireta pelo Método do Número Mais Provável, através de diluição e infecção em plantas (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN & HOBEN, 1985). Esse último método serve principalmente para o caso de inoculantes produzidos com substrato não esterilizado (LOPES, 1975). A legislação vigente no Brasil estabelece que o número de células bacterianas/g de inoculante na saída da fábrica deve ser de no mínimo 10^8 células, e que no momento do uso, o inoculante deve conter 10^7 bactérias/g ou mais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1977)

Após serem produzidos e antes de serem utilizados, os inoculantes podem ficar armazenados. As condições de armazenamento determinarão, em grande parte, a qualidade e a longevidade dos mesmos. Diversos fatores podem interferir nessa fase: período de cura, temperatura, trocas gasosas, condições de esterilidade do substrato, etc. Dentre todos, as condições de esterilidade do substrato têm papel destacado, pois, além dos processos competitivos e de antibiose que podem ocorrer em substratos

não esterilizados, interferindo com a sobrevivência do *Rhizobium*, parece evidente que em substratos não esterilizados os outros fatores causam efeitos negativos mais drásticos (FREIRE & JONES, 1963; ROUGHLEY, 1970).

Alguns autores têm salientado a importância do período de cura ou maturação do inoculante. BOIARDI et alli (1983) verificaram que inoculantes de *Rhizobium phaseoli* levados à geladeira logo após a mistura do caldo ao substrato apresentaram menor taxa de sobrevivência da bactéria do que aqueles deixados à temperatura ambiente. MATERON e WEAVER (1985) observaram que a população sobrevivente de *R. trifolii* na semente foi 10 vezes maior quando os inoculantes a base de turfa, carvão e vermiculita foram "curados" (armazenados) por 4 dias após a produção.

Em regiões tropicais e subtropicais, o principal problema para obtenção de inoculantes de alta qualidade é a temperatura de armazenamento (KREMER & PETERSON, 1983). O efeito da temperatura está mais relacionado com a perda de umidade dos mesmos e consequente morte das células por ressecamento (ROUGHLEY, 1970). CHAO & ALEXANDER (1984) consideram que a resistência das estirpes ao ressecamento é menor do que às altas temperaturas. FREIRE & JONES (1963) relacionaram a temperatura de armazenamento às condições de esterilidade do substrato e ao tipo de embalagem que permita boa troca gasosa sem grande perda de umidade. BOIARDI et alli (1983) verificaram que, em função do tempo, não se observou maior viabilidade dos inoculantes mantido em geladeira do que aqueles

armazendos em temperatura ambiente para a estirpe de *R. phaseoli* estudada. SOMASEGAGARAN (1985) considera que a temperatura do armazenamento depende muito da estirpe empregada: estirpes de crescimento rápido sobrevivem maior tempo se armazenadas em geladeira (4°C) após período de cura; já para as estirpes de crescimento lento temperaturas de 26°C podem ser mais favoráveis. Com a finalidade de minimizar os efeitos prejudiciais das temperaturas de armazenamento de inoculantes em regiões quentes PHILIP & JAUHRI (1983) sugerem um incubador subterrâneo capaz de manter temperaturas até 10°C abaixo da temperatura do ar nos dias mais quentes e 1°C nos dias mais frios. Recomendam eles esse sistema sobretudo para regiões onde o uso de geladeiras é impossível por falta de energia elétrica.

Com base em todas essas considerações, compreende-se a necessidade de se desenvolver tecnologias adequadas para produzir e utilizar inoculantes de alta qualidade, que permitam maximizar as respostas e incrementar a produtividade das leguminosas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho constou do estudo de sobrevivência de 3 estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (grupo caupi) em inoculantes preparados com solo turfoso enriquecido com grafite em diferentes concentrações, e a posterior avaliação de eficiência de fixação dessas estirpes em amendoim cultivado em vasos de Leonard com solução nutritiva sem Nitrogênio.

3.1. Produção de inoculantes

A produção dos inoculantes constituiu a primeira parte do trabalho e compreendeu as seguintes fases:

3.1.1. Preparo do substrato

O substrato básico utilizado nos inoculantes foi solo turfoso, fornecido pela Biosoja, indústria produtora de inoculantes, localizada no município de São Joaquim da Barra, S.P.. Segundo informações obtidas junto a essa firma, o solo turfoso foi coletado na região, tendo sido exposto ao ar, no campo, para drenagem do excesso de água e retirada do material mais grosseiro. Posteriormente, o solo foi seco em estufa a 65 °C até atingir cerca de 5% de umidade, e moído até a granulometria que passasse pela peneira de 200 mesh. Esse substrato

foi recebido pronto para a execução do trabalho.

Uma amostra desse material foi enviada para avaliação química, realizada segundo metodologia de rotina da Seção de Fertilidade de Solo e Nutrição de Plantas, do Instituto Agronômico de Campinas (van RAIJ & QUAGGIO, 1983).

Foi realizada a medida de acidez do material pela leitura em potenciômetro. A correção da acidez (valor de pH original 4,5) foi feita com adição de calcário dolomítico(2,5% em peso), o que possibilitou obter um valor de pH na faixa de 6,8 , adequado para o caso (ROUGHLEY, 1970).

O material carbonáceo empregado foi grafite FA-2, fornecido por Peres Moura Ltda., que se apresenta como um material inerte, com alto teor de carbono e granulometria fina, de acordo com o interesse do trabalho. Essas características, além de outras mais, foram fornecidas pela referida firma e encontram-se expressas na tabela 1.

O grafite foi adicionado ao substrato como tratamento experimental. As concentrações adicionadas seguiram o esquema abaixo (tratamentos efetuados):

- 1 - 100% de solo turfoso (controle sem grafite)
- 2 - 75% de solo turfoso + 25% de grafite (em peso)

Tabela 1. Características do Grafite FA-2 empregado no trabalho, obtidas a partir de especificações fornecidas por Peres Moura Ltda.

Componentes	Teor (%)
Carbono	68 - 72
Cinzas, max.	28
Matéria Volátil, max.	3,7
Umidade, max.	0,3
Granulometria , max. retido na malha 140 ASTM	5,0

3 - 50% de solo turfoso + 50% de grafite
(em peso)

4 - 100% de grafite

Uma vez preparados os substratos foram acondicionados em saquinhos de polietileno preto, em quantidade de 160g. Os saquinhos foram selados e esterilizados por radiação gama, na dosagem de 2,5 Mrads (LOPES et alli, 1980).

