OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO
DE INOCULANTE DE ALTA QUALIDADE PARA FEIJÃO
(Phaseolus vulgaris L.)

VERA LÚCIA MORETTI ROMANI

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. SIU MUI TSAI

Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Solos e Nutrição de Plantas.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

junho - 1989

Romani, Vera Lucia Moretti

R758o Otimização de condições para produção de inoculan
te de alta qualidade para feijão (Phaseolus vulgaris
L.). Piracicaba, 1989.

p.

Tese - ESALQ

Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio - Inoculação 2.
Feijão - Inoculação 3. Inoculante - Produção 4. Nitro
gênio - Fixação I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO
DE INOCULANTE DE ALTA QUALIDADE PARA FEIJÃO
(Phaseolus vulgaris L.)

Vera Lúcia Moretti Romani

Aprovada em: 18.09.1989

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo	ESALQ/USP
Prof. Dr. Klaus Reichardt	ESALQ/USP
Prof. Dr. Francisco de A. F. de Mello	ESALQ/USP
Dra. Siu Mui Tsai	CENA/USP
Dr. Murilo de Melo	ESALQ/USP

Dra. Siu Mui Tsai
Orientadora

Ao Palmiro, Thiago e
Carolina com muito
amor.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Sui Mui Tsai, pela orientação, liberdade e amizade.

Ao Dr. Frederico Maximiliano Wiendel, diretor do Centro de Energia Nuclear (CENA), pelas facilidades e amizade.

Ao Prof. Dr. Geraldo Vitorino França, coordenador do Curso de Pós-graduação em "Solos e Nutrição de Plantas" pela consideração.

Ao Prof. Otto Jesu Crócomo, pelo incentivo e amizade.

A Dra. Maria Tereza Vitral de Carvalho, pela colaboração.

A Mogiana Alimentos, na pessoa de José Augusto Taveira, pela colaboração.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) na pessoa de Antonio Bonomi, pela colaboração.

Ao Dr. Raymond Pacovsky, pelo auxílio na correção do texto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

A equipe da Seção de Microbiologia de Solos do CENA pelo auxílio e amizade.

A Seção de Radiobiologia pela colaboração.

A Comisión Nacional de Energia Atômica da Argentina, na pessoa do Eng. Agr. Edgardo Brenzoni pela turfa da Patagônia.

A FINEP, BOSTID/NAS e EMBRAPA pelo apoio financeiro ao projeto.

SUMARIO

Página

RESUMO	vii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Importância da inoculação de leguminosas ...	4
2.2. Produção de inoculantes	8
2.2.1. Seleção de estirpes de <u>Rhizobium</u>	8
2.2.1.1. Temperatura	9
2.2.1.2. Antagonismo	13
2.2.2. O substrato	22
2.2.2.1. Qualidade	24
2.2.2.2. Esterilização	29
3. MATERIAL E METODOS	35
3.1. Seleção de estirpes de <u>Rhizobium</u>	35
3.1.1. Resistência a actinomicetos	35
3.1.2. Resistência a temperaturas elevadas .	37
3.1.3. Resistência a antibióticos	40
3.1.4. Resistência a fungicidas	42

3.2. Seleção do substrato	42
3.2.1. Caracterização química	42
3.2.2. Caracterização física	43
3.2.3. Caracterização biológica	43
3.3. Qualidade do suporte	45
3.3.1. Sobrevivência no suporte	45
3.3.2. Eficiência em plantas	46
3.4. Substrato em temperatura elevada	49
3.4.1. Sobrevivência no suporte	49
3.4.2. Eficiência em plantas	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Seleção de estirpes de <u>Rhizobium</u>	51
4.1.1. Resistência a actinomicetos	51
4.1.2. Resistência a temperaturas elevadas .	53
4.1.3. Resistência a antibióticos	62
4.1.4. Resistência a fungicidas	63
4.2. Seleção de substratos	67
4.2.1. Caracterização de turfas	67
4.2.2. Uso de aditivo em turfa comercial ...	84
4.3. Uso potencial de suportes e aditivos	96
4.3.1. Caracterização dos suportes	98
4.3.2. Sobrevivência do <u>Rhizobium</u> nos suportes	112

4.3.3. Eficiência do inoculante em plantas .	117
4.4. Uso de <u>Rhizobium</u> selecionado em suporte modificado	122
4.4.1. Sobrevivência do <u>Rhizobium</u>	122
4.4.2. Eficiência em plantas	125
5. CONCLUSOES	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO
DE INOCULANTE DE ALTA QUALIDADE PARA FEIJÃO
(Phaseolis vulgaris L.)

Autora: VERA LÚCIA MORETTI ROMANI

Orientadora: PROFa. DRa. SIU MUI TSAI

RESUMO

Com a finalidade de estudar a produção de inoculante de alta qualidade para feijoeiro, foram conduzidos experimentos para selecionar estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli baseando-se em sua resistência a antagonistas, altas temperaturas, antibióticos e fungicidas. Uma turfa brasileira também mostrou melhores características químicas, físicas e biológicas quando comparada com turfas usadas atualmente como veículos.

Os resultados mostraram alta variabilidade intra e interespecífica para Rhizobium leguminosarum bv phaseoli quanto às características estudadas, dando potencialidade para seleção.

A estirpe CM-01 se mostrou superior a CM-04 nos parâmetros estudados como resistência a antagonistas e a temperaturas elevadas, e deu origem a um isolado "6" com características de tolerância a 40 °C, sem perder a eficiência de fixação de nitrogênio quando inoculada em plantas.

Quanto aos suportes verificou-se que existem turfas com melhores características do que as que estão sendo utilizadas atualmente pelos fabricantes comerciais de inoculantes. A turfa de São José dos Campos apresentou uma capacidade de retenção de água média em torno de 160% contra 83% da turfa comercial além de ser também superior no teor de matéria orgânica que são dois parâmetros importantes na escolha do suporte para produção de inoculantes.

É possível a utilização de aditivos para melhorar a qualidade das turfas que estão sendo utilizadas conseguindo-se aumentos no teor de matéria orgânica, quando o aditivo é rico em compostos orgânicos com consequente aumento no teor de elementos nutritivos assim como na capacidade de retenção de água.

Quando os inoculantes foram incubados em altas temperaturas (38 °C), o isolado "6" mostra uma tendência de superioridade quanto a eficiência em plantas em

relação a sua original CM-01. Quando as condições de temperatura são normais, a CM-01 continua superior, mantendo grande estabilidade nas respostas dos testes efetuados.

OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS FOR PRODUCTION
OF HIGH QUALITY INOCULANT FOR Phaseolus vulgaris L.

Author: VERA LUCIA MORETTI ROMANI

Adviser: PROFa. DRa. SIU MUI TSAI

SUMMARY

In order to study the production of a high quality inoculant for bean plants experiments were carried out. Strains of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli were selected based on its resistance to antagonists, high temperature, antibiotics and fungicides. Also, a brasilian peat that showed the best chemical, biological and physical parameters was compared with a commercial peat used as actual carrier.

The results have showed a high intra - and interspecific variability among the strains of Rhizobium leguminosarum bv phaseoli which have a good potential for selection.

The strain CM-01 showed a higher resistance to antagonists and to high temperature when compared to CM-34. An isolate referred to as "6" obtained from CM-01 was

tolerant to 40^o C, and it did not loss its nitrogen fixation efficiency when inoculated in plants.

Higher quality carrier than those used by the brasilian inoculant industries was found. The peat from São José dos Campos, showed about 160% water holding capacity compared to 83% for a comercial peat used by industry. Also its organic matter content was superior these two parameters seem to be a good tool to chose a carrier for inoculant.

In other experiments it was possible to improve the quality of the commercial peats through the utilization of additives. The additives, rich in organic compounds, may confer a higher organic matter content, and water holding capacity and consequently improve this nutritional and physical properties of the peat.

Inoculation of the isolate "6" at high temperature (38^o C) was more efficient in plants compared to CM-01. At normal temperatures, the CM-01 showed high stability to nodulation and nitrogen fixation efficiency.

1. INTRODUÇÃO

A inoculação de leguminosas com bactérias do gênero Rhizobium, é um método de quase um século, que produziu grande impacto, pois se constitui numa das poucas aplicações práticas da utilização de microrganismos na agricultura (BROCKWELL et alii. 1982).

Inoculante é um cultivo de rizóbios previamente selecionados, e introduzidos num suporte que facilite sua manipulação e confira proteção (ROUGHLEY, 1970). Existem, portanto, dois aspectos que determinam a qualidade do inoculante e o sucesso de sua aplicação: é bactéria, que define seu potencial qualitativo e o suporte que define seu potencial quantitativo (LABANDERA, 1986).

Existem inoculantes de vários tipos como cultivos puros em agar, liofilizados, em óleo, em turfas granuladas (BURTON, 1980), mas o mais comumente usado no Brasil é o inoculante que utiliza a turfa em pó como suporte.

Quando um programa de inoculação de leguminosas visa obter máximas de Fixação Biológica de

Nitrogênio (FBN) deve satisfazer algumas premissas básicas (FAO, 1978; HALLIDAY & GRAHAM, 1978; DATE E ROUGHLEY, 1977). Iniciar com uma produção de inoculante de alta qualidade, levando-se em consideração a bactéria e seu suporte, seguidos da tecnologia adequada de utilização desse inoculante, além de um programa de extensão que permita a rápida transferência da tecnologia gerada ao agricultor.

No Brasil tem sido encontrada pouca resposta a utilização de inoculantes no campo para feijão (ARAÚJO, 1974; SAITO, 1982) fato atribuído a baixa sobrevivência da bactéria no suporte, juntamente com a baixa competitividade e pobre adaptação ecológica das estirpes utilizadas (VIDOR, 1981; BROCKWELL et alii, 1982).

Os suportes devem passar por um tratamento esterilizante antes de serem impregnados com o caldo de bactérias crescidas em meio líquido. O produto final deve ser submetido a um controle de qualidade periódico e satisfazer os requisitos exigidos pela legislação vigente em cada país.

As reuniões científicas e congressos (MIRCEN, 1985) tem demonstrado que muita coisa tem que ser feita ainda para melhorar a qualidade do inoculante brasileiro.

Neste trabalho estamos propondo uma seleção "in vitro" de estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli utilizando-se das características de resistência a

antagonistas, como por exemplo, actinomicetos que estão presentes em grande número nas turfas brasileiras: resistência a antibióticos na sua maioria produzidos por Streptomyces presentes tanto na turfa como em nossos solos: resistência a temperaturas elevadas e resistência a fungicidas que são utilizadas rotineiramente pelos agricultores.

Em paralelo, foram estudadas as características das turfas brasileiras com potencial para serem utilizadas como suporte baseando-se em parâmetros químicos, físicos e biológicos. Estas características foram comparadas com as de uma turfa supostamente ideal (Patagônia) e com as de turfas já comercializadas no Brasil.

Após seleção das estirpe e do suporte, foi tentado a preparação de um inoculante que preenchesse os requisitos de alta qualidade no qual será posteriormente testado em planta para avaliação da eficiência da bactéria e da qualidade do suporte na manutenção de elevado número de rizóbios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Importância da inoculação de leguminosas

A disponibilidade de nitrogênio mineral para as plantas está na dependência direta da contínua decomposição da matéria orgânica e da aplicação de adubação nitrogenada. O processo de fixação (redução biológica) do nitrogênio atmosférico (N_2) é restrito a microrganismos que ocorrem livremente no solo ou em associação com espécies vegetais. A simbiose das leguminosas com as bactérias do gênero Rhizobium parece ser o sistema mais eficiente em termos de incorporação do N_2 fixado ao ecossistema. Estima-se que aproximadamente 20% do N_2 fixado anualmente na Terra provém da associação Rhizobium - leguminosas (FRANCO, 1978).

Em muitos países tropicais e sub tropicais, a nodulação e a produtividade de grãos por leguminosas é frequentemente limitada por fatores que afetam a simbiose Rhizobium - leguminosa (KREMER e PETERSON, 1983).

Certas leguminosas podem não encontrar seu

simbionte específico num solo, principalmente quando são plantados neste solo pela primeira vez. Este problema pode ser aliviado com o processo de inoculação de Rhizobium que poderá resultar em aumento significativo de produção (OKON et alii, 1979; RATNER et alii, 1979; REDDY e TANNER, 1980).

Os solos frequentemente contêm rizóbios que são altamente competitivos contra os aplicados pelos inoculantes. Estirpes de Bradyrhizobium japonicum de inoculantes comerciais falharam no aumento de produção de grãos em solos plantados rotineiramente com soja (KREMER et alii, 1978; SKIPPER et alii, 1980). Comportamento semelhante tiveram estirpes selecionadas de amendoim na presença de população nativa de rizóbios (DIATLOFF e LANGFORD, 1975). Esses estudos evidenciam que a inoculação não é necessária em condições experimentais com amendoim e soja quando os rizóbios nativos são já suficientes no suprimento de nitrogênio.

A maioria dos solos brasileiros apresentam uma população nativa de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli principalmente em áreas onde a cultura se desenvolve há muito tempo. Essa população é medianamente eficiente e com grande adaptabilidade e sobrevivência nos solos (SAITO e RUSCHEL, 1980).

Todavia os rizóbios nativos podem ser inefetivos à fixação de N, e uma inoculação com uma

população de 10^8 células/semente de uma estirpe eficiente pode solucionar esse problema (PETERSON e LOYNACHAN, 1985).

Essa alta população de rizóbios na semente se faz necessária para garantir a sobrevivência da bactéria introduzida no solo, com uma boa colonização da rizosfera das leguminosas para que possa haver competição eficiente pelos sítios de infecção, contra as estirpes nativas (ROUGHLEY et alii, 1976; BOONKERD et alii, 1978).

Tem sido difícil definir exatamente os parâmetros que contribuem para a sobrevivência e competitividade da bactéria no solo. Juntamente com os fatores físicos e químicos os fatores biológicos como a presença do hospedeiro apropriado, presença ou ausência de bacteriófagos específicos, competição com outros microrganismos e a própria competição entre diferentes estirpes tem sido os parâmetros considerados (FRANCO e VINCENT, 1976).

De acordo com SAITO et alii (1982) a inoculação de semente de feijão em condições de campo não tem garantido o desenvolvimento de simbioses efetivas, indicadas pela baixa nodulação das estirpes introduzidas.

O único critério de seleção considerado na produção de inoculante tem sido a capacidade elevada de fixar nitrogênio. Os termos eficiência ou ineficiência carecem de validade se não for levado em consideração a

especificidade hospedeira (FREIRE e VIDOR, 1978; HUNGRIA, 1981; PACOVSKY et alii, 1984; FREIRE e KOLLING, 1986). Uma simbiose eficiente entre a estirpe de Rhizobium usada no inoculante e a maioria dos cultivares da espécie hospedeira seria desejada.

Na simbiose Phaseolus vulgaris - Rhizobium leguminosarum bv phaseoli foi evidenciado a ocorrência de variação de respostas quando diferentes estirpes foram inoculadas em um mesmo cultivar (SAITO e CARDOSO, 1977; HUNGRIA, 1981; VOSS et alii, 1983; PEREIRA, 1983), bem como quando diferentes cultivares de P. vulgaris foram inoculados com a mesma estirpe (FRANCO e DOBEREINER, 1967; SAITO e FREITAS, 1982; GRAHAM, 1984; PACOVSKY et alii, 1984), o que foi manifestado em diferenças significativas nos parâmetros de rendimento da parte aérea e nodulação.

Reduções nessa variação exigem um trabalho inesgotável de seleção a nível da planta e da bactéria para a maximização dos benefícios da simbiose (FREIRE e KOLLING, 1986). Avaliações do comportamento de isolados de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli de zonas produtoras de feijão permitiram obter estirpes mais eficientes e com nodulação precoce que aumenta o período de fixação (VOSS et alii, 1983). A retenção e transporte do nitrogênio fixado tem sido sugerida como uma característica intrínseca da estirpe de Rhizobium a ser selecionada para uma maior eficiência no uso

do N₂ fixado (HAVELKA e HARDY, 1976; HUNGRIA et alii, 1985a, b; HUNGRIA e NEVES, 1986).

2.2. Produção de inoculantes

Nestes últimos anos a tecnologia de inoculantes tem tido avanços consideráveis e alguns problemas de especificidade com o hospedeiro têm sido solucionados para um número limitado de leguminosas tropicais. Os rizóbios têm sido cultivados em turfa esterilizada e atingido números satisfatórios garantindo sua sobrevivência. Enquanto isso outros substratos têm sido estudados, e também alguns processos de esterilização estão sendo adaptados para viabilização da produção de inoculante de alta qualidade (BURTON, 1982).

De acordo com DATE e ROUGHLEY (1977) a produção de um inoculante de alta qualidade pode ser dividida em três fases: (a) seleção e testes com estirpes de Rhizobium, (b) preparação do inoculante, (c) testes para o controle de qualidade do inoculante produzido.

2.2.1. Seleção de estirpes de Rhizobium

Os critérios básicos para seleção de estirpes de Rhizobium foram postulados por VINCENT (1956) e consistem em: a) habilidade para formar nódulos eficientes na fixação

de N² em todos os hospedeiros para as quais foram recomendadas; b) a capacidade de continuar eficiente em condições de campo. Uma nodulação eficiente é ainda hoje considerada como o critério principal na seleção de estirpes. BROCKWELL et alii (1969) propuseram critérios adicionais que incluem boa nodulação numa faixa ampla de temperatura, crescer bem em meio líquido e também na turfa, habilidade de sobreviver no inoculante e na semente e se multiplicar no solo. Outras características ecológicas e agronômicas como tolerância a fungicidas (AFIFY et alii, 1969) e à antibióticos bem como diferente grau de sensibilidade à antagonistas também tem sido propostas. Vários pesquisadores têm estudado a ecologia do Rhizobium em vida livre como um componente do ecossistema do solo, (BERGENSEN, 1970; CHATEL e PARKER, 1972; CROZAT et alii, 1982). Isto têm proporcionado informações valiosas sobre o efeito de fatores ambientais no crescimento, na persistência e na distribuição do Rhizobium no solo.

2.2.1.1. Temperatura

A habilidade do Rhizobium em induzir nodulações nas raízes da planta hospedeira, ocasionalmente desaparece durante a cultura da bactéria num meio nutritivo. Estudos recentes sobre genética de Rhizobium sugerem que

alguns dos plasmídeos são essenciais à habilidade indutora de nódulos do Rhizobium (HOOYKAAS et alii, 1981; ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1979). Incubações de células a altas temperaturas (CASSE et alii, 1979; ZURKOWSKI e LORKIEWICZ, 1978), causam a perda da habilidade de induzir nodulação. Ambas as situações acima ocorrem com a concomitante perda de seus plasmídeos. A proporção de células que mantem a capacidade de nodulação (Nod⁺) pode mudar com o tempo na população de Rhizobium do solo. OZAWA et alii (1983) estudaram mutantes espontâneos de Bradyrhizobium japonicum resistentes à antibióticos e verificaram que após duas semanas de incubação à 40 °C, houve um declínio na capacidade de nodulação que aumentou com o período de incubação. Nenhuma colônia Nod⁺ foi observada após 20 dias de incubação.