3.1.2. Estirpes empregadas

Foram utilizadas 3 estirpes de *Bradyrhizobium* spp., provenientes de Coleção de Estirpes de *Rhizobium* spp. do Instituto Agronômico de Campinas, S.P.. Essas estirpes nodulam eficientemente o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), sendo recomendadas para a cultura (GIARDINI, 1980). A identificação e origem de cada estirpe é a seguinte:

SMS-319 - isolada em 06/05/71 de nódulos de *Macroptilum atropurpureum*, cultivado em solo do município de Piracicaba, S.P..

SMS-400 - isolada de *Arachis hypogaea* (L), introduzida do Zimbabwe, recebida em 14/05/1979, cujo código original de identificação é 411/MAR.

SMS-561 - isolada de *Arachis hypogaea* (L), introduzida dos EUA, recebida de North Caroline State University, em 11/11/1983, cujo código original de identificação é NC-92.

Antes de serem usadas as estirpes foram testadas quanto à pureza, em meio sólido, e depois

multiplicadas em meio líquido.

3.1.3. Produção do caldo de cultivo

Foi utilizado como caldo de cultivo um meio líquido composto de extrato de leveduras e sais, tendo glicerol como fonte de Carbono (LOPRETO et alli, 1972). Após preparo foi colocado em fermentadores de 10 l de capacidade, sendo o conjunto autoclavado por 30 min. a 121 °C. Esses fermentadores eram providos de dispositivo de aeração, propiciando contato das células bacterianas com o caldo, evitando também a deposição no fundo do fermentador (SOMASEGARAN & HALLIDAY, 1982).

No momento da mistura do caldo ao substrato, o caldo encontrava-se bastante denso.

3.1.4. Mistura do caldo ao substrato

O caldo foi injetado assepticamente nos saquinhos por meio de seringa automática previamente esterilizada. O orifício de entrada da agulha foi vedado com fita adesiva.

Foram colocados 53 ml de caldo em cada saquinho de 160g, quantidade essa estabelecida com base na capacidade máxima de retenção de água do substrato, determinada em laboratório. Esta, por sua vez, foi obtida com base na capacidade de campo determinada para o mesmo.

Tal quantidade de caldo forneceu uma umidade final ao inoculante de 35%. A determinação desse índice foi feita tomando-se uma amostra de peso conhecido do inoculante pronto, e secando-a a 100 °C até peso constante. A diferença de peso forneceu a umidade do

material.

Após a mistura os saquinhos foram bem homogeneizados para garantir melhor distribuição do caldo no substrato.

Cada um dos substratos produzidos (item 3.1.1) foi inoculado com cada uma das estirpes separadamente, com 3 repetições. Foram produzidos 2 lotes de inoculantes para cada tratamento de enriquecimento de substrato e estirpe, sendo que um foi conservado em temperatura ambiente do laboratório e o outro sob refrigeração, 5 dias após a produção (período de cura ou maturação).

3.1.5. Avaliação da sobrevivência

A avaliação da sobrevivência foi efetuada pela determinação do número de *Bradyrhizobium* nos inoculantes, em amostras tomadas aos 5, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 dias após a produção para o lote conservado em temperatura ambiente, e aos 180 dias para o lote mantido sob refrigeração.

O número de *Bradyrhizobium* no inoculante foi calculado através de contagem direta do número de colônias formadas a partir do plaqueamento de gota calibrada de diluições sucessivas (fator 10) da amostra, conforme método de Miles & Misra (1932, citado por VINCENT, 1970).

A população inicial considerada foi aquela observada aos 5 dias após a mistura do caldo, isto é, após o período de cura. A importância desse período de cura (ou

de maturação) dos inoculantes tem sido salientado por vários autores (FREIRE & JONES, 1963; BOIARDI et alli, 1983; SOMASEGARAN, 1985).

Para a avaliação da sobrevivência calculou-se a taxa de mortalidade no período amostrado de 175 dias (dos 5 aos 180 dias), segundo a fórmula utilizada por FREIRE & JONES (1963):

$$K = 1/t \cdot \log B/b ,$$

onde K = taxa de mortalidade

t = tempo (semanas)

B = população inicial

b = população final

Para o cálculo das taxas de mortalidade foram utilizadas médias das três repetições.

3.2. Teste de eficiência dos inoculantes

Depois dos inoculantes terem sido preservados em geladeira ou a temperatura ambiente por 300 dias a partir da produção, instalou-se um ensaio em casa de vegetação a fim de verificar efeitos do grafite sobre a eficiência das estirpes.

3.2.1. Preparo dos vasos

Para o ensaio foram utilizados vasos de Leonard, com areia de rio lavada e solução nutritiva de Norris (1964) isenta de Nitrogênio (VINCENT , 1970). Depois de montados, os vasos foram autoclavados por 1 h a 121 °C e então levados à casa de vegetação.

3.2.2. Plantio

Sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L),

cultivar Tatu, foram selecionadas e esterilizadas com solução a 10% de Hipoclorito de Sódio por 5 min, sendo em seguida lavada diversas vezes em água estéril para remover os resíduos da solução. Foram então colocadas para germinar em placas de Petri esterilizadas, providas de papel filtro, o qual foi umedecido com água estéril.

As placas foram incubadas no escuro a 28 °C. Duas sementes pré-germinadas foram assepticamente transferidas para os vasos. Após 5 dias realizou-se o desbaste para 1 planta.

3.2.3. Tratamentos experimentais

Foram realizados os seguintes tratamentos para cada estirpe, com 5 repetições:

- 1° - sem inoculação (controle)
- 2° - inoculação com cultura pura
- 3° - inoculante sem grafite
- 4° - inoculante com 25% de grafite
- 5° - inoculante com 50% de grafite
- 6° - inoculante com 100% de grafite

Os tratamentos 3, 4, 5 e 6 foram aplicados para os dois lotes de inoculantes. O tratamento 2° consistiu na inoculação de um caldo de cultura líquida com denso crescimento das 3 estirpes de *Bradyrhizobium* sp. utilizadas no preparo dos inoculantes testados. No tratamento controle nada foi adicionado.

O delineamento estatístico adotado foi blocos casualizados.

3.2.4. Inoculação dos vasos

Para viabilizar a padronização do número de células e testar realmente a variação na eficiência das estirpes devido ao fator grafite, as diversas repetições dos inoculantes foram misturadas. Desse inoculante composto determinou-se o número de células através de contagem direta do número de colônias formadas a partir do plaqueamento de gota calibrada de diluições sucessivas de amostras (Miles & Misra, 1932, citado por VINCENT, 1970). A seguir uma amostra de cada inoculante foi convenientemente diluída, de forma a possibilitar a aplicação de 10^6 bactérias, com adição de 10 ml da suspensão por vaso.

O tratamento 2 (inoculação com cultura pura) também seguiu o mesmo procedimento, partindo-se de um meio líquido onde as estirpes haviam sido multiplicadas.

3.2.5. Avaliação

Após 60 dias de cultivo as plantas foram colhidas. A parte aérea da planta foi colocada em sacos de papel, sendo postos para secar em estufa a 65°C até peso constante, para determinação do peso de matéria seca. Depois de pesado o material vegetal foi moído e procedeu-se à análise de Nitrogênio total pelo Método de Digestão e Titulação (Microkjeldahl), segundo BATAGLIA et alli (1983).

O sistema radicular da planta foi lavado em água corrente para retirar o excesso de areia aderido às raízes. Os nódulos presentes foram destacados e contados, sendo depois colocados a secar em estufa a 65°C para determinação do peso de matéria seca.

Avaliaram-se os parâmetros seguintes:

- número de nódulos
- peso de matéria seca dos nódulos
- peso de matéria seca da parte aérea
- teor de Nitrogénio total na parte aérea.

Para cada um dos parâmetros estudou-se os efeitos causados pela concentração de grafite nos inoculantes, pelas estirpes inoculadas e pelo modo de conservação dos inoculantes (temperatura ambiente e refrigeração). Os dados obtidos foram analisados segundo um esquema fatorial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Substrato

A tabela 2 relaciona os resultados de análise química dos nutrientes do solo turfoso empregado no ensaio como suporte dos inoculantes. Com base nesse resultados verifica-se ser este um solo ácido, rico em carbono, com teores médios de fósforo, potássio, cálcio e magnésio, além de elevada CTC.

Após a correção da acidez, o valor de pH ficou na faixa de 6,8 , valor esse considerado apropriado para desenvolvimento das estirpes de *Bradyrhizobium*. Essa correção foi realizada pela adição de calcário dolomítico (2,5% em peso) por ser esse material empregado na produção em escala comercial (MALLORCA ,1984).

A tabela 3 apresenta algumas características da turfa Badenoch, usada na Austrália como substrato para inoculantes, e o solo turfoso empregado neste trabalho. Os dados da turfa australiana foram obtidos de ROUGHLEY (1970) e os do solo turfoso são oriundos da sua análise química (tabela 2), transformados nas mesmas unidades utilizadas para a turfa, para fins de comparação. O teor de matéria orgânica do solo foi calculado conforme

Tabela 2. Análise química das constituintes do solo turfoso

pH	C %	P $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	K	Ca	Mg meq/100cm ³	H+Al ³⁺	S	CTC	V %
4,8	4,4	17,0	0,2	9,8	3,2	7,0	13,2	20,2	65,4

Tabela 3. Características químicas e % de retenção de água apresentadas pela turfa de Badenoch (ROUGHLEY, 1970), usada como substrato de inoculantes na Austrália, e pelo solo turfoso empregado neste trabalho.

Material analisado	pH	Mat.			P %	K	C.R.A. ⁽¹⁾
		Corg.	Org.	Norg.			
Turfa de Badenoch	6,8	36,1	64,3	1,83	0,07	0,12	320
Solo turfoso	4,8	4,4	7,6 ⁽²⁾	0,83 ⁽²⁾	0,009	0,004	44

(1) Capacidade de Retencao de Agua

(2) Dados calculados (vide texto)

recomendação de MALAVOLTA (1975), multiplicando-se o teor de Carbono determinado pelo fator 1,724 , uma vez que o teor deste na matéria orgânica é constante. Desse modo, o solo turfoso utilizado apresentou cerca de 7,6% de matéria orgânica, conforme indicado na tabela 3. Como a porcentagem de Nitrogênio na matéria orgânica também é constante em torno de 5% (MALAVOLTA, 1975) foi também calculado o teor desse nutriente, que se encontra na tabela 3.

Pelos dados da tabela 3 vê-se que a turfa australiana mostra-se mais adequada para substrato de inoculantes do que o solo turfoso usado: seu valor de pH está dentro da faixa propícia ao desenvolvimento da bactéria, sem necessidade de correção, enquanto o solo se mostrou bastante ácido; os teores de P e K são também bem mais elevados, assim como o de Nitrogênio. A capacidade de retenção de água da turfa é oito vezes maior do que a do solo, o que permite uma maior adição de caldo, além de oferecer melhor proteção ao *Bradyrhizobium* contra o ressecamento.

Segundo MALAVOLTA (1975), solos para serem considerados orgânicos devem conter mais de 20% de matéria orgânica. Assim, a turfa australiana citada é um solo orgânico pois possui 64,3% de matéria orgânica (tabela 4). Já o solo empregado no ensaio não o é. Com relação ao teor de Carbono, a turfa apresenta um teor quase dez vezes maior do que aquele verificado para o solo turfoso.

4.2. Avaliação de sobrevivência das estirpes

Para interpretação dos estudos de

sobrevivência recorreu-se à determinação da taxa de mortalidade em função do tempo (FREIRE & JONES, 1963). Também foram determinadas as curvas de longevidade dos inoculantes com diferentes concentrações de grafite.

4.2.1. Taxa de mortalidade

A tabela 4 apresenta os dados de mortalidade verificada no período de 175 dias após a cura dos inoculantes (25 semanas).

Uma análise do efeito das concentrações de grafite nos inoculantes indica que quando não se fez adição de grafite a estirpe SMS-319 apresentou uma taxa de mortalidade negativa. Isso significa que houve crescimento populacional, isto é, ao final de 25 semanas a população verificada era maior, em valor absoluto, do que aquela encontrada no início do período. Paralelamente, nesse mesmo tratamento a estirpe SMS-561 apresentou taxa de mortalidade nula, ou seja, no final de 25 semanas a população observada era igual àquela inicial. Somente a estirpe SMS-400 apresentou taxa de mortalidade real no tratamento sem grafite. No tratamento com 100% de grafite a estirpe SMS-561 foi a que apresentou a maior taxa de mortalidade, o que significa ter sentido mais os efeitos prejudiciais do grafite. A menor taxa observada nesse

Tabela 4. Taxa de mortalidade (bactérias x semanas⁻¹) das estirpes de *Bradyrhizobium* usadas nos inoculantes com diferentes concentrações de grafite, armazenados à temperatura ambiente.

Estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> no inoculante	Grafite no inoculante (% em peso)			
	0	25	50	100
	valor de K ⁽¹⁾			
SMS-319	-0,004	0,004	0,023	0,088
SMS-561	0	0,012	0,016	0,096
SMS-400	0,016	0,021	0,056	0,068

$$(1) K = 1/t \cdot \log B/b$$

K= taxa de mortalidade

t= tempo

B= populacao inicial

b= populacao final

tratamento foi a da estirpe SMS-400.

De maneira geral, pode-se verificar que a estirpe SMS-319 apresentou a menor taxa de mortalidade e a SMS-400, a maior. A estirpe SMS-561 apresentou uma taxa intermediária entre elas.

A taxa de mortalidade reflete a sobrevivência das estirpes no período. Assim, como as menores taxas foram apresentadas pela estirpe SMS-319 pode-se dizer que esta foi a estirpe de melhor sobrevivência após 25 semanas, seguida pela SMS-561, sendo a SMS-400 a que menos sobreviveu no período. Porém, a sobrevivência das três estirpes foi excelente na maioria dos inoculantes.

A conservação dos inoculantes em diferentes temperaturas também teve efeito sobre a taxa de mortalidade das estirpes. A tabela 5 mostra que quando os inoculantes foram conservados sob refrigeração a taxa de mortalidade foi menor para as 3 estirpes em comparação com as mesmas observadas quando os inoculantes foram conservados em temperatura ambiente. Isso indica que temperaturas mais baixas favoreceram a sobrevivência das 3 estirpes. FREIRE & JONES (1963) também verificaram que inoculantes armazenados a 4 °C proporcionaram maior sobrevivência das estirpes de *Rhizobium* empregadas, sobrevivência essa interpretada com base em dados de taxa de mortalidade. Esses autores relacionaram as temperaturas de armazenamento com as condições de esterilidade do substrato e o tipo de embalagem que permita boa troca gasosa sem perda de

Tabela 5. Taxas de mortalidade (bactérias x na^{-1}) das estirpes de *Bradyrhizobium* as nos inoculantes conservados de maneiras diferentes. Média de 12 repetições.

Estirpe de <i>Bradyrhizobium</i> no inoculante	Preservação: temperatura ambiente	Preservação sob refrigeração
	valor de $K^{(1)}$	
SMS-319	0,027	0,008
SMS-561	0,031	0,023
SMS-400	0,040	0,029

$$K = 1/t \cdot \log B/b$$

K= taxa de mortalidade

t= tempo

B= população inicial

b= população final

umidade.

BOIARDI et alli (1983) não verificaram maior viabilidade em inoculantes de *Rhizobium trifolii* conservados em geladeira, em função do tempo, sobretudo quando estes foram aí colocados logo após a produção, sem passarem por período de cura. Os autores consideram um período mínimo de 4 dias para a maturação dos inoculantes como indispensável para o bom desempenho do inoculante, pois é nesse período que ocorre a adaptação da bactéria ao substrato, garantindo o estabelecimento da cultura, com boa sobrevivência posterior. SOMASEGARAN (1985) também salienta a necessidade de um período de cura dos inoculantes, condicionando a necessidade de armazenamento a baixas temperaturas às estirpes empregadas: para estirpes de crescimento lento, armazenamento a 26 C pode ser suficiente ou até mesmo mais favorável.

No presente trabalho, os inoculantes foram "curados" por 5 dias e somente então transferidos para a geladeira. As estirpes de *Bradyrhizobium* empregadas pertencem ao grupo caracterizado por crescimento lento. Os dados observados indicam melhor sobrevivência das estirpes após 180 dias da produção quando os inoculantes foram mantidos sob refrigeração, verificada por menor taxa de mortalidade (Tabela 5). Isso contraria as indicações de SOMASEGARAN (1985) supra citadas, mas permite concluir que temperaturas mais baixas favoreceram a sobrevivência das três estirpes nos inoculantes

4.2.2. Curvas de longevidade dos inoculantes

As figuras 1, 2 e 3 permitem visualizar o comportamento das estirpes SMS-319, SMS-561 e SMS-400 de *Bradyrhizobium*, respectivamente, nos inoculantes com diferentes concentrações de grafite, conservados em temperatura ambiente.

Pela figura 1 observa-se que o comportamento da estirpe SMS-319 foi semelhante nos inoculantes sem grafite e com 25% de grafite (em peso) adicionado, apresentando um ligeiro aumento populacional até os 30 dias, com uma tendência a estabilizar a partir dos 60 dias. Os inoculantes com 50% de grafite (em peso) adicionado e constituídos por 100% de grafite apresentaram uma diminuição populacional a partir dos 60 dias, mais acentuada quando se tinha 100% de grafite como substrato do inoculante. Comparando-se o comportamento da estirpe com as taxas de mortalidade observadas na tabela 4, verifica-se que os dados estão de acordo. A maior taxa de mortalidade foi verificada nos inoculantes constituídos por 100% de grafite (tabela 4), o que pode ser confirmado pela acentuada diminuição de população, mostrada pela figura 1.

A figura 2 indica que o comportamento da estirpe SMS-561 foi semelhante ao verificado para a SMS-319 (figura 1) no que se refere aos inoculantes sem grafite e com 25% de grafite adicionado. Comparando-se esses resultados com as taxas de mortalidade observadas (tabela 4) nota-se que há concordância entre eles. As taxas de mortalidade verificadas pelas 2 estirpes nesses inoculantes foram semelhantes (negativa e nula nos inoculantes sem

grafite, respectivamente para SMS-319 e SMS-561). Nos inoculantes com 50% de grafite adicionado a sobrevivência da SMS-561 foi ligeiramente maior do que a da SMS-319. Isso também pode ser confirmado nas taxas de mortalidade verificadas (tabela 4). Já nos inoculantes constituídos por 100% de grafite efeito mais drástico foi sentido pela estirpe SMS-561, apresentando acentuada diminuição populacional a partir dos 15 dias (figura 2). A taxa de mortalidade observada neste caso também foi maior.