DART et alii (1976) estudaram o efeito da temperatura na simbiose de algumas leguminosas tropicais e encontraram que em soja inoculada com três estirpes de Bradyrhizobium japonicum crescidas em temperaturas controladas de 21, 27 e 33 °C, durante o dia, apresentam pequena diferença na fixação de N₂ entre as estirpes à 21 °C, mas a 33 °C apenas uma apresentou nódulos ativos, embora baixa com atividade da nitrogenase fixando muito pouco nitrogênio. Com Cicer arietinum os mesmos autores encontraram atividade da nitrogenase entre 6 e 40 °C, sendo

maior a atividade entre 24 e 33 °C e muito baixa em altas temperaturas.

MUNNS et alii (1977) em estudos com alfafa em estufas com temperatura controlada verificaram que a 32 °C a redução de acetileno e a fixação de N₂ pelos nódulos diminuiu e é eliminada em exposições sucessivas a 36 °C ou com uma única exposição a 40 °C.

O tipo de solo é muito importante na sobrevivência do Rhizobium a altas temperaturas. MARSHALL e ROBERTS (1963) estudando Rhizobium trifolii verificaram que quando submetidos a aquecimento de 70 °C, todos morrem quando inoculados em areia cinza e amarela mas sobrevivem em areia vermelha e outros solos de textura mais pesada. Também foi estudado o efeito da incorporação de alguns aditivos tais como montmorilonita, elita ou hematita à areia cinza numa proporção de 5% do volume, que agiram como protetores do Rhizobium dos efeitos letais das altas temperaturas. Caolinita e goitita não produziram efeitos de proteção.

LEE & DOBEREINER (1982) estudaram a tolerância a temperaturas elevadas de 17 estirpes de Rhizobium sp em meio de cultura e na associação simbiótica com Macroptilium atropurpureum. As plantas foram expostas a diferentes temperaturas durante seis horas por dia e durante a incubação com C₂H₂. Diferenças significativas foram observadas entre as estirpes sendo que cinco delas foram

capazes de crescer à 40 °C. O crescimento do Rhizobium em meio de cultura sólido ou líquido não correspondeu ao comportamento das diferentes estirpes em associação com planta. Uma estirpe que mostrou crescimento mais rápido em meio líquido à 40 °C apresentou atividade da N ase decrescente com aumento da temperatura a partir de 28 °C. Outra estirpe que também cresceu até 40 °C em meio de cultura, não teve sua nitrogenase afetada por temperaturas crescentes de 28 a 40 °C. As estirpes sensíveis a temperaturas elevadas mostraram atividade de nitrogenase máxima à 32 °C. Todas as estirpes de Rhizobium sp testadas foram capazes de nódular e de fixar N_2 (reduzir C_2H_2) a 40 °C.

DAY et alii (1978) relataram que algumas estirpes de Rhizobium do grupo caupi sobrevivem na semente à 45 °C por três dias, enquanto que outras estirpes sobrevivem muito pouco à 42 °C e não sobrevivem à 45 °C. WILKINS (1967) encontrou que estirpes isoladas de uma área seca com temperaturas elevadas sobrevivem melhor à altas temperaturas do que as estirpes isoladas de regiões frias. A sobrevivência de Rhizobium sp na semente (HERRIDGE e ROUGHLEY, 1974) e em inoculantes (WILSON e TRANG, 1980) foi melhor à 25 °C do que à 35 °C ou superiores.

Alguns pesquisadores (MARSHALL, 1964; CHATEL e PARKER, 1972; BUSHBY e MARSHALL, 1976; PHILPOTS, 1977)

verificaram que Rhizobium de crescimento lento são comparativamente mais resistentes à altas temperaturas do solo do que R. leguminosarum bv trifolii e R. meliloti. BOONKERD e WEAVER (1982) testaram a sobrevivência de Rhizobium sp em solos não estéreis (25 e 35 C) e em solos estéreis (40 C), e as populações foram avaliadas periodicamente por 45 dias e concluíram que acima de 35 C a temperatura é detrimental a sobrevivência.

Podemos verificar que a temperatura pode influenciar sobremaneira na associação Rhizobium/leguminosa. Tanto a baixa como a alta temperatura são detrimenais ao sistema simbiótico e ao crescimento dos simbioss independentemente (GIBSON, 1977; PARKER et alii, 1977). Em áreas tropicais, as altas temperaturas podem afetar tanto as raízes como a parte aérea das plantas e tem sido sugerido que a temperatura da raiz é mais crítica que a da parte aérea para a simbiose (GIBSON, 1976) e como consequência o teor de N e a produção de biomassa diminuem.

2.2.1.2. Antagonismo

As falhas de nodulação em leguminosas inoculadas em campo podem ser consequência de antagonismo microbiológico no solo (CHOWDHURY, 1977; SAITO et alii, 1985). A inibição de crescimento de Rhizobium "in vitro" por bactérias, fungos e actinomicetos isolados do solo ou da

rizosfera de plantas tem sido constatada (THORNTON et alii, 1949; PATEL, 1974; FOO e VERMA, 1976; PUGASHETTI et alii, 1982). Deve-se ter precauções em extrapolar estudos "in vitro" para situações de campo (TRINICK e PARKER, 1982; TRINICK et alii, 1983). Existe pouca informação de que a inoculação no solo com vários fungos ou actinomicetos tenha reduzido a nodulação e a fixação de nitrogênio em leguminosas (ROBISON, 1945; CHHONKAR e SUBBA RAO, 1966; DAMIRGI e JOHNSON, 1966; ANGLE et alii, 1981).

Algumas evidências sugerem que a inibição pode ser devida a produção de antibióticos "in situ" no solo (HOLLAND & PARKER, 1966; CHATEL & PARKER, 1972). HELY et alii (1957) encontraram uma nodulação muito fraca numa cultura de trevo recém introduzida na Austrália, que foi melhorada com a adição de carvão ao solo, que presumivelmente absorvia a substância antibiótica inibitória.

Estirpes de Rhizobium trifolii variam em sua habilidade para se estabelecer no solo (CHATEL e GREENWOOD, 1973) e as características que governam esse comportamento provavelmente são complexas, mas CHATEL e PARKER (1972) demonstraram ocorrência ocasional de substâncias tóxicas ao Rhizobium em solos que apresentavam problemas de colonização e sugerem que essas toxinas são de origem microbiológica e que podem explicar as diferenças no estabelecimento por

diferentes tipos de Rhizobium.

VINCENT (1977) e TRINICK (1981) verificaram antagonismo em culturas de laboratório entre Rhizobium e fungos, bactérias, actinomicetos, protozoários, mixobactérias e Rodelliovibrio, e consideraram que a predação, mudança de pH, competição por metabólitos limitantes, produção de toxinas e antibióticos também são considerados fatores determinantes na colonização do solo.

Os actinomicetos estão presentes em grande número na rizosfera das leguminosas e são conhecidos como forte inibidores (CHOUDHURY, 1977; PANTHIER et alii, 1979; PUGASHETTI et alii, 1982) da nodulação e da produção de grãos (DAMIRGI e JOHNSON, 1966; VINCENT, 1977). Alguns fungos podem ocorrer na superfície dos nódulos podendo afetar seu desenvolvimento e a fixação de nitrogênio pelos bacteróides no estágio de pós infecção (SETHI e SUBBA RAO, 1968). Pesquisadores revelaram que certos actinomicetos isolados da superfície de nódulos de Vigna mungo (L.) (Hepper) inibiram estirpes de Rhizobium de crescimento lento e rápido do grupo caupi e Bradyrhizobium japonicum formando zonas de inibição entre 3.0 e 17.0 mm de diâmetro dependendo da estirpe (SUBBA RAO, 1977; WAKSMAN e RAILLY, 1945).

Em experimentos de inoculação com Rhizobium no campo é muito importante a posterior identificação da estirpe inoculada entre as estirpes da população nativa e o

reconhecimento das estirpes responsáveis pela nodulação.

Técnicas sorológicas têm sido usadas extensivamente para identificação de estirpes de Rhizobium (VINCENT, 1941; 1970). Essa técnica pode ser muito sensível (KISHINEVSKY e BAR-JOSEPH, 1978) e tem sido usada para monitorar o sucesso da estirpe introduzida e para demonstrar que a população natural de Rhizobium pode ser heterogênea (JOSEY et alii, 1979). Todavia, o uso da serologia é restrito para um número limitado de serotipos, além das possíveis reações cruzadas entre estirpes de Rhizobium (GRAHAM, 1963a) e pelo fato da preparação do antisoro específico para um grande número de estirpes torna esse um processo praticamente inviável.

Uma outra maneira de identificação envolve marcadores de resistência à altas concentrações de antibióticos (SCHWINGHAMER e DUDMAN, 1973), que tem a vantagem de facilitar o isolamento e o reconhecimento das estirpes do inoculante, dos nódulos e também do solo, mas esses marcadores genéticos podem alterar a capacidade simbiótica quando comparada com a estirpe selvagem (PANKHURST, 1977; JONES e BROMFIELD, 1978), ou mesmo produzir uma perda completa de eficiência (PANKHURST, 1977). Essa técnica dá muito pouca informação em relação à população selvagens de Rhizobium, para verificar a percentagem dos nódulos que foram formados por outras

estirpes que não as do inoculante.

Após a seleção de uma estirpe quanto a resistência a antibióticos existem resultados contraditórios. BROMFIELD e JONES (1979) e JONES e BROMFIELD (1978) verificaram que mutantes de R. trifolii isolados com baixo nível de antibiótico formaram significativamente menos nódulos que seus pais. AMARGER (1981) verificou que não houve perdas na habilidade competitiva em estirpes de R. meliloti resistentes a altos níveis de antibióticos quando comparadas diretamente com seus originais. FONSECA et alii (1985) verificaram uma vantagem nos mutantes resistentes a estreptomicina em Rhizobium.

Quando TURCO et alii (1986) estudaram trinta isolados de R. leguminosarum e três de Bradyrhizobium japonicum com duas marcas de resistência à antibióticos, para eficiência de fixação de N e competitividade, verificaram que 93% dos mutantes isolados foram menos competitivos quanto à formação de nódulos quando comparados com as originais.

Em laboratório, PINTO et alii (1974) usaram a resistência natural a kanamicina de 2 mg/l e estreptomicina a 1,5 mg/l para distinguir estirpes de R. meliloti, e GRAHAM (1963b) mostrou que estirpes de algumas espécies de Rhizobium têm resistências variadas a baixas concentrações para um grande número de antibióticos. MAHLER e BEZDICEK

(1978) verificaram que isolados de uma população natural de R. leguminosarum exibiam variações em suas respostas à altas concentrações de alguns antibióticos selecionados.

BEYNON e JOSEY (1980) estudaram duas estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli das quais uma era resistente a altas concentrações de estreptomicina, inoculadas no campo em feijão (Phaseolus vulgaris). As bactérias foram isoladas dos nódulos e caracterizadas usando a resistência intrínseca à baixas concentrações de sete antibióticos. As estirpes do inoculante foram a minoria isolada dos nódulos e a característica de resistência à altas concentrações de estreptomicina foi usada para confirmar a identificação. Os resultados mostraram uma população natural de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli muito heterogênea com 54 padrões diferentes de resistência.

SCOTTI et alii (1982) verificaram que a calagem aumentou a resistência de estirpes de Rhizobium isolados de Stylosanthes do cerrado. Para o cultivo de soja nessa região é necessário a adição de grandes quantidades de calcário e também uma inoculação bem pesada com as estirpes 29W e 587, senão o resultado será uma nodulação fraca e com baixa produtividade (VARGAS e SUHET, 1980). Essas duas estirpes (29W e 587) são resistentes a 80 e 160 µg/ml de estreptomicina respectivamente, enquanto que outras estirpes, inefetivas no cerrado são mais sensíveis a esse

antibiótico.

Esses mesmos autores verificaram que a calagem em solos virgens provoca um acréscimo na população de actinomicetos, causando inibição da nodulação em soja pelas estirpes sensíveis a estreptomicina.

Num estudo sobre o efeito da calagem na produção de feijão Phaseolus vulgaris (RAMOS e BODDEY, 1987) verificaram que a adição de calcário aumenta a nodulação mas diminui a proporção de nódulos formados pela estirpe do inoculante (C-05).

Fizeram também uma investigação para determinar a tolerância de crescimento em meio de cultura ácido (pH 4.6) e a alguns antibióticos com Rhizobium isolados de plantas de Phaseolus vulgaris que cresceram em locais com e sem calagem e verificaram que os rizóbios isolados foram identificados como C-05, usando imunodifusão, e se mostraram idênticos à mãe em sua tolerância à acidez e resistência a sete antibióticos. Estirpes nativas isoladas de solo sem calagem se mostraram mais tolerantes às condições de acidez e menos tolerantes à cloranfenicol e kanamicina.

Os resultados encontrados por esses autores confirmaram as avaliações "in vitro" de tolerância à acidez que reflete na habilidade da estirpe de Rhizobium nodular leguminosas crescendo em condições de solo ácido. Essa significativa produção de antibiótico que ocorre no sistema

planta-solo é considerada como uma explicação para as diferentes resistências à antibióticos encontrados entre estirpes nativas isoladas de solo com e sem calagem.

Na cultura de leguminosas o inoculante é comumente usado junto com um ou mais pesticidas para combater doenças de plantas, insetos e outros problemas. Alguns pesticidas causam efeitos adversos em Rhizobium (FAIZAH et alii, 1980; MALLIK e TESFAI, 1983; TU, 1980). Thiram, PCNB e PCNB + tetrazole aplicado em sementes de caupi (Vigna unguiculata), inoculadas com turfa apresentaram queda na nodulação, em condições semelhantes carboxin, maneb e dicloran + captafol (50 + 50) reduziram severamente a nodulação (STAPHORST e STRIJDON, 1976). CHAMBERS e MONTES (1982) verificaram que captan e thiram afetaram adversamente a nodulação de plantas de soja inoculadas com turfa, mas PCNB e Benomyl foram relativamente inofensivos. Carboxin, oxicarboxin e tridemorph, aplicados em altas concentrações reduziram a atividade da nitrogenase (redução de C_2H_2) em trevo branco (Trifolium repens), mas isso não aconteceu com concentrações recomendadas.

MALLIK e TESFAI (1985) verificaram uma relativa compatibilidade de alguns pesticidas selecionados em dois níveis de aplicação (o recomendado e cinco ou 10 vezes o nível recomendado) na simbiose soja-Rhizobium.

A resistência a fungicidas tem sido indicada

como atributo ecológico importante para incluir nas estirpes dos inoculantes (BROCKWELL, 1981). Indiretamente permitiria aplicar produtos químicos na semente em contato com o inóculo que além de controlar patógenos e permitir plantas mais saudáveis, controlariam a microflora rizosférica antagonista ao Rhizobium, principalmente protozoários, ativos predadores (HOSSAIN e ALEXANDER, 1984). ODEYEMI e ALEXANDER (1977) desenvolveram uma técnica para obtenção de estirpes resistentes à fungicidas utilizadas amplamente em Rhizobium leguminosarum bv phaseoli e Bradyrhizobium japonicum e outras espécies. Foi verificado comportamento diferencial dentro de espécies bem como entre estirpes dentro de uma mesma espécie de R. leguminosarum bv phaseoli (PEREIRA, 1983).

Existe um vasto número de publicações que se referem ao efeito de fungicidas no Rhizobium. Resumidamente dependendo da estirpe e da concentração de produto, captan é considerado em geral como o mais tóxico (GRAHAM et alii, 1980) seguido por thiram e PCNB. Benomyl seria o menos inibitório (FAIZAH et alii, 1980) com efeito intra específico. Rhizobium leguminosarum bv phaseoli apresenta certa tolerância intrínseca ao benomyl, sendo sensível ao captan e totalmente inibido pelo thiram (HABTE, 1985).

2.2.2. O substrato

A população microbiana de um solo é influenciada ecologicamente por diversos fatores que a fazem variar qualitativa e quantitativamente. A quantidade de matéria orgânica e sua qualidade, num solo, influencia diretamente a população microbiana, quanto maior quantidade, maior sua população microbiológica (VAN SCHREVEAN, 1970).

Materiais ricos em matéria orgânica, tais como turfa, são largamente empregados como veículos para inoculantes de Rhizobium. Cultivos líquidos de Rhizobium são introduzidos no substrato seco, multiplicando-se por um período de tempo e posteriormente apresentando um declínio no número de células viáveis (VINCENT, 1974; ROUGHLEY et alii, 1976 e SCOTTI et alii, 1982).

A turfa é o principal substrato usado como veículo de Rhizobium na produção de inoculantes comerciais. É um solo orgânico, muito rico que possui intensa atividade microbiológica (RANDRUP, 1980). As interações que o Rhizobium pode sofrer neste meio são muito mais acentuadas que no solo, quando a turfa não sofre tratamento prévio de esterilização.

No Brasil a produção industrial de inoculantes de Rhizobium é feita com turfa seca ao ar, finalmente moída, que passa no máximo por um pré aquecimento

à 80 °C por curto tempo (VIDOR et alii, 1979).

Os fungos e actinomicetos são organismos altamente resistentes à tratamentos térmicos e podem predominar na turfa semiesterilizada tendo a capacidade de esporulação (STRIDJON e RENSBURG, 1981), e o Rhizobium sobrevive diferentemente em diferentes turfas (DATE e ROUGHLEY, 1977).

A baixa sobrevivência de Rhizobium nas turfas comerciais não estéréis pode ser atribuída às próprias estirpes (LOPES e GIARDINI, 1977; MORETTI e SAITO, 1978) que não possuem capacidade competitiva frente aos microrganismos habitantes das turfas com relação ao uso de nutrientes disponíveis, ou pela sensibilidade aos antibióticos produzidos, ou ao tipo de turfa (SAITO et alii, 1985) e também fatores relacionados com o manejo de inoculantes durante o armazenamento e distribuição, em temperaturas elevadas e perdas de umidade (SOMASEGARAN et alii, 1984).

A turfa comercial brasileira tem teores consideravelmente baixos de matéria orgânica mas com uma intensa atividade microbiológica. Têm sido determinados valores de 8×10^4 até 5×10^8 actinomicetos por grama de turfa, principalmente do gênero streptomyces e protozoários do tipo das amebas (5×10^4 /g), flagelados (1×10^3 /g) e cistos 10^5 /g de turfa (FONSECA et alii, 1985). Esses microrganismos por seus efeitos antagônicos e predadores têm

sido sugeridos como os responsáveis pela redução do número de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli e Bradyrhizobium japonicum nos inoculantes (MORETTI e SAITO, 1978; FONSECA et alii, 1985).

2.2.2.1. Qualidade

As falhas na nodulação de leguminosas após inoculação podem ser atribuídas a um alto nível de N no solo ou a presença de um grande número de populações nativas de Rhizobium. As vezes o caso não é bem esse e a baixa resposta a inoculação pode ser devida ao número inadequado de células de rizóbios e/ou a baixa sobrevivência da bactéria no solo durante o período entre a inoculação e a nodulação propriamente dita.

Um dos problemas da inoculação é que precisa ser estudado é como assegurar um número adequado de células viáveis para produzir uma boa nodulação. Inoculantes para feijão contêm um grande número de células de uma estirpe efetiva de R. leguminosarum bv phaseoli e o veículo tem que promover proteção às células nos períodos críticos desta inoculação até a nodulação (BONNIER, 1960).

Existem materiais que podem servir como suportes alternativos de inoculantes e devem ser avaliados assim como as turfeiras por que de acordo com RANDRUP (1981) ainda não existe um critério definido sobre quais os

parâmetros físico-químico-biológicos, que podem ser usados para avaliar ou comparar diferentes materiais, a serem utilizados como suporte de inoculantes para leguminosas.

SPARROW e HAM (1983) estudaram alguns materiais como possíveis substitutos de turfa, comparando o potencial do suporte para Rhizobium leguminosarum bv phaseoli e sua habilidade em condições de campo em fornecer rizóbios viáveis para promover nodulação, fixação de N e aumento de produção de sementes em "navybeans". Também tentaram determinar a dose ótima de inoculante de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli para promover nodulação, fixação de N e aumento na produção de sementes em dois tipos de solo.² Verificaram que no primeiro ano, para a maioria dos parâmetros avaliados foi necessário uma inoculação de no mínimo $10^5 - 10^6$ células para um aumento estatístico significativo com relação a menor taxa de células. No segundo ano, não houve efeito da inoculação no solo com uma população relativamente alta de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli (10^4 cel/g solo) e com o teor de N mineral relativamente alto (30 ppm). No solo com uma população nativa menor 10 cel/g de solo e teor de N mineral em torno de 8 ppm, os inoculantes em turfa e carvão resultaram em maiores produções de grãos, número de nódulos, peso e redução de acetileno. Palha de amendoim e sabugo de milho deram as piores respostas, indicando que turfa, carvão e

vermiculita podem ser usados com sucesso como veículos para produção de inoculantes, enquanto que outros mostraram respostas insatisfatórias.

Quando um solo mineral foi usado como veículo para inoculantes de leguminosas por CHAO e ALEXANDER (1984) utilizando estirpes de R. meliloti e R. leguminosarum bv phaseoli verificaram que as estirpes sobreviveram melhor à 4 C^o do que em altas temperaturas e apenas 15% das células permaneceram viáveis à 35 C^o após 27 dias. Quando inocularam em solo estirpes de R. meliloti, R. leguminosarum bv phaseoli, Bradyrhizobium japonicum e Bradyrhizobium sp e revestiram as sementes de seus respectivos hospedeiros, verificaram que também sobreviveram melhor em baixas temperaturas, mais a porcentagem de sobrevivência de qualquer desses inoculantes foi maior do que em turfa incubada à 35 C^o.

Condições de calor e falta de umidade são frequentes em regiões tropicais e sub-tropicais durante o período adequado para o plantio de leguminosas de grãos e forrageiras. Estes fatores são altamente detrimenais à sobrevivência do rizóbio em sementes inoculadas (BURTON, 1964; VINCENT, 1965). Ocorre uma baixa sobrevivência de Rhizobium quando inoculante à base de turfa são aplicados em sementes que são expostas à condições de calor e seca após o plantio, podendo até resultar em falha da inoculação

repercutindo na colheita (HOLLAND e STREET, 1969; SCUDDER, 1975). Altas temperaturas do solo diminui a sobrevivência dos rizóbios em sementes inoculadas impedindo a subsequente nodulação (BOWEN e KENNEDY, 1959; BROCKWELL e PHILLIPS, 1970).

Alguns trabalhos têm sido conduzidos com inoculantes a base de turfa sob várias temperaturas e umidades. Quando o inoculante é aplicado junto com açúcar ou goma arábica ocorre um aumento na longevidade dos rizóbios das sementes quando estocados à temperaturas menores que 30 °C (BROCKWELL, 1962; BURTON, 1964, 1975; DATE, 1970; SIMS et alii, 1974), a pelitização das sementes com calcário ou outros materiais frequentemente promove a sobrevivência dos rizóbios quando expostos à condições de calor e seca (BROCKWELL e PHILLIPS, 1970; BROCKWELL e WHALLEY, 1970). Todavia alguns trabalhos mostram que a pelitização de sementes nem sempre promove sobrevivência e nodulação (RADCLIFFE et alii, 1967; SIMS et alii, 1974).

Um dos fatores importantes a ser considerado antes do suporte ser selecionado é a origem e a caracterização do material, e a escolha deve levar em consideração a análise química e os resultados de estudos de sobrevivência - multiplicação do Rhizobium (BURTON, 1965; ROUGHLEY e VINCENT, 1967; ROUGHLEY, 1970). Existem marcadas diferenças na composição química e nas propriedades físicas

das turfas que vêm sendo usadas com sucesso na produção de inoculantes, assim como turfa com composição semelhante mas com resultados de crescimento e sobrevivência da bactéria bem diferentes (ROUGHLEY E VINCENT, 1967; VAN SCHREVEN, 1970).

A maioria das turfas no seu estado natural apresentam um pH baixo e portanto requerem a adição de um agente neutralizante. Estudos na Colômbia mostraram que turfas extremamente ácidas mas com o pH ajustado a 6.5 proporcionaram uma boa sobrevivência do Rhizobium em temperaturas de 28 C ou menores, quando expostos à 37 C a população caiu para 10⁶ /g em duas semanas e apenas uma turfa, com pH antes da correção entre 5.1-5.3, após adição de carbonato de cálcio mostrou sobrevivência adequada por mais de sete semanas à 37 C (STRIDJOM e DESCHODT, 1976).

É necessário que o teor de umidade da turfa seja reduzido suficientemente para que após a adição do inóculo, a umidade atinja um nível ideal (HEDLIN e NEWTON, 1948; VAN SCHREVEN et alii, 1954; ROUGHLEY e VINCENT, 1967). Um teor de umidade final ideal parece ser em torno de 40-55%. Para a maioria das turfas (GUNNING e JORDAN, 1954; VAN SCHREVEN, 1958, 1963, 1970 e BURTON 1967) encontrou-se boa sobrevivência em 35-40% de umidade.

O Rhizobium em turfa não estéril pode ser mais sensível a altos níveis de umidade do que em turfa

estéril (ROUGHLEY e VINCENT, 1967; VINCENT, 1968; DATE, 1960; ROUGHLEY, 1968, 1970). Com 40-50% de umidade das turfas não estêreis apresentam bons resultados, teores menores que 30% e maiores que 60% proporcionaram sobrevivência inadequada. Com turfas estêreis ROUGHLEY (1968, 1970) recomenda um teor de umidade próximo a 60%.

O material do qual as embalagens dos inoculantes são feitas é muito importante tendo as propriedades de troca gasosa e de retenção de umidade, podendo exercer efeito marcante na qualidade do inoculante. O polietileno é o mais utilizado (BURTON, 1965; ROUGHLEY, 1970 e ISWARAN, 1971).

A aeração é necessária para a sobrevivência satisfatória do Rhizobium na turfa embora seja requerido uma pequena quantidade. Foram feitos estudos com R. loti, R. leguminosarum bv trifolii, Bradyrhizobium japonicum e Bradyrhizobium sp em turfa esterilizada em embalagens de polypropileno de alta densidade com 0.31-0.32 mm de espessura. Após 150 dias de armazenagem à 27 °C o número de células/g variou entre 3.5×10^8 e 62×10^8 (STRIDJOM e DESCHODT, 1976).

2.2.2.2. Esterilização

A maioria dos inoculantes ainda são produzidos com turfas não estêreis ou parcialmente

esterilizadas, e assim mesmo, alguns são de alta qualidade (BURTON, 1967; VINCENT, 1968) portanto os produtores de inoculantes não acham vantagem na esterilização, causando dificuldade e tornando o processo mais caro com a inoculação asséptica da turfa esterilizada em pacotes, e infelizmente essa boa resposta não é encontrada para muitos dos inoculantes. Uma rápida perda da viabilidade do Rhizobium em turfa não estéril estocada à 35 °C foi verificada por VINCENT (1958), ROUGHLEY e VINCENT (1967) e ROUGHLEY (1968), especialmente se o teor de umidade for inferior a 30% ou superior a 60%. A sobrevivência em turfas estéreis não foi afetada por temperaturas acima de 26 °C assim como altos teores de umidade não foram detrimen^otais à sobrevivência.

Vapor é o meio mais comum e mais utilizado para a esterilização de substratos. O tempo de esterilização e temperaturas variam de 1 a 4 horas à 120 °C ou 3 horas à 125 °C (NEWBOULD, 1951; VAN SCHREVEN, 1958, 1963, 1970; ROUGHLEY e VINCENT, 1967; ISWARAN, 1972). A produção de inoculantes em larga escala, a natureza da turfa, a quantidade em cada embalagem, o número de pacotes e seu arranjo na autoclave podem interferir no tempo necessário para obter uma esterilização completa.

Pesquisadores australianos verificaram que tratamentos da turfa com calor excessivo foram detrimen^otais ao crescimento e sobrevivência do Rhizobium (ROUGHLEY e

VINCENT, 1967). Houve efeito deletério sobre o Rhizobium provocado pela exposição durante uma noite de duas turfas da África do Sul à 160 °C antes da inoculação com calor seco, respostas inversas foram encontradas quando a turfa foi esterilizada em autoclave por 4 horas à 121 °C.

A irradiação com microondas é um tratamento eficiente para solo com efeito biocida eficiente contra nematóides e microrganismos (DIPROSE et alii, 1978; FERRIS, 1984). O efeito sobre os microrganismos é provavelmente devido ao calor (VELA e WU, 1979). Em condições controladas é possível selecionar e programar a morte dos microrganismos e contagens em placas indicam que os fungos são mais sensíveis que as bactérias às radiações de microondas (DIPROSE et alii, 1978; WAINCURIHGT et alii, 1980). Ainda não existem muitos estudos sobre o efeito de microondas na biomassa microbiana total do solo ou na concentração de nutrientes extratíveis. SPEIR et alii (1986) em condições experimentais verificaram que as amostras de solo irradiadas por 60 segundos, mostraram morte microbiana semelhante à provocada por fumigação com CHCl_3 . A extração de N mineral aumentou depois da incubação do solo irradiado e imediatamente após irradiação foi um pouco menor do que no solo fumigado. Em tempos intermediários de irradiação, o aumento de N mineral extraído foi caracterizado como de origem microbiana. Não foi possível determinar o teor de P

microbiano no solo irradiado devido a desnaturação pelo calor das enzimas intracelulares, proporcionando um resultado consideravelmente menor do que o esperado.

O efeito de tratamentos gasosos de turfa na subsequente sobrevivência do Rhizobium em inoculantes foi estudado por STRIJDOM e DESCHODT (1976) com duas turfas da África do Sul. A sobrevivência de R. meliloti estirpe U45 foi comparado em turfa esterilizada por duas horas à 121 °C e tratada com etox (90% de óxido de etileno + 10% CO₂) em concentrações de 500, 750 e 1000 mg/l, por períodos de 8 e 16 horas. Uma característica comum de todas as turfas tratadas com etox foi um decréscimo marcante no número de rizóbios imediatamente após a inoculação, com um subsequente acréscimo na maioria dos tratamentos após 30 dias. Logo após a inoculação não houve a presença de contaminantes o que ocorreu na avaliação dos 30 dias. Com o tempo houve um aumento no número dos contaminantes e uma diminuição do número de Rhizobium e aos 180 dias os números eram aproximadamente iguais. Em experimentos subsequentes foi demonstrado que tanto a estirpe U45 de R. meliloti como a CB756 de Bradyrhizobium sp estavam consistentemente presentes em altos números em turfas esterilizadas em autoclave e só às vezes estavam presentes nas turfas tratadas com etox (1000 mg/l por 8 horas) após um período de 180 dias.

Análises cromatográficas de amostras de gás de turfas tratadas com óxido de etileno, mostraram que a concentração de etileno em nenhum estágio excedeu ao teor da turfa esterilizada em autoclave após os primeiros 26 dias. O decréscimo marcante no número de rizóbios nos primeiros 10 dias em experimentos de sobrevivência em turfas tratadas com etox não deve portanto ser atribuído ao óxido de etileno livre na turfa. As turfas apresentaram uma concentração média de 12 ug/g de etileno glicol, que não mudou significativamente nos primeiros 30 dias. Não foi formado propileno glicol em quantidades significantes nas turfas tratadas com etox.

Se excluirmos os tratamentos a quente a esterilização fica limitada a tratamentos gasosos ou por irradiação, mas nenhum deles é tão eficiente como o calor para a esterilização completa de um solo ou turfa como prática de rotina.

ROUGHLEY e VINCENT (1967) encontraram uma excelente sobrevivência de Rhizobium em turfas irradiadas com radiação gama numa dose de 5 Mrad, e este método é rotineiramente utilizado na Austrália. Todavia, a radiação gama não esteriliza a turfa completamente em práticas de rotina (VINCENT, 1968), alguns microrganismos são marcadamente resistentes a doses de 2.4 e 2.5 Mrad (ANELIS et alii, 1973).

De acordo com PARKER e VINCENT (1982) a radiação gama na dose de 5 Mrad tem algumas vantagens sobre o calor, mas existe muito pouco trabalho sobre os efeitos da radiação gama em turfa.

O efeito da radiação gama na sobrevivência dos microrganismos foi quantificado com uma população natural de dois tipos de turfa. Resultados para alguns tipos de microrganismos foram determinados separadamente por plaqueamento ou pelo método indireto de estimativas de probabilidades estatísticas. Foram utilizados frascos invertidos para doses altas para excluir qualquer possibilidade de contaminação após tratamento. Os microrganismos mais persistentes em doses intermediárias (2.5-3.5 Mrad) foi comumente um micrococcus, myxobacterias e algumas formas amebóides. Esses microrganismos persistiram devido a sua alta resistência à radiação e não devido ao numero inicial alto. Os microrganismos mais numerosos como bactérias, actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras foram totalmente destruídos. A dose recomendada de 5.0 Mrad para a produção comercial é baixa para alguns tipos de microrganismos resistentes, doses superiores podem provocar toxidez e também é muito difícil eliminar todas as possíveis contaminações após irradiação do inoculante comercial (PARKER e VINCENT, 1982).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção de estirpes de Rhizobium

3.1.1. Resistência a actinomicetos

Actinomicetos são fortes antagonistas de Rhizobium e estão presentes em grande número nas turfas brasileiras. Foram isoladas colônias de actinomicetos de pacotes de inoculantes especiais de alguns fabricantes nacionais em meio de Amido-Caseína-Agar. Os inoculantes estavam estocados em temperatura ambiente, com mais de 6 meses de estocagem.

O critério de seleção dos actinomicetos baseou-se em características morfológicas tais como cor e forma das colônias. Sendo escolhidas 78 colônias aparentemente diferentes, que foram isoladas em meio de Amido-Caseína-Agar.

As colônias de actinomicetos foram testadas contra duas estirpes de Rhizobium leguminosarum biovar

phaseoli pertencentes à Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA):

a) CM-01, original da Universidade de Minnesota (UMR-1899) com alta eficiência e capacidade competitiva, sobrevive bem em pH 4.5 e segundo BARAIBAR (1986) resistente a 50 µg/ml de Tetraciclina, a 1000 µg/ml de Cloranfenicol, a > 1000 µg/ml de Estreptomicina a 50 µg/ml de Eritromicina e a 2 µg/ml de Kanamicina, com alta resistência a fungicidas e não é produtora de bacteriocina;

b) CM-34, original da Seção de Microbiologia do Solo do CENA (C-05) com baixa eficiência e capacidade competitiva, não sobrevive em pH 4.5 e possui baixa resistência a antibióticos e de acordo com BARAIBAR (1986) é resistente a apenas 20 µg/ml de Tetraciclina, 2 µg/ml de Cloranfenicol, < 2 µg/ml de Estreptomicina, a 2 µg/ml de Eritromicina e < 2 µg/ml de Kanamicina. Possui baixa resistência a fungicidas e não é produtora de bacteriocina.

Das placas com os isolados de actinomicetos foram retirados discos de 5.0 mm de diâmetro e transferidos para placas em duplicatas inoculadas com uma população aproximada de ⁸ 10 células das duas estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli (PATEL, 1974). As placas foram inoculadas por oito dias a 28 °C após o qual foram medidos o diâmetro dos halos de inibição quando foram formados.

3.1.2. Resistência a temperaturas elevadas

Visando obter mutantes resistentes a temperaturas altas foram testados métodos para obtenção de melhores resultados. O primeiro utilizou períodos intermitentes de alta temperatura, com nove choques de meia hora à 38 °C, a partir de 48 horas de crescimento à 28 °C e o segundo, longos períodos de exposição à temperaturas elevadas.

Para esses testes foram utilizadas as duas estirpes já descritas no experimento anterior, a CM-01 e a CM-34.

a) Choque térmico: em Erlenmeyers com 30 ml de YMB foi inoculado um ml de cultura de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli com aproximadamente 10^9 células/ml e deixadas para crescer por dois dias em agitador à temperatura ambiente (28 °C). No terceiro dia, as culturas foram divididas em tubos de ensaio com 10 ml cada um (asépticamente). Esses tubos foram colocados em banho maria à 38 °C com agitação por 30 minutos, transferidos para o agitador à temperatura ambiente por 30 minutos e novamente em Banho Maria à 38 °C por 30 minutos e assim sucessivamente até completar quatro horas e meia de exposição à alta temperatura, resultando em nove choques sucessivos.

Após cada choque de alta temperatura foi retirado uma amostra para verificação do número de sobreviventes pelo método de diluição em placas (SOMASEGARAM e HOBEN, 1985);

b) Tratamentos térmicos de 38 °C: as estirpes CM-01 e CM-34 foram submetidas a quatro tipos de tratamentos durante seu período de crescimento até atingir aproximadamente 10^9 cel/ml.

Tratamento 1 - as culturas cresceram a 25 °C, constantemente em agitador climatizado (testemunha).

Tratamento 2 - as culturas cresceram em temperaturas alternadas de 38 °C/25 °C (16h/8h) correspondendo respectivamente a dia/noite.

Tratamento 3 - as culturas foram deixadas por duas horas a temperatura ambiente (28 °C) e transferidas para 38 °C em Banho Maria com agitação por seis horas e posteriormente igual ao tratamento 2.

Tratamento 4 - as culturas cresceram a 38 °C em Banho Maria com a agitação por 72 horas.

Após os três dias de crescimento foram feitos plaqueamentos de todos os tratamentos;

c) Tratamentos térmicos a 40 °C, 45 °C e 50 °C - um ml de cultura com 10^9 células/ml foi transferido para Erlenmeyer

de 250 ml com 30 ml de YMB e crescidas primeiramente a 40 °C em agitador climatizado por 3 dias. No terceiro dia foi feito plaqueamento para verificar o número de sobreviventes e se havia ocorrido alterações morfológicas nas colônias. Esse mesmo procedimento foi feito com temperaturas de 45 °C e 50 °C;

d) Perfil plasmidial de bactérias - algumas das populações sobreviventes aos tratamentos térmicos foram avaliadas de acordo com o mini-screen de KADO e LIU (1981), para verificação de cura de plasmídeos.

Cultura	Característica
1. CM-01 - 25 °C	colônia normal
2. CM-01 - 28 °C	colônia normal
3. CM-01 - 38 °C	colônia normal
4. CM-01 - 38 °C	colônia vermelha rugosa
5. CM-01 - 38 °C	colônia menor branca
6. CM-01 - 40 °C	colônia rósea grande
7. CM-01 - 40 °C	colônia vermelha disforme
8. CM-01 - 40 °C	colônia branca média
9. CM-01 - 40 °C	colônia branca menor

De uma cultura de 10^9 células/ml, 200 µl foram centrifugados por um minuto em centrifuga Eppendorf. O

precipitado foi ressuspendido em 100 μ l de Tampão Tris-EDTA pH 7,9 em agitador. Foi adicionado em cada tubo 250 μ l da solução de lise e agitado cada tubo 10 vezes com muito cuidado, a seguir foram incubados a 55 °C por 90 minutos em Banho Maria. Retirados do banho e adicionados 400 μ l de phenol/clorofôrmio (1/1) e invertidos cada tubo 100 vezes, centrifugados por 3 minutos. Após centrifugação deve-se formar uma interfase distinta. Sem desmanchar a interfase, foi removida a fase aquosa superior. Estas amostras de DNA podem ser estocadas à 4 °C por diversos dias antes da eletroforese.