Pela figura 3 pode-se ver que a sobrevivência da estirpe SMS-400 foi menor do que a das outras 2 na maioria dos inoculantes, o que concorda com as maiores taxas de mortalidade observadas (tabela 4). Somente nos inoculantes constituídos por 100% de grafite foram verificadas menores taxas de mortalidade em relação àquelas verificadas para as outras 2 estirpes no mesmo inoculante. Porém, comparando-se as figuras 1, 2 e 3 para a curva referente a esse inoculante verifica-se que houve uma mais acentuada diminuição populacional a partir dos 30 dias. Essa discordância aparente de resultados pode ser explicada pelo fato de que a população observada aos 5 dias para a estirpe SMS-400 era bem inferior àquelas observadas para as estirpes SMS-319 e SMS-561, o que ocasionou menor taxa de mortalidade apesar da diminuição populacional ter sido mais drástica.

A análise global das figuras 1, 2 e 3 confirma que a sobrevivência das três estirpes foi excelente, sobretudo nos inoculantes sem adição de grafite

e naqueles com 25% de grafite adicionado (em peso). Também foi excelente a sobrevivência das estirpes SMS-561 e SMS-319 nos inoculantes com 50% de grafite adicionado (em peso).

O período de validade do inoculante é determinado pela população sobrevivente nos mesmos após armazenamento até o momento de sua utilização. Segundo a legislação brasileira no momento do uso o inoculante deve conter no mínimo 10^7 bactérias/g de inoculante (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 1977). Assim, estariam fora das exigências legais para uso os inoculantes produzidos com 100% de grafite como substrato e com as estirpes SMS-319 e SMS-561, a partir dos 60 dias (figuras 1 e 2, respectivamente), além dos inoculantes produzidos com a estirpe SMS-400 e 100% de grafite como substrato a partir dos 30 dias, bem como aqueles com 50% de grafite adicionado (em peso) depois de 120 dias da produção (figura 3). Os demais inoculantes conservaram-se legalmente utilizáveis até 180 dias após a produção (figuras 1, 2 e 3). Isso vem indicar que o grafite teve uma ação prejudicial na sobrevivência das estirpes, sobretudo quando constituiu o substrato exclusivo dos inoculantes, o que concorreu para diminuir a longevidade dos mesmos.

Finalmente, embora a sobrevivência das estirpes somente tenha sido seriamente prejudicada quando os inoculantes foram preparados com 100% de grafite como

Figura 1. Sobrevivência da estirpe SMS-319 de *Bradyrhizobium* sp. para amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em inoculantes com diferentes concentrações de grafite, no período de 5 a 180 dias após a produção.

Figura 2. Sobrevivência da estirpe SMS-561 de *Bradyrhizobium* sp. para amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em inoculantes com diferentes concentrações de grafite, no período de 5 a 180 dias após a produção.

Figura 3. Sobrevivência da estirpe SMS-400 de *Bradyrhizobium* sp. para amendoim (*Arachis hipogaea* L.) em inoculantes com diferentes concentrações de grafite, no período de 5 a 180 dias após a produção.

substrato, e a sobrevivência das três estirpes nos inoculantes com 25 % de grafite tenha sido excelente até 180 dias após a produção, e com 50 % de grafite para as estirpes SMS-319 e SMS-561 (população acima de 10^7 bactérias/g de inoculante), os inoculantes produzidos sem adição de grafite permitiram uma sobrevivência, senão melhor, no mínimo igual àquela. Portanto, não se pode dizer que a adição de grafite tenha proporcionado melhores condições aos inoculantes. Ao mesmo tempo, também não se pode desprezar a possibilidade de adição de 25 % de grafite aos inoculantes, uma vez que nessa concentração a sobrevivência dos rizóbios ocorreu em níveis e por tempo satisfatório. Essa recomendação dependerá de resultados de trabalhos que avaliem outros aspectos, tais como, sobrevivência das estirpes nas sementes inoculadas, proteção contra fatores adversos no solo, entre outros.

4.3. Avaliação da eficiência dos inoculantes

Para avaliar a eficiência dos inoculantes foi realizado um ensaio em casa de vegetação, em vasos de Leonard com plantas de amendoim inoculadas com os inoculantes produzidos, aos 300 dias após a produção. Foram estudados os efeitos das estirpes, das concentrações de grafite, da temperatura de conservação dos inoculantes sobre a eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio.

4.3.1. Avaliação de eficiência de nodulação

A avaliação da eficiência de nodulação das estirpes foi realizada baseada nos resultados obtidos em termos de número de nódulos e peso de matéria seca dos

mesmos.

A análise estatística desses dados mostrou que forma significativos os efeitos das estirpes e das concentrações de grafite para os dois parâmetros. A interação entre esses efeitos não apresentou diferenças significativas.

A tabela 6 apresenta as diferença entre as médias da amostra conjunta dos dados, observadas para as 3 estirpes de *Bradyrhizobium* empregadas, no que se refere ao número de nódulos e peso de matéria seca dos mesmos. Verifica-se que as médias das estirpes SMS-561 e SMS-319 não diferiram entre si, porém ambas diferiram da média apresentada pela estirpe SMS-400. (Tukey a 5%). Pode-se dizer, portanto, que a estirpe SMS-400 foi a menos eficiente entre as três.

Essas constatações não estão de acordo com aquelas feitas por GIARDINI (1980). Segundo esse autor, as 3 estirpes apresentavam-se igualmente eficientes em nodular amendoim. Esse desacordo não pode ser atribuído à inoculação de população menor da estirpe SMS-400, uma vez que o inóculo foi padronizado antes de ser fornecido à planta. Também não pode ser atribuído a efeitos do grafite adicionado ao inoculante, pois a interação entre esses efeitos (concentração de grafite e estirpe) não foi significativa. Analisando-se as médias apresentadas na tabela 7, para os parâmetros número e peso de matéria seca dos nódulos nos tratamentos inoculados com cultura pura das estirpes, verifica-se que as médias das estirpes SMS-561 e

SMS-319 não diferiram entre si, mas diferiram ambas das médias da estirpe SMS-400. Isso sugere que, se houve alterações na eficiência de nodulação dessa estirpe em relação às outras, tal fato ocorreu antes da execução deste trabalho sem qualquer interferência deste no fato.

O efeito das concentrações sobre a nodulação encontra-se na tabela 8. Tanto para o número como para o peso de matéria seca dos nódulos, as médias encontradas nos inoculantes sem grafite, com 25% de grafite e 50% de grafite adicionado (em peso) não diferiram entre si (Tukey a 5%), porém as 3 diferiram das médias apresentadas pelos inoculantes constituídos por 100% de grafite. Isso quer dizer que somente os inoculantes preparados exclusivamente com grafite tiveram efeito prejudicial sobre a nodulação. Os inoculantes com adição de 25% e 50% de grafite (em peso) não apresentaram efeitos prejudiciais nem benéficos em relação aos inoculantes sem grafite. A ação negativa do grafite sobre a eficiência de nodulação, pode ter sido consequência de alterações provocadas por este material sobre o sistema radicular da planta, bem como sobre o desempenho das estirpes, uma vez que foi verificada tanto para o número de nódulos como para o peso de matéria seca dos mesmos.