Para a eletroforese foi utilizado gel de agarose 0,7% horizontal com amostras de 10 μ l, colorida com bromocresol purple, antes de serem aplicadas nas canaletas. As corridas demoraram em média duas horas com 100 V e 135 mA. e foram feitas nos Laboratórios da Seção de Proteínas de Sementes.

3.1.3. Resistência a antibióticos

As nove culturas utilizadas nos testes de eletroforese foram também testadas quanto sua resistência natural a cinco antibióticos citados na Tabela 1, juntamente com a formulação química, modo de ação e fabricante. O método utilizado foi baseado em SOMASEGARAN e HOBEN (1985).

Tabela 1 - Formulação química, modo de ação e fabricante dos antibióticos utilizados.

Nome	Formulação	Modo de ação	Laboratório	Nome comercial
Cloranfenicol (Clo)	2-amino 1,3 propanodiol	interfere na síntese protéica	Carlo Erba	Guaiclitina
Eritromicina (Eri)	heterosídio macrolídico	interfere na síntese protéica	Lederle	Ilasone
Estreptomicina Sulfato (Str)	aminoglicosídeo aminociclitol	interfere na síntese protéica	Cinlab	Sulfato de Estreptomicina
Kanamicina (Kan)	aminoglicosídeo aminociclitol	interfere na síntese protéica	Bristol	Kantrax
Tetraciclina (Tcl)	hidrocarboneto aromático	interfere na síntese protéica	Pfizer	Tetraciclina

Tabela 2 - Antibióticos, concentração da solução estoque e concentração máxima testada.

Antibiótico	Conc. Sol. Estoque (mg/ml)	Conc. Máx. (µg/ml)
Cloranfenicol	100	1000
Eritromicina	10	100
Estreptomicina	100	1000
Kanamicina	0.5	5
Tetraciclina	5.0	50

Os antibióticos foram testados individualmente. A solução estoque foi preparada em 10 ml sendo que para cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina houve uma solubilização prévia em um ml de metanol. Foi utilizada a concentração máxima de resistência da estirpe CIAT-899 de acordo com BARAIBAR (1986).

3.1.4. Resistência a fungicidas

Quanto a resistência natural à fungicidas, as nove culturas também foram testadas utilizando-se os fungicidas citados na Tabela 3, juntamente com a formulação química e o fabricante.

A solução estoque dos fungicidas foi preparada em 100 ml, dissolvendo o produto primeiramente em metanol.

As concentrações e a porcentagem de princípio ativo dos produtos utilizados estão na Tabela 4.

3.2. Seleção do substrato

3.2.1. Caracterização química

Análises químicas de macronutrientes, micronutrientes e pH foram feitas em amostras de turfeiras localizadas estrategicamente no País, pelo Instituto de

Pesquisa Tecnológica (IPT), de alguns resíduos fornecidos por uma indústria nacional, para avaliação da possibilidade da adição desses materiais à turfa para melhorar suas características.

3.2.2. Caracterização física

Dentre as características físicas importantes que devem ser mensuradas em suportes de inoculantes estão a granulometria, que deve ser padronizada, devendo passar por peneira 200 mesh, e a capacidade de retenção hídrica. Outras características físicas geralmente determinadas para solos, em turfas ou substratos orgânicos são difíceis de serem determinadas, principalmente depois de moidos e peneirados, quando apresentam textura e estrutura totalmente modificados.

Os substratos foram avaliados quanto sua capacidade de retenção de água, de acordo com BRADY (1979) e KIEHL (1979) empregando-se diferentes pressões de trabalho em Câmara de Pressão.

3.2.3. Caracterização biológica

Foram feitas caracterização biológica de turfas, utilizando-se meios seletivos para bactérias, fungos, actinomicetos, protozoários e leveduras, de acordo com SAITO (1985).

Tabela 3 - Formulação química, fabricante e fungicidas utilizados.

Nome	Formulação	Laboratório
Thiram	bis (dimetil tiocarbonil dissulfido)	Rhodia
Benomyl	metil-1-2-benzimidazolecarbonato	Dupont
Captan	[N-(triclorometil)tio]-4 ciclohexa- no - 1, 2 - dicarboxidide	Hokko

Tabela 4 - Fungicidas, porcentagem de P.A e concentração da solução estoque utilizados do produto e concentração máxima.

Nome	% P.A.	concentração (mg/ml)	máxima (µg/ml)
Thiram	70	29	200
Benomyl	50	200	> 1000
Captan	75	27	200

As turfas foram coletadas pela Seção de Geologia do IPT, em pontos estratégicos do País, e também de algumas turfeiras de propriedade de firmas produtoras de inoculantes.

3.3. Qualidade do suporte

3.3.1. Sobrevivência no suporte

Onze substratos foram escolhidos para teste de sobrevivência da estirpe de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli CM-01. As misturas foram preparadas, corrigidas com 10% de CaCO_3 (DATE e ROUGHLEY, 1970) e esterilizadas com radiação gama numa dose de 5.0 Mrad utilizando-se a fonte de Cobalto Gammabeam 650 (Atomic Energy of Canada Ltd) do CENA (ROUGHLEY e VINCENT, 1967; DATE e ROUGHLEY, 1970). Os suportes foram então inoculados com uma cultura líquida de 10^9 células/ml num volume de 80% da capacidade máxima de retenção de água dos substratos, e após homogeneização manual foram incubados por 10 dias à 28°C e então transferidos para geladeira ($+5^\circ\text{C}$).

Foram feitas determinações periódicas de sobrevivência pelo método de diluições e plaqueamentos em meio YMA mais 100 ppm de estreptomicina e cloranfenicol nos períodos de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 90 dias, assim como a verificação de sobrevivência de possíveis contaminantes como

fungos, outras bactérias e actinomicetos, em meios específicos.

3.3.2. Eficiência em plantas

Os onze substratos foram também avaliados em plantas utilizando-se vasos de Leonard modificado (VINCENT, 1970) com vermiculita e areia (2:1). Os vasos receberam 800 ml de solução nutritiva de MCKNIGHT (1949) e foram esterilizados em autoclave à 121 °C por duas horas.

As sementes de Phaseolus vulgaris cv carioca, cedidas pelo CNPAF - EMBRAPA (Goiânia) foram escolhidas e esterilizadas em álcool e hipoclorito de sódio (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985) e lavadas em água esterilizada. Foram colocadas 4 sementes por vaso e após germinação foi feito o desbaste deixando duas plantas por vaso.

No mesmo dia do desbaste procedeu-se a inoculação com um ml da suspensão (1 g turfa/9 ml de solução salina) por planta.

Após inoculação foi colocado na superfície dos vasos uma camada de 2 mm de areia grossa lavada e esterilizada para proteger das possíveis contaminações.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 13 tratamentos sendo 11 substratos, um sem inoculação e sem N, e outro sem inoculação mas com 100 ppm

de N (NH_4^+ NO_3^-) por vaso com três repetições.

A colheita das plantas foi realizada aos 35 dias após inoculação separando-se as plantas em parte aérea, raízes e posteriormente nódulos para determinações de:

a) atividade da Nitrogenase; b) número de nódulos; c) peso da matéria seca da parte aérea; d) peso da matéria seca dos nódulos e e) N total da parte aérea.

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Efr} = \frac{\text{média N total planta inoculada}}{\text{média N total planta com N}} \times 100$$

adaptada da fórmula de BERGERSEN et alii (1971).

Para determinação da atividade da nitrogenase foi utilizado o método de redução de acetileno (ARA HARDY e KNIGHT, 1967) sendo as raízes incubadas em frascos de 500 ml com 90% de ar e 10% de acetileno por 10 minutos em temperatura ambiente, onde 0,5 ml do volume contido na amostra foram injetados no cromatógrafo a gás, tipo Beckman modelo GC-65 usando detector de chama de hidrogênio a 50 °C e coluna de vidro de 3,2 mm de diâmetro externo por 0,5 m de comprimento contendo Poropak N de 100-120 mesh a 110 °C. O gás carregador foi N_2 a um fluxo de 40 ml/min. O padrão de C_2H_2 foi preparado na concentração de 500 ppm.

Os cálculos para a determinação da atividade da nitrogenase foram realizados utilizando-se a fórmula:

$$CE = L \times A \times K \times R$$

onde

CE = concentração de etileno evoluido

L = leitura do pico (mm) da amostra

A = atenuação do pico

K = fator de correção das amostras

R = range do aparelho

O fator K foi calculado da seguinte maneira:

$$K = K' \times \frac{1}{t.\text{incubação}} \times \frac{1}{\text{vol. injetado}} \times \text{vol. incub.} \times \frac{1}{24}$$

sendo K' o fator de correção para o padrão de C_2H_4 que se calcula pela seguinte fórmula:

$$K' = \frac{\text{concentração de etileno}}{L \times A \times R}$$

onde:

L e A = leitura e atenuação do pico do padrão

R = range do aparelho

O volume do padrão injetado foi de 0.5 ml.

Após a determinação da atividade da nitrogenase os nódulos foram destacados das raízes e contados.

A parte aérea e as raízes sem os nódulos foram colocadas dentro de sacos de papel em estufa (65 - 70 °C) por 72 horas para determinação do peso da matéria seca. O N total foi avaliado pelo método semimicro Kjeldahl de acordo com SARRUGE e HAAG (1979) determinando-se a porcentagem de N total da matéria seca da parte aérea.

3.4. Substrato em temperatura elevada

3.4.1. Sobrevivência no suporte

Foi utilizado para teste de temperatura o substrato com a turfa de São José com 20% do composto vegetal MATR-24. As estirpes foram a CM-01, em condições normais (28 °C) e uma variante (isolado 6), retirada de colônias com aparências normais mas que conseguiram sobreviver após 72 horas à 40 °C e não perderam o plasmídeo e também a marca de resistência à antibióticos para verificar sua eficiência em plantas e também seu comportamento no substrato proposto.

Pacotes com o substrato foram irradiados a

5.0 Mrad e inoculados com um caldo de bactérias numa concentração de 10^9 cel/ml, num volume de 80% da capacidade máxima de retenção de água. Foram homogeneizados manualmente e incubados em duas temperaturas, 28°C e 38°C por dez dias e após conservados em geladeira.

Foram feitas avaliações periódicas aos 0, 10, 20 e 30 dias, verificando a sobrevivência do Rhizobium e dos possíveis contaminantes.

3.4.2. Eficiência em plantas

Aos 35 dias após a inoculação do substrato foi feito um teste em plantas para verificar a eficiência da população de Rhizobium sobrevivente nesse substrato nas duas temperaturas.

O teste em plantas foi feito em vasos Leonard conforme descrito no experimento anterior, avaliando-se os mesmos parâmetros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de estirpes de Rhizobium

4.1.1. Resistência à actinomicetos

Os 78 actinomicetos isolados das turfas de inoculantes comerciais vencidos, em sua maioria não se mostraram antagônicos contra as duas estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli testadas. A estirpe CM-34, apresentou sensibilidade a menos de 10% da população testada, mostrando halo de inibição apenas contra sete dos actinomicetos verificados, e mesmo assim, de acordo com a classificação de PATEL (1974) os halos formados estão entre os moderadamente antagônicos (> 15 mm e < 20 mm) e pouco antagônicos (< 15 mm). Nenhum dos actinomicetos testados formou halo de inibição contra a estirpe CM-01.

Os actinomicetos foram isolados de diferentes fontes e mostraram uma tendência de que a origem tinha certa responsabilidade no grau de antagonismo apresentado, pois a estirpe CM-34 só se mostrou sensível à actinomicetos isolados de duas turfas estudadas, e nenhuma sensibilidade

aos demais actinomicetos.

Esses dados revelam que sendo os actinomicetos fortes antagônicos do Rhizobium, como tem sido demonstrado por inúmeros autores (PATEL, 1974; CHOWDHURY, 1977; FONSECA et alii, 1985; SAITO et alii, 1985), a população presente nas turfas avaliadas não mostrou esse efeito de inibição contra as estirpes estudadas, podendo facilitar a produção industrial de inoculantes. Essas turfas podem ser utilizadas como suporte de inoculantes para o Rhizobium leguminosarum bv phaseoli, utilizando-se uma das estirpes estudadas, principalmente a CM-01, que se mostrou resistente a todos os actinomicetos avaliados.

Embora, a estirpe CM-34 tenha mostrado certa sensibilidade "in vitro", esses efeitos dificilmente são reproduzidos "in situ", tanto no solo, como em turfa, ou mesmo na nodulação promovida pelo Rhizobium no caso específico em feijoeiro (KOSSLACK e BOHLOOL, 1985; FONSECA et alii, 1985).

A Tabela 5 mostra os valores médios de quatro repetições do diâmetro dos halos de inibição formados.

Esses resultados estão de acordo com BARAIBAR (1986) em relação à estirpe CM-01 (1899) que não apresentou formação de nenhum halo de inibição. A estirpe CM-34 (C-05) nesse caso se mostrou resistente a 90% da população estudada

e BARAIBAR (1986) verificou que essa estirpe apresentou resistência a menos de 50% dos actinomicetos estudados.

Tabela 5 - Diâmetro de halos de inibição (mm) formados por actinomicetos contra duas estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli (média de 3 repetições)

Actinomiceto	Ø do halo de inibição (mm)	
	CM-34	CM-01
5	10	-
9	15	-
10	13	-
11	13	-
12	12	-
13	20	-
14	18	-

4.1.2. Resistência à temperaturas elevadas

A. Choque térmico

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais influencia a simbiose Rhizobium/leguminosa (GIBSON, 1971), principalmente a alta temperatura, que é comum em

áreas tropicais na época de cultura de leguminosas.

Foram efetuados choques térmicos durante o período de desenvolvimento do Rhizobium para se observar onde a temperatura se tornaria mais detrimental ao simbiote.

A Tabela 6 mostra o número de células sobreviventes após cada choque térmico, utilizando-se o método de plaqueamento. Pelos resultados podemos verificar que choques sucessivos de 30 minutos não causaram efeito no crescimento para as duas estirpes estudadas, pois não houve diminuição no número de células vivas após cada choque, e as culturas mantiveram seu crescimento praticamente inalterado.

MUNEVAR e WOLLUM II (1982) estudaram o comportamento de 42 estirpes de Bradyrhizobium japonicum quando crescidas em meio líquido em 19 temperaturas diferentes (27,4 °C a 54,1 °C) e verificaram que as estirpes revelaram grande diversidade da resposta de crescimento quando incubadas a diferentes temperaturas e a temperatura ótima variou de 27,4 °C a 35,2 °C e a temperatura máxima permissível variou de 29,8 °C a 38 °C e a máxima temperatura de sobrevivência variou de 33,7 °C a 48,7 °C.

As estirpes que se mostraram mais tolerantes à altas temperaturas foram 587, TAL 102, NC 1005, TAL 184 e NC 1033, e as estirpes mais sensíveis foram NC 1016, USDA 123, e 572.

Tabela 6 - Número de células sobreviventes após choques
sucessivos de 38 °C (média de 3 repetições).

Choque	Número de células/ml	
	CM-34	CM-01
0	3.2×10^8	2.7×10^8
1	2.5×10^8	2.7×10^8
2	2.9×10^8	3.2×10^8
3	3.4×10^9	2.4×10^9
4	4.0×10^9	3.2×10^9
5	3.6×10^9	2.4×10^9
6	1.0×10^9	1.0×10^9
7	5.0×10^9	5.0×10^9
8	1.0×10^9	2.0×10^9
9	1.0×10^9	1.0×10^9

Como a temperatura máxima permissível variou de 29,8 a 38 °C, essa última temperatura poderia interferir no crescimento das estirpes aqui testadas, o que aparentemente não aconteceu com os sucessivos choques.

GIBSON (1967) estudando o efeito do tempo de exposição de raízes de leguminosas a temperatura desfavoráveis, verificou que a quantidade de nitrogênio fixada foi controlada pela temperatura radicular e pela estirpe da bactéria. Em outro trabalho, notou que raízes de plantas, expostas a 30 °C por diferentes períodos não foram afetadas até uma exposição máxima de 24 horas. Quando os períodos foram maiores, houve decréscimo na taxa de fixação de nitrogênio sem conseguir explicação para essa redução, se devido ao sistema simbiote, a planta ou a bactéria (GIBSON, 1969).

Os resultados encontrados em literatura, sobre o efeito de temperatura são muito variáveis, dependente de tempo de exposição, da temperatura da estirpe e se complica ainda mais quando se estabelece o processo de simbiose.

B. Tratamentos a 38 °C

Sabe-se que 38 °C é uma temperatura crucial aos microrganismos termo-sensíveis e que os fixadores de nitrogênio podem perder seus plasmídeos a essa temperatura,

sem os quais se tornam ineficientes pois os fixadores de nitrogênio de crescimento rápido possuem seus genes nif nesses plasmídeos (ZURKOWSKI, 1982).

Para se verificar em que fase da curva de crescimento de uma população de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli a temperatura alta é mais detrimental, duas estirpes foram expostas a 38 °C em diferentes períodos de seu desenvolvimento.

A Tabela 7 mostra o número de células sobreviventes, após 72 horas sob diferentes tratamentos térmicos.

Pela análise estatística podemos verificar que as estirpes diferem entre si, em seu crescimento, quando expostas à diferentes tratamentos de altas temperaturas sendo que a estirpe CM-01 se mostrou superior a estirpe CM-04.

Quanto aos tratamentos, não houve diferença significativa entre eles para nenhuma das estirpes estudadas.

O tratamento IV, o mais drástico, foi pior para a estirpe CM-34, que não apresentou boa sobrevivência em temperatura elevada. A estirpe CM-01 se mostrou bem tolerante a altas temperaturas e a 38 °C, com 10 °C acima da temperatura considerada ideal, esta estirpe apresentou o melhor crescimento.

Tabela 7 - Número de células sobreviventes (média de 3 repetições) em diferentes tratamentos térmicos no 3^o dia de crescimento.

Tratamento	número de células/ml	
	CM-34	CM-01
I - 25 C direto	1.3×10^9 a	3.0×10^9 b
II - 38 C/25 C	1.3×10^9 a	2.5×10^9 b
III - 28 C (2 horas) --> II	9.7×10^8 a	1.3×10^9 b
IV - 38 C direto	1.6×10^8 a	7.3×10^9 b

C. Tratamentos à 40°C, 45°C e 50°C

Diferentes estirpes têm características de crescimento diferentes em relação às exposições a altas temperaturas.

Devido ao pouco efeito que o tratamento à 38°C produziu nas estirpes estudadas, foram testadas temperaturas mais elevadas, pois MUNEVAR e WOLLUM II (1982) conseguiram crescimento até 54,1°C. Quando as estirpes estudadas por esses autores foram testadas em simbiose,

verificaram uma correlação entre eficiência do processo em fixar N_2 e o crescimento da cultura pura em altas temperaturas.

As duas estirpes estudadas neste experimento também mostraram características de crescimento diferentes e a temperatura máxima de sobrevivência foi 40°C . A estirpe CM-34, quando crescida à 40°C , apresentou uma pequena população de colônias de aparência normal, a maioria das colônias se mostraram amorfas e absorviam o corante indicador, dando impressão de que a alta temperatura promoveu deformações nas paredes.

A estirpe CM-01, apresentou a 40°C , uma taxa de crescimento abaixo da normal, que seria em torno de 10^9 cel/ml, porém, se mostrou mais resistente que a CM-34, apresentando uma população mil vezes maior.

A Tabela 8 mostra o número de colônias formadas nas diferentes temperaturas testadas.

Tabela 8 - Número de células/ml após 72 horas de exposição à altas temperaturas (média de 3 repetições).

Tratamento	Número de células/ml	
	CM-34	CM-01
○ 40 C	1.0×10^3	2.5×10^6
○ 45 C	0.0	0.0
○ 50 C	0.0	0.0

D. Perfil plasmidial das bactérias

O perfil eletroforético de plasmídeos, das nove estirpes estudadas se encontra esquematizado abaixo.

<u>Isolado</u>	<u>Característica</u>
1 CM-01 (25 C) ○	colônia normal
2 CM-01 (28 C) ●	colônia normal
3 CM-01 (38 C) ○	colônia normal
4 CM-01 (38 C) ○	colônia vermelha rugosa
5 CM-01 (38 C) ○	colônia branca pequena
6 CM-01 (40 C) ○	colônia rósea normal
7 CM-01 (40 C) ○	colônia vermelha disforme
8 CM-01 (40 C) ○	colônia branca média
9 CM-01 (40 C) ○	colônia branca pequena

Pelos resultados pode-se notar que as colônias dos isolados 4 e 7 com características morfológicas bem diferentes das colônias típicas de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli não apresentaram bandas plasmidiais, e possivelmente tenha ocorrido cura dos plasmídeos provocada pela alta temperatura (ZURKOWISKI e LORKIEWICZ, 1978).

Algumas outras características das estirpes que provavelmente estão codificadas por genes plasmidiais também foram avaliadas para essas estirpes e se encontram em experimentos posteriores.

4.1.3. Resistência a antibióticos

As estirpes estudadas quanto ao perfil plasmidial foram submetidas a outros testes para comparações de características.

A estirpe original CM-01, apresenta um alto grau de resistência à antibióticos, e a dosagem máxima de resistência encontrada por BARAIBAR (1986) foi utilizada como referência de comparação.

Os resultados encontrados estão na Tabela 9.

Os antibióticos testados foram Estreptomicina (STr) na concentração de 1000 µg/ml, Cloranfenicol (Clo) 1000 µg/ml, Eritromicina (Eri) 100 µg/ml, Tetraciclina (Tcl) 50 µg/ml e Kanamicina (Kan) 5 µg/ml.

Pela Tabela 9 podemos verificar que as estirpes 4 e 7 não apresentaram crescimento em meio com antibiótico e essas estirpes também não apresentaram bandas plasmidiais no experimento anterior. Isso indica que, com a possível cura dos plasmídeos, perderam também as características de resistência a antibióticos, e esses genes de resistência devem estar localizados nos plasmídeos. O isolado 6 mesmo após crescimento em temperatura elevada tem mantido as características culturais e de resistência a antibiótico inalteradas em relação a estirpe CM-01 (sua original).

Quando OZAWA et alii (1984) estudaram mutantes espontâneos de Bradyrhizobium japonicum resistentes a antibióticos verificaram que após incubação do solo à 40 °C, a nodulação da soja declinava e que a população de bactérias nodulantes (nod+) também decrescia e sugeriram que a população nod+ de Rhizobium tem um papel muito mais importante que a população total de Rhizobium, pois existe a possibilidade de cura de plasmídeos com os genes nod.

As qualidades relevantes das estirpes resistentes a antibióticos (FONSECA et alii, 1985); devem ser consequentes da preservação dos plasmídeos com genes importantes para a FBN.

4.1.4. Resistência a fungicidas

O teste de resistência a fungicidas também tomou por base os resultados encontrados por BARAIBAR (1986) utilizando-se os mesmos fungicidas na concentração máxima de resistência da estirpe CIAT-899. Os resultados encontrados estão expressos na Tabela 10.

As concentrações dos fungicidas foram para Thiram 200 µg/ml, Captan 200 µg/ml e para Benomyl 1000 µg/ml, com base no princípio ativo do produto.

As estirpes testadas mostraram comportamentos diferentes com relação aos diferentes fungicidas utilizados, sendo que o Thiram se mostrou mais drástico ao crescimento

Tabela 9 - Crescimento de Rhizobium em meio (YMA) com vermelho congo e antibiótico (média de 3 repetições).

Isolado no. e nome	Antibióticos				
	Str	Clo	Eri	Tcl	Kan
1 CM-01 (25 ^o C)	^a ++	++	++	+	++
2 CM-01 (28 ^o C)	++	++	++	++	++
3 CM-01 (38 ^o C)	++	+	+	++	++
4 CM-01 (38 ^o C)	-	-	-	-	-
5 CM-01 (38 ^o C)	++	+	+	++	++
6 CM-01 (40 ^o C)	++	++	++	++	++
7 CM-01 (40 ^o C)	-	-	-	-	-
8 CM-01 (40 ^o C)	++	+	++	+	+
9 CM-01 (40 ^o C)	++	+	+	+	+

a

++ = cresceu bem

+ = cresceu pouco

- = não cresceu

das células que Captan e Benomyl e o Captan, foi o que mostrou uma resposta menos prejudicial ao crescimento das bactérias testadas.

As estirpes 4 e 7 mantêm a característica de maior sensibilidade também apresentada aos antibióticos enquanto que a 6 perdeu apenas sua tolerância a Thiran, em relação aos outros fungicidas continua com sobrevivência semelhante a sua original.

Como a utilização de fungicidas no tratamento de sementes tem se intensificado, muitos estudos têm sido feito nessa área. Quanto STAPHORST e STRIJDOM (1976) estudaram o efeito de 13 fungicidas recomendados para tratamento de sementes para avaliar a toxidade contra duas estirpes de Bradyrhizobium sp verificaram que o Thiran se encontrava entre os menos tóxicos. STOVOLD e EVANS (1980) verificaram que o Thiran foi o fungicida que causou menos prejuízo na nodulação de soja, porém em anos subsequentes provocou inibição, mesmo assim, esses autores recomendam Thiran (2000 ppm) para o tratamento de sementes de soja. Quanto ao Captan, os autores verificaram que os resultados para o controle de doenças foi muito inconsistente durante os anos e provocou um pequeno efeito na nodulação.

Tabela 10 - Nível de resistência a fungicidas das estirpes testadas (média de 3 repetições).

Estirpe	Thiram (200 ppm)	Captan (200 ppm)	Benomyl (1000 ppm)
1 CM-01 (25 °C)	^a +	+	+
2 CM-01 (28 °C)	+	+	+
3 CM-01 (38 °C)	-	+	-
4 CM-01 (38 °C)	-	-	-
5 CM-01 (38 °C)	-	+	+
6 CM-01 (40 °C)	-	+	+
7 CM-01 (40 °C)	-	-	-
8 CM-01 (40 °C)	-	+	-
9 CM-01 (40 °C)	-	+	+

a

++ = cresceu bem

+ = cresceu pouco

- = não cresceu

4.2. Seleção de Substratos

4.2.1. Características de turfas

a) Caracterização química

Os resultados das análises químicas das turfas estudadas estão expressas nas Tabelas 11, 12 e 13.

Uma análise química, por si só, permite dizer muito pouco sobre o comportamento de qualquer material a ser testado como suporte de inoculante. Muitas diferenças são observadas em diferentes turfas com composição química semelhante, pois frequentemente diferem na origem botânica, idade, capacidade de retenção de água, microflora presente, inibidores etc. e portanto apresentam características diferentes em relação a sobrevivência do microrganismo inoculado. São também necessárias, além das análises químicas, análises físicas e biológicas para se poder verificar as verdadeiras qualidades de um referido material como veículo de inoculante para leguminosas.

A maioria das turfeiras produzem uma turfa muito ácida e impossível de ser usada "in natura", sendo necessário um tratamento prévio de elevação do pH, para que atinja valores próximos a neutralidade pois os níveis mínimos de tolerância a acidez para Rhizobium leguminosarum bv phaseoli são referidos por VALARINI (1980) como valores

de pH de 5,5, existindo variabilidade entre as estirpes. CECCATTO (1985) verificou sensibilidade de 84% das estirpes testadas em meio com valor de pH de 4,3.

Tabela 11 - Valores referentes a acidez, capacidade de retenção e disponibilidade de bases de três turfas seca ao ar, com uma repetição por amostra.

Amostra	pH		Al	H	^a	^c	^b
	CaCl2	H2O			CTC	V%	S
					meq/100 ml TFSA		
Comercial	5.9	6.2	- ^d	3.3	24.45	86.5	21.15
São José	6.0	6.4	-	2.8	10.25	72.6	7.45
Patagônia	6.2	6.8	-	2.0	14.08	85.7	12.03

a
 CTC = capacidade de troca catiônica = $\text{Mg}^{++} + \text{Ca}^{++} + \text{K}^{+} + \text{Na}^{+} + \text{Al}^{3+} + \text{Fe}^{+} + \text{H}^{+}$

b
 S = soma de bases trocáveis = $\text{Mg}^{++} + \text{Ca}^{++} + \text{K}^{+} + \text{Na}^{+}$

c
 V% = porcentagem de saturação em bases

$$= \frac{S}{CTC} \times 100$$

d
 - = resultado abaixo do limite detectável pelo método utilizado.

A natureza do agente neutralizante é muito importante e resultados de pesquisa indicam que CaCO_3 tem sido o produto que tem agido mais satisfatoriamente (ROUGHLEY, 1970), tornando o pH um fator pouco limitante na escolha de determinada turfeira.

Os resultados expressos na Tabela 11 são de turfas corrigidas com a adição de 10% de CaCO_3 . Podemos verificar que após esse tratamento os valores de pH se mostraram numa faixa satisfatória para o desenvolvimento do Rhizobium (5,9 a 6,2).

O Al^{++} não está presente em nenhuma das turfas estudadas e embora VALARINI (1980) tenha determinado níveis de resistência a alumínio para estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli em torno de 1,7 $\mu\text{g/ml}$, quando BARAIBAR (1986) testou estirpes dessa mesma bactéria não encontrou crescimento a níveis de 100 mM de Al para nenhuma das sete estirpes estudadas. Resta no entanto determinar a real disponibilidade desse elemento no trabalho de BARAIBAR (1986).

A CTC está relacionada com o teor de matéria orgânica e indica a capacidade de adsorver e trocar cátions e portanto com a disponibilidade de nutrientes do material. Uma CTC de 4 meq/100g é o valor mínimo para reter cátions

contra lixiviação por exemplo, em um solo e os valores encontrados normalmente são menores.

Como as turfas são solos ricos em matéria orgânica, é de se esperar que apresente valores de CTC maiores que a maioria dos solos brasileiros. Se considerarmos a turfa da Patagônia como ideal a nível de comparação, a turfa de São José a acompanha mais proximamente do que a turfa comercial, embora esta última apresente valores superiores de CTC.

O valor V% indica a porcentagem de saturação em bases e é um valor muito importante em solos porque dá idéia da produtividade, e da reação do solo (pH) e também da proporção de bases que ocorrem no solo refletindo na disponibilidade de nutrientes. Valores altos de V% indicam bom suprimento de nutrientes. Com relação a Tabela 11 podemos verificar que as três turfas apresentam valores altos de V%, e isso é bom pois também apresentam valores altos de CTC, pois se ocorre relações inversas como CTC alta e V% baixa ou ao contrário, pode ocorrer problemas com relação à disponibilidade de nutriente do material.

A soma de bases "S" difere nas três turfas pelo que indica a Tabela 11, sendo que a turfa São José apresenta o menor valor de 7,45 meq/100 ml TFSA, seguida pela Patagônia e superada pela turfa comercial. Esse valor

tem que ser levado em consideração juntamente com a proporção de cada cátion fornecedor desse valor sendo uma proporção ideal em torno de 65% para Ca⁺⁺, 10% para Mg⁺⁺, 5% para K⁺ totalizando 80% sendo os 20% restantes referentes à Al⁺⁺⁺ e H⁺ (MALAVOLTA, 1976).

Um problema que estas turfas estão apresentando é essa falta de proporção entre cátions mostrando alto teor de Na que será discutido na Tabela 12 que mostra também valores de C/N e M.O.

Tabela 12 - Resultado da análise de macronutrientes das três turfas com uma repetição por amostra.

Amostra	N %	C %	C/N	M.O	K	Ca	Mg	Pres.	S	Na
						meq/100 ml			ppm	
Comercial	0.75	8.0	10.67	13.76	0.05	19.8	1.3	3.0	18.6	79.0
São José	1.24	22.5	18.14	38.7	0.05	7.3	0.1	8.0	8.8	75.0
Patagônia	0.89	17.5	19.66	30.1	0.13	11.4	0.5	3.0	26.6	149.0

Os microrganismos, na sua maioria requerem carbono (C) e nitrogênio (N) em uma forma complexa, elaborada, usando-os a partir da matéria orgânica. A energia de que necessitam provém da oxidação do C, o alimento provém predominantemente de compostos nitrogenados (EDEN, 1973).

Quando os microrganismos são adequadamente supridos de alimento e energia, multiplicam-se rapidamente. Devido à alta proporção de C nos tecidos das plantas e consequentemente na matéria orgânica, o fornecimento de energia fica assegurado, verificando-se multiplicação até que a escassez de N seja limitante e a velocidade de crescimento então diminui (EDEN, 1973).

Como vemos, dois elementos químicos da M.O. são extremamente importantes e especialmente, a relação ou proporção entre ambos. A C/N usual na grande maioria dos solos cultivados situa-se entre 10 e 12. Relações inferiores a 10 são encontradas algumas vezes em solos quentes e secos, mas tais relações não são comuns em solos produtivos. Relações acima de 12 são relativamente comuns tanto em solos mais frios, encharcados ou ácidos e turfas em que a decomposição é retardada, como também em solos mais quentes, deficientes de N (PONS, 1983).

A M.O. com uma C/N entre 20 e 30 supre todo o N necessário a sua decomposição. Com relação superior a 30, o N fica imobilizado, ou seja todo ele está retido pelos microrganismos, com relação menos que 20 o N é liberado. Se a relação C/N é muito pequena, a população microbiana perece, devido a queda no suprimento de alimento (TISDALE e NELSON, 1975).

A Tabela 12 mostra que a relação C/N para as três turfas se encontra entre 10 e 20, o que significa que existe N suficiente para o desenvolvimento do Rhizobium que será inoculado no veículo.

A maioria das turfas utilizadas na Austrália para produção de inoculante comercial apresenta uma faixa da razão C/N entre 15 e 17,5 (ROUGHLEY, 1970), com média de 16,7. A turfa utilizada mais extensivamente nos Estados Unidos apresenta uma relação em torno de 31,0 (BURTON, 1982).

Pelos resultados, nossas turfas se apresentam com relação C/N semelhantes, às turfas da Austrália. Esta relação da turfa americana se mostra muito alta podendo produzir falta de N para o desenvolvimento adequado do microrganismos inoculado.

Os substratos para inoculantes de leguminosas mais comumente utilizados são turfas ou solos com alto teor de M.O.. A matéria orgânica não é igual em todos os solos, o tipo de vegetação, a natureza da população do solo, as condições de aeração, umidade e as condições climáticas afetam sobremaneira o tipo e a quantidade de matéria orgânica presente no solo (PONS, 1980).

A matéria orgânica tem grande responsabilidade na qualidade de qualquer material a ser escolhido como suporte para bactérias na produção de

inoculantes, pois interfere na CTC, sendo que em turfa mais da metade da CTC é devido a matéria orgânica (MALAVOLTA, 1976) na retenção de metais, quelação, poder tampão e principalmente na disponibilidade ou imobilização dos nutrientes (ALLISON, 1973).

Pela Tabela 12 podemos verificar que o teor de matéria orgânica nas três turfas é variado onde a turfa comercial apresenta um valor de 13,76 contra 30,1 e 38,7 da Patagônia e São José, respectivamente.

As turfas da Austrália também apresentam uma faixa de variação muito grande, superior a encontrada na Tabela 12, indo desde valores de 28,8% até 75,4% com um valor médio de 64,3% (ROUGHLEY, 1970). Esses valores são bem superiores a turfa brasileira, o que a torna com baixa qualidade. A turfa americana apresenta valores ainda maiores com uma média de 86,60 (BURTON, 1982). Num trabalho de RANDRUP (1980) a turfa utilizada apresentou um teor de matéria orgânica na faixa de 55-60% sendo uma representante da turfa utilizada na Argentina.

Em nenhum trabalho citado na literatura foi verificado valores de M.O. tão baixos quanto os encontrados para as turfas brasileiras e em função da proposta de aumento desse teor foram feitos estudos posteriores.

Com relação ao K, as turfas brasileiras apresentam teor idêntico de 0,05 meq/100 ml TFSA enquanto

que a turfa da Patagônia apresenta um valor três vezes maior, de 0,13, que se assemelha às turfas Australianas com 0,12 a 0,17 meq/100 g, (ROUGHLEY, 1970) e a turfa americana apresenta um teor bem acima em torno de 1,12 (BURTON, 1982).

Os teores de Ca encontrados foram de 7,3 meq/100 ml TFSA para a turfa São José, 11,4 para Patagônia e 19,8 para a comercial. A turfa da Austrália não apresenta Cálcio na sua composição (BOUGHLEY, 1970) e a turfa americana apresenta um teor de 5,21 (BURTON, 1982).

A turfa americana apresenta um teor de Mg ao redor de 1,14 (BURTON, 1982) e as turfas da Tabela 12 apresentam valores variáveis de 0,1 para a turfa São José até 1,3 meq/100 ml TFSA para a turfa comercial, que mostrou valor semelhante a turfa americana.

Uma grande proporção (25-85%) do P no solo encontra-se em forma orgânica, que pode liberar-se mediante mineralização, sempre que a relação C/P seja suficientemente baixa, situação semelhante ao N. Em geral, entretanto, o P utilizado pelas plantas é mineralizado pelo microrganismos. Poucos são os resíduos orgânicos que provocam a imobilização do P, que só se processa quando a relação C/P é maior que 300 (MALAVOLTA, 1976).

O teor de P das turfas foi de 3,0 meq/100 ml TFSA para a comercial e a Patagônia e de 8,0 para a turfa São José. A turfa americana apresenta um valor de 0,33 para

Por enquanto que a australiana um teor entre 0,22 e 0,09. Tanto a turfa americana como a australiana apresentam um teor inferior mesmo ao mínimo apresentado pelas turfas da Tabela 12.

Muitas turfeiras apresentam alto teor de NaCl, e esse teor pode variar durante o ano ou de ano para ano. O NaCl pode causar perda rápida na viabilidade da cultura de Rhizobium inoculada em turfa com alto teor desse sal. A tolerância do Rhizobium é variável e estirpes de lucerna sobrevivem bem até níveis superiores a 0,89% de Cl para estirpes de trevo o limite é de 0,17% e resultados semelhantes foram encontrados para Rhizobium leguminosarum bv phaseoli e para os simbiossiontes de Medicago sativa tendo sido verificado estirpes sensíveis (0,2%) e estirpes tolerantes (3%) para esses dois grupos. (DATE e ROUGHLEY, 1977; PARKER et alii, 1977; SINGLETON et alii, 1982).