Não se verificaram alterações na eficiência de nodulação em relação à temperatura de conservação dos inoculantes. Pela tabela 9 verifica-se que as médias apresentadas tanto para o número de nódulos como para o peso de matéria seca dos mesmos não diferiram entre si

(Tukey a 5%) quando os inoculantes foram conservados em temperatura ambiente ou sob refrigeração.

4.3.2. Avaliação da eficiência em fixação de Nitrogênio

A avaliação da eficiência fixadora das estirpes foi feita levando-se em conta os dados obtidos para peso de matéria seca e teor de N total na parte aérea da planta. A análise estatística desses parâmetros revelou efeitos significativos das estirpes e das concentrações de grafite nos inoculantes. A interação entre esses efeitos não apresentou diferenças significativas.

Pela tabela 6 pode-se notar que as médias apresentadas pelas estirpes SMS-561 e SMS-319 não diferiram entre si, tanto para peso de matéria seca da parte aérea como para teor de N total na parte aérea. A média apresentada pela estirpe SMS-400 em relação ao peso de matéria seca da parte aérea não diferiu daquela apresentada pela SMS-319, mas diferiu da média apresentada pela estirpe SMS-561 (Tukey a 5%). Porém, com relação ao teor de N total na parte aérea, a média apresentada pela estirpe SMS-400 diferiu das outras duas. Nos tratamentos inoculados com cultura pura as médias das três estirpes diferiram entre si para os dois parâmetros avaliados (tabela 7). Vê-se, com isso, que a estirpe menos eficiente em fixação foi a SMS-400. Esse fato, entretanto, não pode ser atribuído a efeito de adição de grafite, uma vez que a interação entre os efeitos (estirpe e concentração de grafite no inoculante) não foi significativa; nem tampouco a menor

população introduzida, pois o inóculo foi padronizado antes de ser fornecido. Como essa estirpe foi a que apresentou menor eficiência em nodulação, essa pode ser a causa da menor eficiência fixadora em relação às outras duas estirpes: menor nodulação induziu a uma menor fixação de nitrogênio.

O efeito das concentrações de grafite sobre a fixação de nitrogênio e peso de matéria seca da parte aérea está apresentado na tabela 8. As médias observadas para os inoculantes sem grafite, com 25% de grafite e 50% de grafite adicionado não diferiram entre si (Tukey a 5%), tanto para o peso de matéria seca da parte aérea como para o teor de N total na parte aérea. Somente as médias observadas para os inoculantes com 100% de grafite como substrato diferiram das demais para os dois parâmetros. Isso quer dizer que, como o ocorrido para a nodulação, somente foram verificados prejuízos na eficiência fixadora quando se empregou inoculantes preparados com grafite exclusivamente como substrato. Adições de 25% e 50% de grafite não causaram prejuízos, bem como não induziram qualquer benefício à fixação de nitrogênio em relação aos inoculantes sem grafite. O efeito prejudicial do inoculante com grafite puro sobre a eficiência fixadora pode estar relacionado com algum componente presente no material e não indicado na tabela 1, fornecida por Peres Moura Ltda., firma onde se adquiriu o produto. Esse componente poderia ser, por exemplo, um metal pesado (Pb, Hg, Cd) que exerceu algum efeito inibitório em qualquer um dos passos do

processo de fixação e/ou na planta.

A temperatura de conservação dos inoculantes também não teve interferência na eficiência fixadora das estirpes, conforme pode ser visto na tabela 9, que apresenta valores médios da análise conjunta dos dados.

Tabela 6. Eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio de três estirpes de *Bradyrhizobium* nos inoculantes. Média de 20 repetições.

Estirpe de <i>Bradyrhizobium</i> no inoculante	Número de nódulos	Peso de mat. seca nódulos	Peso de mat. seca p. aérea	Teor de N total p. aérea
		g		%
SMS-319	12,40 a	1,10 a	2,10 a	1,63 a
SMS-561	12,20 a	1,10 a	2,00 ab	1,63 a
SMS-400	9,70 b	1,07 b	1,90 b	1,56 b
D.M.S. (5%)	2,23	0,03	0,20	0,05
C.V. (%)	34,4	5,6	7,9	5,4

Dados transformados para $\sqrt{x + 1}$

Medias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível considerado

Tabela 7. Eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio de três estirpes de *Bradyrhizobium* inoculados na forma de cultura pura. Média de 5 repetições.

Estirpe de <i>Bradyrhizobium</i> no inoculante	Número de Nódulos	Peso de Mat. seca Nódulos <u>g</u>	Peso de Mat. seca P. Aérea <u>g</u>	Teor de N total P. Aérea <u>%</u>
SMS-561	15,80 a	1,15 a	2,60 a	1,71 a
SMS-319	14,20 a	1,13 a	2,20 b	1,52 b
SMS-400	10,20 b	1,08 b	2,40 c	1,45 c
D.M.S. (5%)	2,70	0,04	0,20	0,06
CV (%)	30,10	6,00	15,90	4,00

Dados transformados para $\sqrt{x+1}$
 Médias seguidas por letras iguais não
 diferem entre si, ao nível considerado

Tabela 8. Efeito da concentração de grafite nos inoculantes sobre a eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio. Média de 15 repetições

Concentração de Grafite nos inoculantes — % —	Número de Nódulos	Peso de Mat. Seca Nódulos — g —	Peso de Mat. Seca P. Aérea — g —	Teor de N Total P. Aérea — % —
0	12,70 a	1,10 a	2,10 a	1,64 a
25	12,50 a	1,09 a	2,11 a	1,62 a
50	13,79 a	1,10 a	2,12 a	1,61 a
100	6,86 b	1,06 b	1,66 b	1,53 b
D.M.S. (5%)	2,99	0,05	0,27	0,07
C V (%)	34,40	5,60	17,90	5,40

Dados transformados para $\sqrt{x+1}$
 Medias seguidas por letras iguais não
 diferem entre si, ao nível considerado

Tabela 9. Efeito da temperatura de conservação dos inoculantes sobre a eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio. Média de 60 repetições.