Nesse caso a turfa da Patagônia está em desvantagem em relação as outras duas turfas brasileiras, pois apresentaram menor teor de Na do que a turfa da Patagônia. A turfa americana apresenta um teor de apenas 0,52 (BURTON, 1982).

A Tabela 13 apresenta os resultados das análises dos micronutrientes nas três turfas estudadas.

O ferro, metal componente da nitrogenase, é também transportador de elétrons do tipo ferredoxina. Como

componente do radical heme, tem uma função dominante nos citocromos e também é um importante co-fator em muitas outras reações enzimáticas.

Uma insuficiência no suprimento de ferro para o crescimento de bactérias pode interferir na fixação de N_2 , afetando a síntese e o funcionamento de uma ou mais enzimas.

Tabela 13 - Resultado da análise de micronutrientes das três turfas com uma repetição por amostra.

Amostra	Fe	Mn	Cu	Zn	B
-----ppm-----					
Comercial	38,0	5,0	0,4	0,1	0,1
São José	9,0	3,0	0,4	1,0	0,1
Patagônia	115,0	29,0	0,5	2,5	0,2

Em alguns casos, os organismos sintetizam e usam um transportador não metálico em lugar do transportador de elétrons que contém ferro. Um exemplo de substituição é a ferredoxina, uma flavoproteína, que funciona como transportador de elétrons em Clostridium pasteurianum quando cresce em meio deficiente de Fe.

Pela Tabela 13 podemos observar que a turfa da Patagônia apresenta valores muito superiores em relação

ao teor de Fe quando comparada com as outras duas turfas brasileiras. A turfa americana apresenta um valor bem abaixo em comparação com a Tabela 13, de 2,10 enquanto que as turfas estudadas, a de São José que apresentou menor teor, tem cerca de 9,0 ppm, a comercial 38,0 e a Patagônia 115.

A preocupação com micronutrientes é principalmente devido a problemas relacionados com toxidez uma vez que a exigência é pequena, quando o teor desses elementos é alto existe a possibilidade de toxidez. Esse problema aparentemente não existe nos materiais testados pois todos os micronutrientes se encontram em níveis desejáveis e abaixo de níveis que possam provocar qualquer problema.

Quando algum elemento está com um teor abaixo da necessidade, uma adição se torna possível, o problema aparece quando está presente em níveis acima do desejado.

b) Caracterização Física

Dentre as propriedades físicas importantes que caracterizam um solo, poucas delas podem ser utilizadas para caracterizar turfas como veículos de bactérias para a produção de inoculantes.

Quanto menor a granulação, o empacotamento das partículas é mais denso e as partículas se acomodam mais facilmente. Para turfa existe uma padronização da

granulometria quando esta vai servir de veículo para produção de inoculantes. Deve passar por uma peneira de 200 meshes, portanto o material tem que passar por um tratamento prévio de moagem e peneiramento para satisfazer os requisitos exigidos e nesse processo muitas propriedades físicas são danificadas, como por exemplo estrutura, se tornando difícil a caracterização.

Independente da natureza química um bom empacotamento das partículas garante uma melhor retenção de água e um maior proteção contra as trocas bruscas de temperatura a que pode ser submetida o futuro inoculante (RANDRUP, 1980).

A capacidade hídrica indica a dificuldade em secar a matéria prima, ou a tendência do suporte de conservar a umidade, controlando indiretamente a sobrevivência das bactérias suportadas (RANDRUP, 1980). Essa característica pode ser mudada de acordo com a granulometria ou por misturas com outros materiais (LOPRETO et alii, 1975).

A porosidade também está relacionada com a granulometria indica o número de "esconderijos" para a bactéria. Um material que possui microporos de tamanho várias vezes maior que as bactérias, oferecerá um abrigo tão consistente que a sobrevivência bacteriana fica muito incrementada (RANDRUP, 1980).

O tipo de poros e as características do empacotamento determinarão o volume de ar retidos, que possivelmente também influirá sobre o metabolismo do rizóbio (LOPRETO, 1973), ou poderá modificar o coeficiente de condutividade térmica do material (RANDRUP, 1979).

Foi escolhido para o nosso caso a capacidade hídrica como parâmetro para caracterizar turfas, pois indiretamente controla a sobrevivência das bactérias suportadas.

A Tabela 14 mostra os valores encontrados para a retenção de água nas turfas estudadas.

Pela Tabela 14 podemos verificar que a turfa comercial tem baixa capacidade de retenção de água quando comparada com a turfa de Patagônia que tem uma capacidade hídrica bem maior. A turfa de São José apresenta uma retenção de água intermediária, não sendo tão baixa como a comercial, mas também, não tão alta quanto a da Patagônia. As três turfas estudadas apresentaram valor de capacidade hídrica maior do que a turfa estudada por RANDRUP (1980) que apresentou apenas 72% de água retida.

A capacidade de retenção de água tem um efeito marcado no número de células sobreviventes no inoculante. Não apenas no início para o processo de impregnação com o caldo do veículo mas também no período de

Tabela 14 - Capacidade máxima de retenção de umidade de três turfas em triplicata.

Amostra	% máxima de água retida			média
	a	b	c	
Comercial	73,97	94,02	78,80	82,26
São José	151,21	174,23	154,00	159,81
Patagônia	244,69	229,42	251,80	241,97

armazenagem do inoculante. Quando a capacidade hídrica é baixa, a perda de água é maior prejudicando sobremaneira a qualidade do inoculante mesmo que estocado sob refrigeração (DATE e ROUGHLEY, 1977).

A capacidade hídrica pode ser aumentada com a eliminação de áridos, por flotação - peneiração, mediante diminuição do tamanho das partículas, deixando maior tempo no moinho ou por misturas com outros materiais (LOPRETO et alii, 1975) ou simplesmente pode ser controlada mediante o maior volume do pacote de inoculante e a espessura de suas paredes evitando ressecamento prematuro (RANDRUP, 1980).

c) Caracterização Biológica

A presença de contaminantes (aeróbios totais), é o parâmetro que indica a necessidade ou não de esterilização do suporte. Leituras em placas de Petri, aos 2, 4 e 6 dias após inoculação, servem para estimar a velocidade de crescimento de cada contaminante.

Quando grande parte dos microrganismos se desenvolve após 48 horas, significa que são de crescimento rápido se comparados com Rhizobium. Nesse caso a esterilização do suporte é conveniente, a menos que o número total de contaminantes não ultrapasse 10^2 células/g em cujo caso, o grande número de rizóbios contidos no caldo de impregnação poderá controlar o desenvolvimento de formas indesejáveis (RANDRUP, 1980).

Os fungos sempre são um problema, pois após alguns meses tomam conta do inoculante, aproveitando a alta umidade, a disponibilidade de nutrientes e sua alta resistência natural às condições adversas.

Para piorar, algumas espécies são fitoparasitas, e nesse caso é bom considerar também se não estamos transportando no suporte um inimigo das leguminosas, que poderia estragar a plantação toda (RANDRUP, 1980).

Pela Tabela 15 podemos verificar que a turfa comercial, em suas duas amostras apresentaram uma população

bacteriana razoável, que se manteve constante após 48 horas de incubação. Não apresentaram população de fungos, leveduras e protozoários nas diferentes épocas de avaliação. Apresentaram a ocorrência de uma população de actinomicetos, de crescimento lento, que só apareceram no 6^o dia de incubação à 28 C.

A turfa superficial de São José se mostrou com maior número de contaminantes do que a mais profunda. Isso é explicável pela própria característica de distribuição microbiana no perfil do solo (PONS, 1980), mostrando populações bacterianas, fungicas e de actinomicetos que normalmente são fortes inibidores de Rhizobium (ANUSUYA e SULLIA, 1984).

A turfa da Patagônia apresentou apenas uma pequena população de fungos.

Com adição de um meio rico em nutrientes, como é o caso do meio utilizado para multiplicação do Rhizobium, estas populações podem aumentar e mesmo tornar-se presentes em materiais onde não haviam sido detectadas ante a adição desse meio. Isso ocorre devido as alterações benéficas que ocorrem como por exemplo, teor de umidade, disponibilidade de nutrientes que estimulam as formas de resistência a se desenvolverem (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).

Tabela 15 - Número de populações de contaminantes encontradas nas turfas antes da esterilização (média de 3 repetições).

Amostras	Bactérias	Fungos	Actinomicetos	Leveduras	Protozoários
	no. cel/g turfa				
Comercial Sul	⁴ 2.0 x 10	^a -	² 2.0 x 10	-	-
Comercial Oeste	⁵ 1.0 x 10	-	² 1.0 x 10	-	-
São José superf.	⁵ 2.0 x 10	⁴ 3.0 x 10	⁴ 7.0 x 10	-	-
São José (0,5-1,0 cm)	⁵ 1.0 x 10	-	-	-	-
Patagônia	-	² 2.0 x 10	-	-	-

^a = não apresentou sobreviventes.

Esses resultados revelam que se estes materiais forem utilizados como veículos de Rhizobium tem que passar por um tratamento prévio a inoculação, que nesse caso é um processo de esterilização a que devem ser submetidos antes de receberem as bactérias a serem veiculadas, para garantir a qualidade do inoculante.

4.2.2. Uso de aditivos nas turfas

Para tentar melhorar tanto as características químicas como as físicas da turfa comercial brasileira, foram feitas misturas com a turfa comercial de aditivos orgânicos e inorgânicos e avaliados quanto as

características acima citadas para verificar possíveis melhorias ou alterações promovidas pelos aditivos utilizados. Foram utilizados cinco aditivos inorgânicos e um aditivo orgânico produzido por uma firma de substrato feito na forma de compostagem o MATR-24. Os aditivos foram testados em duas concentrações 20% e 40% do peso da turfa.

Caracterização Química

As análises químicas das misturas alternativas como veículos de inoculantes estão com os resultados expressos nas Tabelas 16, 17 e 18.

Os aditivos promoveram uma elevação do pH da turfa comercial, mas, por si só não foram suficientes para proporcionarem níveis adequados ao desenvolvimento do Rhizobium e os resultados expressos na Tabela 16 são de turfas corrigidas com 10% de CaCO_3 e misturadas com os diferentes aditivos.

O teor de Al, embora inexistente na turfa comercial pura, após misturas com aditivos apareceram pequenas quantidades desse elemento mais insuficientes para atrapalhar o desenvolvimento do Rhizobium de acordo com VALARINI (1980).

Tabela 16 - Valores referentes a acidez e capacidade de retenção de bases dos materiais estudados (1 repetição por amostra).

Amostra	pH		Al --meq/100 ml-- TFSA	H	CTC ^a	V% ^b	S ^c
	CaCl2	H2O					
Turfa Comercial	5.9	6.2	- ^d	3.3	24.45	86.5	21.15
T.C + ardósia 20%	6.8	6.8	0.1	3.0	22.70	86.3	19.60
T.C + ardósia 40%	6.2	6.9	0.1	2.8	19.30	84.9	16.40
T.C + calcita 20%	7.1	7.6	0.1	1.2	21.10	93.8	19.80
T.C + calcita 40%	6.8	7.5	0.1	1.4	24.80	93.9	23.30
T.C + caulinita 20%	6.0	6.7	-	3.3	25.10	86.8	21.80
T.C + caulinita 40%	6.8	6.8	0.1	2.5	35.80	92.7	33.20
T.C + diatonita 20%	6.0	6.4	-	2.8	24.95	88.7	22.15
T.C. + diatonita 40%	6.1	6.5	-	2.1	21.26	90.1	19.16
T.C + talco 20%	5.8	6.5	-	8.8	19.40	80.4	15.60
T.C + talco 40%	6.0	6.6	-	8.8	17.10	80.7	13.80
T.C + MATR-24 20%	6.0	6.4	-	3.1	21.50	85.5	18.40
T.C + MATR-24 40%	6.1	6.6	-	2.5	28.50	91.2	26.00
Patagônia	6.2	6.8	-	2.0	14.08	85.7	12.03

T.C = Turfa Comercial

^a
CTC = Capacidade de Troca Catiônica

^c
= S = Soma de bases trocáveis = mg ⁺⁺ + Ca ⁺⁺ + K ⁺ + Na ⁺⁺

^b
= V% = Porcentagem de saturação em bases = $\frac{S}{CTC} \times 100$

^d
= - = Resultado abaixo do limite detectável

A CTC, para a maioria das misturas testadas diminuiu de valor em comparação com a turfa comercial. As misturas com 20% e 40% de caulinita e 40% de MATR-24, conseguiriam elevar o valor da CTC da turfa comercial. O valor da CTC da turfa da Patagônia é menor do que qualquer outro tratamento.

Como já vimos anteriormente, valores altos de V% indicam a disponibilidade de nutrientes e quanto maior o V% desde que a CTC seja também alta, ocorre boa disponibilidade. Dos aditivos que aumentaram a CTC apenas dois aumentaram também o valor V% que foram 40% de caulinita e 40% de MATR-24, embora o valor de V% apenas tenha sido aumentado também pelas misturas com calcita e diatomita.

A soma de bases foi aumentada em relação a turfa comercial pelos aditivos 40% de calcita, 20% e 40% de caulinita e diatomita 20% além de 40% do MATR-24.

É interessante notar que os valores de V% e S de todos os tratamentos são menores quando comparados com a turfa da Patagônia, e a proporcionalidade dos cátions que determinam esses valores é também muito importante e pode ser verificado pela Tabela 17.

Pela Tabela 17 verificamos que a proporcionalidade dos cátions exigida, citada anteriormente, continua não sendo satisfeita devido aos baixos teores de ⁺⁺Ca e altos teores de Na. Todas as misturas mostraram um

teor de Na⁺ maior ainda que da turfa sem mistura que já era alto. Essa pode ser uma das características na seleção do aditivo pois no caso da caulinita a elevação desse teor foi alta demais, impossibilitando o desenvolvimento do Rhizobium (DATE e ROUGHLEY, 1977; PARKER et alii, 1977; SINGLETON et alii, 1982).

Quanto ao teor de C, apenas o MATR-24, conseguiu fornecer C a mistura quando comparados os valores com a turfa comercial sem mistura, deficiente em C, mesmo com a elevação do teor pelo MATR-24, a turfa da Patagônia continua com valores superiores.

A relação C/N também diminuiu em todas as misturas com exceção do MATR-24, evidenciando o problema do C que pode se tornar limitante ao desenvolvimento do microrganismo, pois como vimos anteriormente, relações inferiores a 10 podem provocar a rápida mineralização do N comprometendo o teor de N disponível (PONS, 1983; TISDALE e NELSON, 1975).

Mesmo com o aumento da relação C/N, pelo MATR-24, a turfa da Patagônia ainda possui um valor superior de 19,66, contra 12,32 para 20% MATR-24 e 12,92 para 40% de MATR-24.

O teor de M.O. está diretamente ligado ao teor de C e pela Tabela 17 podemos verificar que o MATR-24 se torna eficiente nas misturas, como era de se esperar,

pois se trata de um composto orgânico. Mesmo após mistura com o MATR-24, a turfa comercial não conseguiu nem se equiparar a turfa da Patagônia, e nem as turfas da Austrália ou Estados Unidos (ROUGHLEY, 1970; BURTON, 1982).

Esses resultados indicam que apenas a adição de um material, mesmo que seja rico em M.O., não consegue elevar esse teor a níveis desejados nas turfas comerciais brasileiras e a melhoria na qualidade de veículos deve também incluir buscas de turfas com maior potencial para serem utilizados como veículo de inoculantes uma vez que as que estão sendo utilizadas comercialmente, cada vez mais se mostram com poucas características desejáveis.

Em relação ao potássio, cuja exigência pelos microrganismos não é alta, a maioria dos aditivos utilizados conseguiram elevar esse valor pois o K faz parte da estrutura de minerais por isso os aditivos minerais aumentaram o teor de 0,05 meq/100 ml TFSA da turfa comercial sem mistura até 1,60 meq/100 ml TFSA com a adição de 20% de ardósia.

O MATR-24, sendo um composto orgânico, basicamente vegetal, permitiu também a elevação no teor de K pois esse elemento se encontra nas células vegetais e é facilmente liberado (PONS, 1980).

Tabela 17 - Resultado da análise de macronutrientes dos materiais estudados (1 repetição por amostra).

Amostra	N	C	C/N	M.O.	K	Ca	Mg	Press	C/P	S	Na
	%	%									
					---mg/100 ml TFSA---					-----ppm-----	
^a Turfa Comercial	0.75	8.0	10.67	13.76	0.05	19.8	1.3	3.0	2.60	18.6	79.0
T.C + ardósia 20%	0.59	5.4	9.15	9.29	1.60	8.4	9.6	8.0	0.67	77.2	160.0
T.C + ardósia 40%	0.87	6.2	7.13	10.66	1.20	7.8	7.9	25.0	0.25	66.8	56.0
T.C + calcita 20%	0.59	4.5	7.63	7.74	0.90	12.6	8.8	4.0	1.12	30.2	201.0
T.C + calcita 40%	0.59	5.5	9.32	9.46	1.20	14.4	7.7	3.0	1.83	42.0	153.0
T.C + caulinita 20%	0.59	5.3	8.98	9.12	1.30	8.9	11.6	8.0	0.66	86.2	550.0
T.C + caulinita 40%	0.59	3.7	6.27	6.36	1.20	14.0	18.0	9.0	0.41	104.0	350.0
T.C + diatomita 20%	0.61	6.0	9.84	10.32	0.05	20.8	1.3	3.0	2.00	7.8	106.0
T.C. + diatomita 40%	0.69	5.5	7.97	9.46	0.06	16.9	2.2	5.0	1.11	10.8	114.0
T.C + talco 20%	0.64	5.8	9.06	9.98	1.40	6.1	3.1	7.0	0.83	38.8	207.0
T.C + talco 40%	1.72	8.8	5.12	15.14	1.10	5.7	7.0	7.0	1.26	52.2	172.0
T.C + MATR-24 20%	0.69	8.5	12.32	14.62	0.80	15.8	1.8	17.0	0.50	9.6	118.0
T.C + MATR-24 40%	0.89	11.5	12.92	19.78	1.80	18.8	5.4	44.0	0.26	8.6	150.0
Patagônia	0.89	17.5	19.66	30.1	0.13	11.4	0.5	3.0	5.8	26.6	149.0

^a

= T.C. Turfa Comercial

Os teores de K apresentado nas misturas estão entre os valores encontrados nas turfas australianas e americanas como já foi visto anteriormente (ROUGHLEY, 1970 e BURTON, 1982).

É desejável que o teor de Ca⁺⁺ seja elevado (MALAVOLTA, 1976), mas todos os aditivos com exceção da diatomita diminuíram o teor de Ca⁺⁺ em relação a turfa comercial sem mistura que apresentava teor de 19,8 meq/100 ml de TFSA contra 20,8 meq/100 ml de TFSA com 20% de diatomita. O teor da turfa da Patagônia é menor que essas misturas sendo de 11,4 meq/100 ml de TFSA e grande parte das misturas apresentaram valores inferiores inclusive a estes. As turfas estrangeiras da Austrália e a americana apresentam valores inferiores indo desde zero na composição da turfa australiana até 5,21 para a americana (ROUGHLEY, 1970; BURTON, 1982).

O teor de Mg foi elevado em todas as misturas e se tornaram superiores aos valores encontrados em turfas estrangeiras como já vimos anteriormente. Se a turfa da Patagônia promove um desenvolvimento tão bom de Rhizobium e tem uma quantidade de Mg baixa com 0,5 meq/100 ml TFSA, provavelmente essas bactérias só precisem de pouca quantidade desse elemento.

O teor de P encontrado em outras turfas é baixo indo de 0,09 a 0,33 meq/100 ml (ROUGHLEY, 1970;

BURTON, 1982) a turfa comercial e da Patagônia apresentaram o mesmo valor de 3,0 meq/100 ml TFSA. Qualquer um dos aditivos testados elevaram o teor de P da turfa comercial.

A relação C/P diminuiu em todas as misturas com relação a turfa comercial que apresenta um valor equivalente a metade do valor da turfa da Patagônia que é de 5,8 essa é uma relação que exprime a liberação do P, quanto mais baixa, maior disponibilidade do P, que só vai se imobilizar em relações superiores a 300 (MALAVOLTA, 1976), como já vimos anteriormente.

A Tabela 18 mostra o resultado da análise dos micronutrientes encontrados nas misturas com turfa comercial. Quanto aos micronutrientes não foi encontrado referências em literatura na composição de turfas.

O Fe, pela Tabela 18 apresentou uma oscilação acentuada indo de valores de 3,0 ppm a 5,0 ppm na mistura TC + calcita 40% e TC + calcita 20% respectivamente, bem abaixo do valor encontrado em turfa comercial sem mistura, até valores próximos ao encontrado na turfa da Patagônia, de 108,0 ppm para a mistura de turfa comercial + 40% diatomita.

Para Mn os valores diminuíram com relação a turfa comercial nas misturas com calcita (20 e 40%), não se alteraram nas misturas com diatomita (20 e 40%) e atingiram um máximo de 131,0 ppm na mistura Tc + ardósia 40%, que também apresentou o maior aumento com relação ao Cu

Tabela 18 - Resultado da análise de micronutrientes dos materiais estudados (1 repetição por amostra).

Amostra	Fe	Mn	Cu	Zn	B
	-----ppm-----				
Turfa Comercial	38.0	5.0	0.4	0.1	0.1
a T.C + ardósia 20%	31.0	85.0	0.9	4.0	0.8
T.C + ardósia 40%	40.0	131.0	4.1	6.8	0.6
T.C + calcita 20%	5.0	3.0	0.2	0.2	0.3
T.C + calcita 40%	3.0	3.0	0.4	0.5	0.4
T.C + caulinita 20%	31.0	28.0	0.5	2.8	0.7
T.C + caulinita 40%	40.0	25.0	0.4	2.2	0.6
T.C + diatonita 20%	53.0	5.0	0.6	0.1	0.2
T.C + diatonita 40%	108.0	5.0	0.5	0.1	0.2
T.C + talco 20%	28.0	36.0	0.8	2.1	0.6
T.C + talco 40%	33.0	52.0	1.2	2.8	0.5
T.C + MATR-24 20%	40.0	14.0	0.6	0.1	0.2
T.C + MATR-24 40%	75.0	29.0	0.4	0.2	0.3
Patagônia	115.0	29.0	0.5	2.5	0.2

a
= T.C = Turfa Comercial

e ao Zn enquanto que as outras misturas se mostraram intermediárias entre a turfa comercial e a Patagônia. O B teve seu teor aumentado em todas as misturas, superando em algumas o teor da Patagônia.

As características químicas, quando mostram teores abaixo dos necessários, os elementos podem ser adicionados elevando seu teor até níveis adequados (RANDRUP, 1980).

A característica física de retenção de água pode ter seu valor aumentado quando se diminui o tamanho das partículas como vimos anteriormente. No caso de turfas para veículo de inoculantes, que tem uma granulometria padrão a obedecer, fica muito difícil incrementar essa propriedade.

Uma outra alternativa é adição de materiais com alta capacidade de retenção de água à turfa de acordo com LOPRETO et alii (1975).

Para verificar se as misturas feitas com turfa comercial conseguiram aumento na capacidade de retenção de água, foram avaliadas quanto a esta característica e os resultados se encontram expressos na Tabela 19.

Pela Tabela 19 podemos verificar os valores da capacidade máxima de retenção hídrica das diferentes misturas em comparação com a turfa comercial e a turfa suposta como padrão, a da Patagônia.

Tabela 19 - Capacidade máxima de retenção hídrica das misturas em triplicata.

Amostra	% máxima de água retida			
	a	b	c	média
Turfa Comercial	74,0	74,0	78,8	75,6
a				
T.C + ardósia 20%	59,0	61,3	60,2	60,2
T.C + ardósia 40%	57,6	57,3	58,3	57,7
T.C + calcita 20%	56,4	63,4	67,2	62,3
T.C + calcita 40%	45,8	46,5	45,6	46,0
T.C + caulinita 20%	63,7	82,3	64,8	70,3
T.C + caulinita 40%	76,4	81,6	97,2	85,0
T.C + diatonita 20%	77,0	81,2	80,6	79,6
T.C + diatonita 40%	86,0	92,5	88,2	88,9
T.C + talco 20%	53,4	58,9	55,8	56,0
T.C + talco 40%	51,9	61,9	56,2	56,7
T.C + MATR-24 20%	77,6	89,6	78,2	81,8
T.C + MATR-24 40%	96,8	95,0	78,4	90,1
Patagônia	244,7	229,4	251,8	242,0

a

= T.C = Turfa Comercial

Os valores apresentados nessa Tabela 19, revelam que apenas três dos aditivos testados aumentaram a capacidade de retenção de água da turfa comercial. A caulinita aumentou quando adicionada a 40% mas quando adicionada a 20% diminuiu a capacidade de retenção de água.

A diatomita conseguiu produzir um aumento de 75,60 para 79,60 quando adicionada na proporção de 20% e quando adicionada a 40% o aumento foi maior atingindo 88,90.

O MATR-24, se mostrou o melhor dos aditivos atingindo o maior nível de retenção quando incorporado a 40% com 90,06% de retenção de água.

Mesmo em misturas, a turfa comercial não conseguiu atingir valores muito superiores do que sem mistura embora alguns aditivos tenham se mostrado eficientes na elevação dessa característica.

Ensaio posteriores foram feitos utilizando esses aditivos que se mostraram mais eficientes, utilizando uma turfa com maior potencialidade, principalmente se referindo à capacidade de retenção de água quando em comparação com a turfa comercial.

4.3. Uso potencial de suportes e aditivos

A turfa que tem sido usada comercialmente para a produção de inoculantes de leguminosas no Brasil,

pelo que pudemos ver nos testes anteriores não apresentam boas características químicas, e nem boa capacidade de retenção de água.

Na tentativa de solucionar o problema de veículo de inoculantes, testamos outras turfas e verificamos que uma delas apresentava características superiores à turfa comercial. A turfa São José mostrou melhores características químicas e de retenção de água em relação a turfa comercial.

Como a turfa São José, mesmo sendo melhor que a comercial, ainda se mostrou inferior à turfa da Patagônia, quanto às características físicas, foram testadas misturas com aditivos como foi feito com a turfa comercial no passo anterior.

A turfa São José foi testada sem mistura e em mistura com o MATR-24, um aditivo orgânico que se mostrou eficiente no teste anterior quanto a algumas características importantes na seleção de veículo para inoculante. As principais características utilizadas para selecionar o aditivo foram: aumento no teor de carbono, de matéria orgânica e principalmente na capacidade de retenção de água. Foi utilizada também a diatomita, um aditivo mineral que aumentou a capacidade de retenção de água da turfa comercial, embora não tenha alterado os teores de M.O. e C.

Os dois aditivos foram testados em duas concentrações 20% e 40%.

4.3.1. Caracterização dos suportes

Caracterização Química

As análises químicas efetuadas nas misturas da turfa potencial com aditivos tem seus resultados expressos nas Tabelas 20, 21, 22 e 23.

Juntamente com a turfa São José estão expressos os resultados da turfa comercial e da turfa "padrão" Patagônia para facilitar comparações.

Pela Tabela 20 podemos verificar que os valores de pH dos substratos testados, mesmo em misturas com o aditivo orgânico ou mineral, não apresentaram níveis adequados de pH, mostrando valores muito ácido para a sobrevivência de Rhizobium.

Os substratos com aditivos mostraram grande variação quanto ao valor de pH e a análise estatística mostra que a diatomita na proporção de 20% conseguiu o melhor efeito para elevação do pH em turfa comercial, quando aplicada a proporção de 40% teve menor efeito, na diferenciando estatisticamente da turfa comercial.

Diatomita quando adicionada à turfa São Jose mostrou o melhor efeito quando foi misturada na proporção de 40%, diferenciando essa mistura do grupo de misturas com a turfa São José quanto ao valor pH. As outras misturas com a turfa São José se mostraram semelhantes entre si

estatisticamente, juntamente com a turfa sem mistura.

O MATR-24 não melhorou o pH para nenhuma das duas turfas testadas não diferenciando entre si com a turfa sem mistura, embora a turfa comercial tenha apresentado valores superiores de pH em relação a São José.

Tabela 20 - Valores referentes ao pH do substrato sem neutralização em triplicata.

Amostra	pH em H ₂ O			média
	a	b	c	
Turfa Comercial	4,82	4,68	4,93	4,81bc
a T.C + 20% diatonita	5,77	5,44	5,74	5,65a
T.C. + 40% diatonita	5,09	4,85	5,11	5,02b
T.C + 20% MATR-24	4,44	4,47	4,52	4,78c
T.C + 40% MATR-24	5,19	4,97	4,88	5,01b
Turfa São José	3,92	3,68	3,64	3,75d
b T.S.J + 20% diatonita	3,78	3,71	3,64	3,71d
T.S.J. + 40% diatonita	4,54	4,77	4,92	4,74bc
T.S.J + 20% MATR- 24	3,64	3,72	3,67	3,78d
T.S.J + 40% MATR-24	4,04	4,0	3,99	4,01d

a = T.C = Turfa Comercial				
b = T.S.J = Turfa São José				

Devido a necessidade de neutralizante foi feita a adição de CaCO_3 numa proporção de 10% em relação ao peso da turfa pura, antes da mistura com aditivos.

Os valores correspondentes ao pH após correção da turfa estão expressos na Tabela 21, assim como outras características de disponibilidade de bases.

Existem algumas estirpes de Rhizobium tolerantes a pH 4,5, mas a maioria sobrevive bem em valores de pH acima de 5,5 (VALARINI, 1980).

Os resultados da Tabela 21 indicam que após a correção, todos os substratos apresentaram valores ao redor de 6,0, indicando que uma adição de 10% de CaCO_3 é suficiente para elevar o valor de pH a níveis desejáveis ao bom desenvolvimento do Rhizobium de acordo com ROUGHLEY (1970). Quando em mistura com diatomita ou MATR-24, a CTC da turfa comercial foi diminuída, nas duas proporções apresentaram misturas com valores maiores de CTC em comparação com a turfa sem aditivos. Apesar disso, esses valores não superaram a CTC da turfa da Patagônia.

O valor "S" para as misturas com a turfa comercial foi muito oscilante. Em alguns casos diminuíram em relação a turfa sem mistura como com 40% diatomita e 20% MATR-24, em outras misturas como 40% MATR-24 houve um aumento nesse valor.

Tabela 21 - Valores referentes à acidez dos substratos corrigidos com CaCO_3 e suas características de disponibilidade. de bases (1 repetição por amostra).

Amostra	pH		Al -meq/100 ml- TFSA	H	CTC ^a	V% ^b	S ^c
	CaCl ₂	H ₂ O					
Turfa Comercial	5.9	6.2	-d	3.3	24.45	86.5	21.15
e T.C + 20% diatonita	6.0	6.4	-	2.8	24.95	88.7	22.15
T.C. + 40% diatonita	6.1	6.5	-	2.1	21.26	90.1	19.16
T.C + 20% MATR-24	6.0	6.4	-	3.1	21.50	85.5	18.40
T.C + 40% MATR-24	6.1	6.6	-	2.5	28.50	91.2	26.00
Turfa São José	6.0	6.4	-	2.8	10.25	72.6	7.45
f T.S.J + 20% diatonita	6.1	6.6	-	2.0	13.65	85.3	11.65
T.S.J. + 40% diatonita	6.1	6.7	-	1.9	11.26	83.1	9.36
T.S.J + 20% MATR- 24	5.9	6.4	-	2.1	13.65	84.6	11.55
T.S.J + 40% MATR-24	6.2	6.7	-	1.8	12.85	85.9	11.05
Patagônia	6.2	6.8	-	2.0	14.08	85.7	12.03

a = CTC = Capacidade de Troca Catiônica =

$$\text{Mg}^{++} + \text{Ca}^{++} + \text{K}^{+} + \text{Na}^{+} + \text{Al}^{3+} + \text{Fe}^{++} + \text{H}^{+}$$

c = S = Soma de bases trocáveis = $\text{mg}^{++} + \text{Ca}^{++} + \text{K}^{+} + \text{Na}^{++}$

b = V% = Porcentagem de saturação em bases =
$$\frac{S}{\text{CTC}} \times 100$$

d = - = Resultado abaixo do limite detectável

e = T.C = Turfa Comercial

f = T.S.J = Turfa São José

Os valores de "S" referentes a turfa São José, após misturadas, com qualquer dos aditivos e nas duas proporções sofreram ligeiro acréscimo se assemelhando ao valor da turfa Patagônia.

O valor "V%" aumentou nas duas turfas após serem complementadas com aditivos e todas as misturas mostraram valores com tendência a proximidade com a turfa Patagônia.

Os resultados das análises de macronutrientes se encontram na Tabela 22.

Os resultados da Tabela 22 expressam a heterogeneidade dos substratos. As misturas de T.C + diatomita tiveram seus valores diminuídos em relação a turfa comercial pura e quando a essa turfa foi adicionado MATR-24, a relação C/N aumentou e resultados semelhantes apresentaram as misturas com a turfa de São José sendo que com a utilização do MATR-24 essa relação se aproximou muito da turfa da Patagônia.

Com relação a matéria orgânica a turfa de São José sem aditivos já apresenta um valor bem superior a turfa comercial e superior até a turfa da Patagônia. Quando misturada com diatomita, seu teor de M.O. diminuiu, porém, quando em mistura com MATR-24 (40%), esse teor aumentou para 49%.

Tabela 22 - Resultado da análise de macronutrientes nos suportes estudados (1 repetição por amostra).

Amostra	N	C	C/N	M.O.	K	Ca	Mg	Press	C/P	S	Na
	%	%		%	--mg/100 al TFSA--				-----ppm-----		
Turfa Comercial	0.75	8.0	10.67	13.76	0.05	19.8	1.3	3.0	2.60	18.6	79.0
a.T.C + 20% diatonita	0.61	6.0	9.84	10.32	0.05	20.8	1.3	3.0	2.00	7.8	106.0
T.C. + 40% diatonita	0.69	5.5	7.97	9.46	0.06	16.9	2.2	5.0	1.10	10.8	114.0
T.C + 20% MATR-24	0.69	8.5	12.32	14.62	0.80	15.8	1.8	17.0	0.50	9.6	118.0
T.C + 40% MATR-24	0.89	11.5	12.92	19.78	1.80	18.8	5.4	44.0	0.26	8.6	150.0
Turfa São José	1.24	22.5	18.14	38.70	0.05	7.3	0.1	8.0	2.81	8.8	75.0
b.T.S.J + 20% diatonita	1.03	17.0	16.50	29.24	0.05	11.4	0.2	8.0	2.12	33.4	72.0
T.S.J. + 40% diatonita	0.82	12.5	15.24	21.5	0.06	9.2	0.1	6.0	2.08	37.2	101.0
T.S.J + 20% MATR- 24	1.30	26.0	20.0	39.56	0.35	10.9	0.3	36.0	0.72	72.6	89.0
T.S.J + 40% MATR-24	1.37	29.5	26.80	49.05	0.45	10.3	0.3	68.0	0.47	71.6	94.0
Patagônia	0.89	17.5	19.66	30.01	0.13	11.4	0.5	3.0	5.8	26.6	149.0

a = T.C. = Turfa Comercial

b = T.S.J. = Turfa São José

O MATR-24 aumentou também os valores de potássio nas duas turfas e quanto a esse elemento o menor valor foi apresentado pela turfa da Patagônia de 0,13 meq/100 ml TFSA seguido pela turfa de São José + MATR-24 (20 e 40%) com os valores respectivos de 0,35 e 0,45 meq/100 ml TFSA e os valores mais altos foram apresentados pela turfa comercial mais MATR-24 (20 e 40%) com os valores respectivos de 0,80 e 1,80 meq/100 ml de TFSA. Os outros tratamentos quase não variaram entre si.

Quanto ao ⁺⁺Ca, todos os substratos utilizando turfa comercial apresentaram valores de ⁺⁺Ca superior ao da Patagônia enquanto que a turfa de São José sem aditivos apresentou valor inferior mas com aditivos esse valor foi aumentando tornando-se mais próximo ao valor da turfa da Patagônia.

Os valores referentes ao teor de ⁺⁺Mg estão aparentemente semelhantes entre si embora os valores da turfa comercial sejam superiores principalmente na mistura T.C mais 40% MATR-24, que apresentou o valor mais alto de 5,4 meq/100 ml de TFSA.

A relação C/P mostra todos os valores inferiores ao da turfa da Patagônia com um valor de 5,8 e o MATR-24 diminuiu mais esse valor para as duas turfas e a diatomita também baixou os valores em relação as turfas sem aditivos.

Os aditivos diminuíram o teor de S na turfa comercial e aumentaram tremendamente na turfa São José sendo que o MATR-24 aumentou mais que a diatomita tornando esse valor bem superior a turfa da Patagônia.

Quanto ao sódio apenas a mistura de turfa comercial + 40% MATR-24 apresentou valores semelhantes aparentemente com a turfa da Patagônia, os outros se mostraram inferiores.

A Tabela 23 mostra os teores dos micronutrientes dos substratos estudados.

Os valores para Fe, na Tabela 23, são todos inferiores a turfa da Patagônia (115,0 ppm), com exceção à T.C + 40% diatomita que se aproxima desse valor. Para a turfa São José, a adição do MATR-24 conseguiu elevar esse valor de 9,0 ppm para 16,0 com 20% e 14 com 40%.

O MATR-24 conseguiu elevar o teor de Mn na turfa comercial que com a adição de 40% equiparou-se a Patagônia, em relação a turfa São José o MATR-24 conseguiu elevar muito pouco esse teor, muito embora esse elemento possa provocar toxidez e portanto não é interessante que se apresente em grande quantidade.

Com relação ao cobre e ao boro todos os substratos apresentam valores aparentemente muito próximos. No caso do zinco, a turfa comercial apresenta valores baixos mesmo em misturas e a turfa São José, após misturas

apresenta valores próximos ao da turfa da Patagônia.

Tabela 23 - Resultado da análise de micronutrientes dos substratos estudados (1 repetição por amostra).

Amostra	Fe	Mn	Cu	Zn	B
	-----ppm-----				
Turfa Comercial	38.0	5.0	0.4	0.1	0.1
^a T.C + 20% diatonita	53.0	5.0	0.6	0.1	0.2
T.C. + 40% diatonita	108.0	5.0	0.5	0.1	0.2
T.C + 20% MATR-24	40.0	14.0	0.6	0.1	0.2
T.C + 40% MATR-24	75.0	29.0	0.4	0.2	0.3
Turfa São José	9.0	3.0	0.4	1.0	0.1
^b T.S.J + 20% diatonita	8.0	3.0	0.3	2.2	0.1
T.S.J. + 40% diatonita	31.0	2.0	0.4	2.1	0.2
T.S.J + 20% MATR- 24	16.0	4.0	0.3	2.2	0.1
T.S.J + 40% MATR-24	16.0	4.0	0.3	2.2	0.1
Patagônia	14.0	5.0	0.5	2.4	0.1

^a

= T.C = Turfa Comercial

^b

= T.S.J. = Turfa São José

Caracterização Física

Os resultados da capacidade máxima de retenção hídrica estão expressos na Tabela 24.