Tipo de Preservação	Número de Nódulos	Peso de Mat. Seca Nódulos	Peso de Mat. Seca P. Aérea	Teor de N Total P. Aérea
		g		%
Temperatura Ambiente	10,80	1,08	2,00	1,59
Sob Refrigeração	12,10	1,10	2,00	1,62
C V (%)	34,40	5,60	17,90	5,40

Dados transformados para $\sqrt{x+1}$
 Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, ao nível considerado

5. CONCLUSÕES

1)- a sobrevivência das três estirpes de *Bradyrhizobium* empregadas foi excelente nos inoculantes sem grafite e com adição de 25% de grafite em peso. Após 180 dias da produção dos inoculantes, esses inoculantes apresentaram população acima do limite mínimo exigido pela lei para serem comercializados.

2)-a presença de grafite nos inoculantes foi prejudicial à eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio das estirpes somente quando os inoculantes foram preparados exclusivamente com grafite como substrato.

3)-o armazenamento dos inoculantes em temperaturas mais baixas (sob refrigeração) favoreceu a sobrevivência das estirpes após 180 dias da produção. Porém não interferiu com a eficiência de nodulação e fixação de Nitrogênio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONS, S. & AHMAD, M.H. Examining growth and survival of cowpea rhizobia in Jamaican peat. Letters in Applied Microbiology, Oxford, 2:115-118, 1986.
- ALEXANDER, M. Introduction to Soil Microbiology. New York, John Wiley & Sons, 1965. p.309-320.
- ANDREW, C.S. Legumes in acid soil. In: DOBEREINER, J.; BURRIS, R.M. & HOLLAENDER, A.(ed.) Limitations and Potentials of Biological Nitrogen Fixation in Tropics, New York, Plenum Press, 1977. p.135-160.
- BARKSDALE, W.E. Granular inoculants: Produce new payoffs for growers across peanut. Peanut Farmers, Raleigh, 13(4): 42-44, 1977.
- BATAGLIA, O.D.; FURLANI, A.M.C.; TEIXEIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R. & GALLO, J.R. Análise Química de Plantas. Boletim Técnico do IAC nº78, Campinas, SP, 1983. p. 11-13.
- BEZDICEK, D.F.; EVANS, D.W.; ADEBE, B. & WINTERS, R.F. Effects of peat and granular inoculum for soybean field and N-fixation under irrigation. Agronomy Journal, Madison, 70: 865-868, 1978.
- BHATNAGAR, R.S.; JAUHRI, K.S. & ISWARAN, V. Survival of *Rhizobium japonicum* in charcoal-bentonite based carrier. Current Science, Bangalore, 51(8): 430-432, 1982.
- BOIARDI, J.L.; ARRARAS, E.A.; BALATTI, A.P. & MAZZA, L.A. Supervivência de *Rhizobium phaseoli* en inoculantes a

- base de turba. Revista de la Facultad de Agronomia, Buenos Aires, 59: 113-123, 1983.
- CHAO, W.L. & ALEXANDER, M. Mineral soil as carrier for *Rhizobium* inoculants. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 47: 94-97, 1984.
- CRAWFORD, S.L. & BERRYHILL, D.L. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based legume inoculants applied to seeds. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 45(2): 703-705, 1983.
- DATE, R.A. Legume inoculant production. Proc. Indian Nat. Sci. Acad. Biol. Sci., 40B(6): 667-686, 1977.
- DATE, R.A. & ROUGHLEY, R.J. Preparation of Legume Seed Inoculants. In: Gibson, A.H.(ed.) A Treatise of Dinitrogen Fixation, New York, John Wiley & Sons, 1977. p.243-275.
- DESCHODT, C.C. & STRIJDOM, B.W. Suitability of a coal-bentonite based as a carrier of rhizobia inoculants. Phytophilactica, Pretoria, 8(1): 1-6, 1976.
- DOMMERGUES, Y.R.; DIEM, H.G. & DWIES, C. Polyacrilamide entrapped *Rhizobium* as a carrier for legumes. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 37: 779-781, 1979.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. & McCOY, E. Root-nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison, University Press, 1932. 343 p.
- FREIRE, J.R.J. & JONES, J.H. Influência da temperatura de armazenamento na longevidade dos inoculantes em leguminosas. Revista da Faculdade de Agronomia e

- Veterinária, Porto Alegre, 6(2): 85-93, 1963.
- GAULT, R.R. A study of development and trends associate with legumes inoculants for use with new legumes crop. Rhizobium Newsletter, Sidney, 26(2): 197-211, 1981.
- GIARDINI, A.R. Efeito de população de *Rhizobium* sp., estirpes selecionadas e épocas de aplicação de nitrogênio na produção de amendoim (*Arachis hipogaea* L.). (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP), Piracicaba, 1980. 62 p.
- GRAHAM, R. Assessment of carrier materials for the inoculation of cowpea in Trinidad. Tropical Agriculture, London, 61(1): 53-55, 1984.
- GRAHAM-WEISS, L.; BENNET, M.L. & PAAU, A.S. Production of bacterial inoculants by direct fermentation on nutrient-supplemented vermiculite. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 53(9):2138-2140, 1987.
- HALLIDAY, J. & GRAHAM, P.H. Coal compared to peat as carrier of rhizobia. Turrialba, San Jose, 28(4): 348-349, 1978.
- JORDAN, D.C. Taxonomy of *Rhizobiaceae* - An overview. In: North American Conference of Rhizobium, 9. Quebec, Canada, 1987. p. 1-5.
- JUNG, G.; MUGNIER, J.; DIEM, H.G. & DOMMERGUES, Y.R. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legume. Plant and Soil, The Hague, 65(2): 219-231, 1982.
- KANDASAMI, R. & PRASAD, N.N. Lignite as a carrier of rhizobia. Current Science, Bangalore, 40(181): 496, 1971.

- KOLING, I.G.; FREIRE, J.R.J.; KOLING, J. & SILVA, G.M. Viabilidade de *R. japonicum* em diferentes formas de inoculantes. Anais da XII Reunião Latinoamericana sobre Rhizobium, Campinas, SP, 1984. p. 25-30.
- KREMER, R.J. & PETERSON, H. Effect of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 45(6): 1790-1794, 1983.
- LOPES, E.S. Inoculantes para leguminosas: Importância, produção e controle de qualidade. Boletim informativo do Instituto Agrônomo de Campinas, vol. 27-28, 1975.
- LOPES, E.S.; SAVY FILHO, A.; OLIVEIRA, M.L.C.; GIARDINI, A.R. & POMPEO, A.S. Observação da nodulação em cultivares de amendoim. Bragantia, Campinas, 35: XI-XII (nota nº 3), 1976.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R. & SANCHES, L. Sobrevivência de *Rhizobium japonicum* em turfa esterilizada com raios gama. Bragantia, Campinas, 39: 205-209, 1980.
- LOPRETO, C.R.; MAZZA, L.A. & BALATTI, A.P. Influencia de los componentes del medio de cultivo sobre el tiempo de generacion de uma cepa de *Rhizobium japonicum*. Anales de la Sociedad científica Argentina, Buenos Aires, 193: 35-47, 1972.
- LUGO, A.; PEREZ, R. & MUÑOZ, D. Utilizacion de un abono procedente del reciclamiento de desechos organicos como soporte para *Rhizobium*. Anais da XII Reunião Latinoamericana sobre Rhizobium, Campinas, SP, 1984. p.

31.

- MALAVOLTA, E. Manual de Química Agrícola: Nutrição de Plantas e Fertilidade do Solo. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1975. p. 189-190.
- MALLORCA, M.S. La importancia del soporte y su acondicionamiento en la produccion de inoculants. Datilografado, 1984. 14 p.
- MATERON, L.A. & WEAVER, R.W. Inoculant maturity influences survival of rhizobia on seeds. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 49: 465-467, 1985.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA/DNPV/DICOF - Normas para coleta e análise de inoculantes para fins de fiscalização, Brasília, DF, 1977, 32 p.
- MORETTI, V.R. & SAITO, S.M.T. Crescimento e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em torta de cana, "peat-moss" e turfa comercial. O Solo, Piracicaba, 70: 44-46, 1978.
- MOAWAD, H.; EL-DIN, B. & KHALAFALLAH, M. Quantification of nitrogen fixation by the peanut/*Rhizobium* symbiotic system in a virgin sand soil. Z. Pflanzenernaehr. Badenok, Berlin, 149:668-673, 1986.
- PACZKOWSKI, M.W. & BERRYHILL, D.L. Survival of *Rhizobium phaseoli* in coal-based inoculant legume. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 40(8): 494-495, 1979.
- PARKER, F.E. & VINCENT, J.M. Sterilization of peat by gamma irradiation. Plant and Soil, The Hague, 61: 285-293, 1981.
- PHILIP, K. & JAUHRI, K.S. Survival of *Rhizobium* and

- Azotobacter* in sugarcane press mud under different storage conditions. Malaisian Agricultural Journal, Kuala Lumpur, 54(1): 56-62, 1983.
- PUGASHETTI, B.K.; GOPALGOWDA, H.S. & PATIL, R.B. Cellulose powder as legume inoculant base. Current Science, Bangalore, 40(8): 494-495, 1971.
- RAIJ, B.van & QUAGGIO, J.A. Métodos de análise de solo para fins de Fertilidade. Boletim Técnico do IAC, Campinas, n° 81, 1983. 31 p.
- RAMIREZ, R.M.; MUÑOZ, D.G.; VESGA, B. & MONROY, O. Estudio de una composta de lirio acuatico como posible sustituto de turba utilizada como soporte de inoculantes de leguminosas. Revista Latinoamericana de Microbiologia, Mexico, 25: 42-43, 1983.
- RIZK, S.G.; FARAG, F.A.; EL-NADY, M.A. & LOFTI, M. Growth of *Rhizobium trifolii* on certain solid presterilized carriers. Agricultural Research Reviews, Cairo, 53: 173-179, 1975.
- ROUGHLEY, R.J. The preparation and use of legume seed inoculant. Plant and Soil, The Hague, 32: 676-701, 1970.
- ROUGHLEY, R.J. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, P.S. (ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. International Biological Programme, serie 7. Cambridge, Cambridge University Press, 1976. p. 125-136.
- ROUGHLEY, R.J. & PULSFORD, D.J. Production and control of legume inoculants. In: VINCENT, J.M. (ed.). Nitrogen Fixation in Legumes, London, Academic Press, 1982. p.

193-210.

SPARROW, S.D. Jr. & HAM, G.E. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carriers materials. Agronomy Journal, Madison, 75: 181-184, 1983.

SOMASEGARAN, P. Inoculant production with diluted liquid culture of *Rhizobium* spp. and autoclaved peat: Evaluation of diluents, *Rhizobium* spp., peats, sterility requirements, storage and plant effectiveness. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 50: 398-405, 1985.

SOMASEGARAN, P. & HALLIDAY, J. Dilution of liquid *Rhizobium* culture to increase production capacity of inoculant plants. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 44(2): 330-333, 1982.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Niftal and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources, 1985. 367 p.

STEIN, M.; MALLORCA, M.S. & WILLIAMS, P.M. Gamma irradiated filter mud as a carrier for *Rhizobium* inoculants. Acta Científica Venezolana, Caracas, 31: 374-375, 1980.

STEWART, W.D.P. Nitrogen Fixation in Plants. London, The Atholone Press, University of London, 1966. p. 1-57.

STRIJDOM, B.N. & DESCHODT, C.C. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on the survival of rhizobia. In: NUTMAN, P.S. (ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. International Biology Programme,

- serie 7, Cambridge, Cambridge University Press, 1976. p. 151-168.
- STRIJDOM, B.N. & van RENSBURG, H.J. Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of *Rhizobium* inoculants. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 41(6): 1344-1347, 1981.
- VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; SCHOELLES, D.; BOSE, E. & PEDROSO, M.H.T. Fixação Biológica do Nitrogênio pela Simbiose entre *Rhizobium* e Leguminosas. Boletim IPAGRO, Porto Alegre, nº11, 1983.
- VINCENT, J.M. A Manual for the Practical Studies of Root-Nodule Bacteria. International Biological Programme, Handbook 15. London, Academic Press, 1970. 159 p.
- VINCENT, J.M.; THOMPSON, J.A. & DONOVAN, K.O. Death of the root-nodule bacteria on drying. Australian Journal of Agricultural Research, Victoria, 13: 258-270, 1962.
- WILLIAMS, P.M. Current use of legume inoculant technology. In: ALEXANDRE, M. (ed.). Biological Nitrogen Fixation. New York, Plenum Publishing Corp., 1984. p. 173-200.
- WILLIAMS, P.M. & MALLORCA, M.S. Survival of *Rhizobium japonicum* in filter mud based inoculants. Acta Científica Venezolana, Caracas, 31: 27-29, 1980.