A turfa da Patagônia, sem sombra de dúvidas, tem uma grande capacidade de retenção de água, bem superior a qualquer outro dos substratos testados, porém a turfa São José se mostrou superior a turfa comercial e o MATR-24 contribuiu para elevar essa propriedade tanto na turfa comercial como na turfa São José.

A análise estatística a nível de 1% evidencia a superioridade da turfa Patagônia, mas não mostra diferença significativa quando comparada com a turfa São José sem mistura e em mistura com MATR-24.

Pelos resultados podemos verificar que a turfa São José quanto à capacidade de retenção de água tem um potencial bem maior quando em comparação com a turfa comercial. Superando as demais em duas características determinantes da qualidade de turfa - retenção de caldo e teor de matéria orgânica.

Tabela 24 - Percentagem máxima de retenção de água em triplicata.

Amostra	%V máxima retida			
	a	b	c	média
Turfa Comercial	75,2	78,8	63,0	72,33d
a				
T.C + 20% diatonita	47,0	73,0	76,6	65,53d
T.C. + 40% diatonita	85,0	72,4	90,2	82,53cd
T.C + 20% MATR-24	77,6	89,6	70,2	79,13d
T.C + 40% MATR-24	96,8	95,0	78,4	90,07cd
Turfa São José	151,2	174,2	154,0	159,80ab
b				
T.S.J + 20% diatonita	130,6	136,8	129,4	132,27bcd
T.S.J. + 40% diatonita	104,2	170,8	170,0	148,33bc
T.S.J + 20% MATR- 24	133,6	190,8	165,4	163,27ab
T.S.J + 40% MATR-24	173,4	182,2	160,4	172,00ab
Patagônia	251,8	241,8	191,8	228,47a

a
= T.C = Turfa Comercial

b
= T.S.J = Turfa São José

Caracterização Biológica

Os substratos foram testados após esterilização com 5,0 Mrad quanto a sobrevivência de possíveis contaminantes após inoculação com Rhizobium. A Tabela 25 mostra o número de bactérias contaminantes (média de 3 repetições) em diferentes períodos de incubação.

Foram feitos também testes para determinar a presença de fungos, actinomicetos, protozoários e leveduras nesses substratos. Não foram detectados crescimento desses grupos de microrganismos nos meios seletivos testados em nenhuma época da avaliação.

PARKER e VINCENT (1982) estudaram o efeito da radiação gama na sobrevivência de microrganismos da população natural de duas turfas e verificaram que os microrganismos mais persistentes numa dose de 2,5 - 3,4 Mrad foi um tipo de micrococcus, mixobactéria e algumas formas amebóides que persistiram devido a alta resistência a radiação e não ao grande número inicial pois os mais numerosos como bactérias esporuladas, actinomicetos, fungos filamentosos e leveduras foram destruídos. Mesmo a dose de 5 Mrad recomendada comercialmente foi baixa para a maioria dos microrganismos resistentes.

Tabela 25 - Número de colônias de bactérias contaminantes aos 10, 20, 30, 60 e 90 dias após inoculação do Rhizobium nos substratos (média de 3 repetições).

época	no. de células/g substrato				
amostra	10	20	30	60	90
	1 a	2	4	5	6
Turfa Comercial	1 x 10 ¹ aE	1 x 10 ¹ bD	7 x 10 ¹ aC	7 x 10 ¹ aB	3 x 10 ¹ bcA
T.C + 20% diatomita	1	2	4	5	6
	1 x 10 ¹ laE	1 x 10 ¹ bD	6 x 10 ¹ aC	2 x 10 ¹ aB	1 x 10 ¹ cdA
T.C. + 40% diatomita	1	2	4	5	6
	1 x 10 ¹ laD	2 x 10 ¹ bC	8 x 10 ¹ aB	1 x 10 ¹ abB	6 x 10 ¹ abA
T.C + 20% MATR-24	1	2	4	5	6
	2 x 10 ¹ laD	2 x 10 ¹ bC	6 x 10 ¹ aB	6 x 10 ¹ aA	1 x 10 ¹ cdeA
T.C + 40% MATR-24	1	3	4	5	7
	3 x 10 ¹ laE	7 x 10 ¹ aD	9 x 10 ¹ aC	6 x 10 ¹ aB	2 x 10 ¹ aA
Turfa São José	1	3	3	4	5
	1 x 10 ¹ laD	7 x 10 ¹ aC	2 x 10 ¹ bC	2 x 10 ¹ cdB	5 x 10 ¹ efgA
T.S.J + 20% diatomita	1	3	3	4	5
	1 x 10 ¹ laE	6 x 10 ¹ aC	1 x 10 ¹ bD	2 x 10 ¹ cdB	1 x 10 ¹ gA
T.S.J. + 40% diatomita	1	2	3	4	5
	1 x 10 ¹ laE	1 x 10 ¹ bD	1 x 10 ¹ bC	2 x 10 ¹ dA	7 x 10 ¹ deA
T.S.J + 20% MATR-24	1	3	3	4	5
	2 x 10 ¹ laD	9 x 10 ¹ aB	2 x 10 ¹ bC	1 x 10 ¹ dB	1 x 10 ¹ fgA
T.S.J + 40% MATR-24	1	2	3	4	5
	2 x 10 ¹ laE	4 x 10 ¹ bD	2 x 10 ¹ bC	2 x 10 ¹ dB	4 x 10 ¹ fgA
Patagônia	1	2	3	4	5
	1 x 10 ¹ laE	1 x 10 ¹ bD	2 x 10 ¹ bC	8 x 10 ¹ bcB	5 x 10 ¹ fgA

Letras minúsculas são referentes às colunas e as maiúsculas se referem às linhas.

A análise estatística foi baseada no teste de Tukey com nível de significância de 1%.

Pela Tabela 25 podemos verificar que ocorreu um fato semelhante onde a população de bactérias, no início pequena, conseguiu sobreviver mesmo após 5,0 Mrad de radiação gama e com a época vai aumentando mostrando diferença significativa entre elas. É interessante ser ressaltado que morfologicamente as colônias contaminantes eram semelhantes dando a impressão de ser um único tipo de bactéria, que após condições de desenvolvimento se multiplicaram chegando mesmo a uma possível competição com o Rhizobium como vamos ver em resultados posteriores.

Pela análise estatística podemos verificar que aos 10 dias não houve diferença no desenvolvimento de bactérias contaminantes entre os 11 substratos estudados. Aos 20 dias os tratamentos, se dividiram em 2 grupos onde 4 tratamentos mostram uma sobrevivência menor, sendo eles T.C + 40% MATR-24, turfa São José, T.S.J + 20% diatomita e T.S.J + 20% MATR-24. Essa diferença não se tornou tendenciosa uma vez que aos 30 dias os substratos também se dividem em 2 grupos sendo o primeiro formado pela turfa comercial e seus derivados e o segundo grupo formado pela turfa São José e seus derivados mais a turfa da Patagônia que mostraram menos desenvolvimento de contaminantes. Aos 60 e 90 dias houve grande diferença entre os tratamentos.

4.3.2. Sobrevivência do Rhizobium nos suportes

A sobrevivência da bactéria no suporte é um parâmetro que pode prever a qualidade da turfa, como indicativo global das propriedades físicas, químicas e biológicas.

Os 11 suportes que foram comparados no passo anterior quanto às características químicas, físicas e biológicas foram inoculados com uma estirpe marcada de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli para avaliar a sobrevivência dessa estirpe nos substratos estudados.

A sobrevivência do Rhizobium nos suportes foi avaliada por contagem em placas de Petri, com diluições sucessivas do inoculante, em meio com antibiótico seletivo para a estirpe inoculada.

Os resultados de crescimento e sobrevivência estão expressos nas Tabelas 26 e 27.

Após inoculação do veículo com o caldo impregnado da bactéria é conveniente incubar esse inoculante por um período de 10 dias à uma temperatura de 28 °C para permitir o crescimento e a multiplicação da bactéria inoculada (MATERON e WEAVER, 1985).

Na avaliação feita aos 10 dias podemos verificar que alguns substratos se destacaram pela baixa sobrevivência do Rhizobium. Esses substratos que

apresentaram aproximadamente 10⁴ células/g turfa foram as misturas efetuadas com a turfa comercial. Pelos resultados podemos verificar que os 10 dias de incubação não foram suficientes para promover bom desenvolvimento da bactéria inoculada e provavelmente tenha ocorrido uma boa queda no número após a inoculação. Aos 20 dias, porém, os valores aumentaram indicando a maturação do inoculante.

A turfa São José, assim como suas misturas apresentaram melhores resultados após o período de incubação e quando não atingiu o número de células exigido pela legislação de 10⁷ cél/g de substrato, pelo menos chegou bem próximo.

A mistura da turfa São José e 40% MATR-24 aos 10 dias apresentou um número de células semelhantes ao promovido pela turfa Patagônia.

Pela Tabela 27, onde estão expressos os valores dos logaritmos da média do número de células/g de substrato, os grupos se tornam bem evidentes existindo uma clara separação entre a turfa comercial e suas misturas, apresentando resultados inferiores, contra a turfa São José, junto com a Patagônia no grupo dos resultados superiores aos 10 dias.

Tabela 26 - Sobrevivência do Rhizobium nos suportes, média de 3 repetições do número de células de Rhizobium por grama de substrato.

Tratamento	10 dias	20 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Turfa Comercial	5 a 4,3 x 10 ⁸ dD	8 7,0 x 10 ⁸ abca	8 1,0 x 10 ⁸ cB	6 4,0 x 10 ⁸ eC	6 2,0 x 10 ⁸ deC
T.C + 20% diatonita	4 1,3 x 10 ⁸ eC	8 1,0 x 10 ⁸ deA	7 4,0 x 10 ⁸ cdA	5 6,3 x 10 ⁸ fB	6 1,6 x 10 ⁸ eB
T.C. + 40% diatonita	3 9,6 x 10 ⁸ eD	8 2,3 x 10 ⁸ cdA	7 1,6 x 10 ⁸ dB	6 1,1 x 10 ⁸ efC	6 8,6 x 10 ⁸ abcB
T.C + 20% MATR-24	4 1,0 x 10 ⁸ eD	9 1,0 x 10 ⁸ abA	8 1,3 x 10 ⁸ bcB	5 4,0 x 10 ⁸ fC	5 8,0 x 10 ⁸ eC
T.C + 40% MATR-24	4 2,3 x 10 ⁸ eC	9 2,3 x 10 ⁸ aA	8 9,7 x 10 ⁸ aA	6 6,0 x 10 ⁸ dB	7 1,6 x 10 ⁸ abB
Turfa São José	7 7,3 x 10 ⁸ abBC	8 7,3 x 10 ⁸ abca	8 8,0 x 10 ⁸ aA	8 2,0 x 10 ⁸ aB	7 2,6 x 10 ⁸ abC
T.S.J + 20% diatonita	7 1,8 x 10 ⁸ cC	8 3,3 x 10 ⁸ bcda	8 2,0 x 10 ⁸ bcAB	7 6,0 x 10 ⁸ abB	6 4,0 x 10 ⁸ cdeD
T.S.J. + 40% diatonita	7 3,0 x 10 ⁸ bcAB	7 3,6 x 10 ⁸ aAC	7 6,3 x 10 ⁸ cdA	7 1,3 x 10 ⁸ cdBC	6 7,3 x 10 ⁸ bcdeC
T.S.J + 20% MATR-24	7 3,1 x 10 ⁸ abB	8 7,6 x 10 ⁸ abca	8 5,0 x 10 ⁸ abA	7 3,6 x 10 ⁸ bcEC	7 1,0 x 10 ⁸ abC
T.S.J + 40% MATR-24	8 1,3 x 10 ⁸ aB	9 1,3 x 10 ⁸ abA	9 1,0 x 10 ⁸ aA	7 7,3 x 10 ⁸ abEC	7 3,0 x 10 ⁸ abC
Patagônia	8 1,0 x 10 ⁸ abEC	9 2,3 x 10 ⁸ aA	8 1,6 x 10 ⁸ bcB	8 1,6 x 10 ⁸ aB	7 3,3 x 10 ⁸ aC

a
= letras minúsculas comparam as colunas e maiúsculas as linhas.

Teste de Tukey a 1%.

Tabela 27 - Log da média do número de Rhizobium/g de substrato.

Tratamento	10 dias	20 dias	30 dias	60 dias	90 dias
Turfa Comercial	5,6334dD	8,8451abcA	8,0000cB	6,6620deC	6,3010deC
T.C + 20% diatonita	4,1139eC	8,0000deA	7,6020cdA	5,7993fB	6,2041eB
T.C. + 40% diatonita	3,9823eD	8,3617cdA	7,2041dB	6,0414efC	6,9345abB
T.C + 20% MATR-24	4,0000eD	9,0000abA	8,1139bcB	5,6021fC	5,9031eC
T.C + 40% MATR-24	4,3617eC	9,3617aA	8,9868aA	6,7781dB	7,2041abB
Turfa São José	7,8633abBC	8,8633abcA	8,9030aA	3,3010aD	7,4150abC
T.S.J + 20% diatonita	7,2553cC	8,5185bedA	8,3010bcAB	7,7781abB	6,6021cdC
T.S.J. + 40% diatonita	7,4771bcAB	7,5563eAB	7,7993cdA	7,1139cdBC	6,8633bcdC
T.S.J + 20% MATR-24	7,4914abB	8,8908abcA	8,6990abA	7,5563eBC	7,0000abC
T.S.J. + 40% MATR-24	8,1139aB	9,1139abA	9,0000aA	7,3633abBC	7,4771abC
<u>Patagonia</u>	8,0000abBC	9,3617aA	8,2041bcB	8,2041aB	7,5185aC

O período de incubação do inoculante é seguido pelo período de armazenamento que deve ser abaixo de 5 °C (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985). Nesse período o inoculante já deve estar pronto para o mercado e a baixa temperatura só vai ajudar a manter a qualidade do inoculante evitando perdas pelo mau armazenamento.

Aos 20 dias, praticamente todos os substratos estão dentro dos limites de sobrevivência exigidos por lei, com exceção apenas da mistura de turfa São José com 40% diatomita que apresentou uma população média de $3,6 \times 10^7$ células/g substrato, que é o limite mínimo permitido.

Uma evidência deve ser ressaltada quanto ao aditivo orgânico MATR-24, que neste período, para as duas turfas, apresentou os melhores resultados e semelhantes a turfa padrão Patagônia.

Noventa dias é um período médio de armazenamento em termos de mercado para inoculante com prazo máximo de 180 dias (AVELLA et alii, 1987), devendo mostrar porém uma população alta de Rhizobium quanto ao período inicial de desenvolvimento em torno de 10^7 cél/g de substrato, sendo recomendável 10^8 cél/g de substrato.

Pelas Tabelas 26 ou 27 podemos verificar que em alguns substratos há início de certo declínio no número de células, destacando-se o grupo constituído pela turfa comercial.

O declínio se torna evidente já aos 60 dias onde apenas dois substratos apresentam a sobrevivência de 10^8 cél/g de turfa e são representados pela turfa São José e Patagônia.

Nenhum dos aditivos conseguiu prolongar a sobrevivência do Rhizobium nas turfas testadas, embora a

turfa São José tenha se mostrado melhor que a turfa comercial.

Essas diferenças de resultados são evidenciadas pela análise estatística, que também mostra que aos 20 dias todos os substratos se mostraram aptos como suporte de inoculantes demonstrando que o período de incubação deve ser considerado como de 20 dias. De 60 dias em diante todos os tratamentos mostram uma tendência de decréscimo no número de células. Apenas alguns dos tratamentos mostram um número desejável, embora no limite mínimo de 10^7 cél/g substrato sendo eles T.C + 40% diatomita, T.C + 40% MATR-24; turfa São José, São José + 20% MATR-24, São José + 40% MATR-24 e Patagônia e esses substratos devem possibilitar uma nodulação normal e fixação de N na planta hospedeira.

2

A análise estatística do log do número de células revelou as mesmas diferenças que o número de células.

4.3.3. Eficiência do inoculante em plantas

A eficiência de um inoculante é refletida pelo número de nódulos, desenvolvimento da parte aérea, teor de N e (BHUIYA et alii, 1986), pela atividade da nitrogenase quando se é possível (DUNIGAN et alii, 1983).

Os valores apresentados a seguir são referentes a plantas de feijão (Phaseolus vulgaris) cv carioca, colhida aos 35 dias após germinação e cultivadas em vasos Leonard.

A Tabela 28 mostra valores obtidos pela avaliação da nodulação propriamente dita, promovida pela estirpe CM-01 em 11 diferentes suportes.

Vários autores (DOBEREINER et alii, 1970;SAITO, 1982; PEREIRA, 1983) estabeleceram que nem sempre o peso de nódulos é bom indicador da eficiência de uma estirpe e que muitas estirpes, embora exibindo nodulação exuberante não transportam eficientemente o nitrogênio à parte aérea (NEVES, 1986).

Pela Tabela 28 podemos verificar que em relação ao peso de nódulos não houve muita diferença entre os tratamentos e a análise estatística confirma essa afirmação. O substrato não interferiu de maneira muito significativa neste parâmetro.

Quando SPARROW & HAM (1983) estudaram a eficiência de inoculantes em vários substratos encontraram diferença significativa para número de nódulos e atividade da nitrogenase medida pela redução de acetileno. Os substratos que se destacaram foram turfa e carvão contra vermiculita, sabugo de milho, casca de amendoim e a cultura líquida do Rhizobium.

Para a maioria dos tratamentos não houve correlação entre peso de nódulos e tamanho. A turfa São José mostrou o maior peso de nódulos e também o maior tamanho de nódulos. Os tratamentos que mostraram maior número de nódulos não mostraram maior peso e está em desacordo com BHUIYA et alii (1986) quando utilizou Vigna mungo na Índia.

Tabela 28 - Peso, número, tamanho e atividade da nitrogenase/peso de nódulo (média de 3 repetições).

Substrato	Peso	no.	Tamanho	($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h.g nódulos}$)
	(mg/pl)		(μg)	
Turfa Comercial	115.6a	148a	785.38a	103.86a
T.C + 20% diatonita	99.2a	94a	1081.81a	81.97a
T.C. + 40% diatonita	108.9a	125a	1085.16a	120.13a
T.C + 20% MATR-24	114.4a	119a	1077.33a	85.14a
T.C + 40% MATR-24	110.5a	63a	1143.38a	92.87a
Turfa São José	129.7a	127a	1096.30a	110.69a
T.S.J + 20% diatonita	130.2a	193a	711.20a	108.79a
T.S.J. + 40% diatonita	117.9a	168a	724.25a	126.73a
T.S.J + 20% MATR-24	95.8a	121a	845.81a	58.17a
T.S.J + 40% MATR-24	109.2a	135a	831.63a	83.48a
Patagônia	116.7a	131a	898.06a	79.88a

Quanto à taxa de redução de acetileno os dois substratos que apresentaram os maiores valores foram misturas com 40% diatomita, tanto da turfa comercial como da São José. Em seguida foram turfa São José com 20% diatomita e São José sem mistura.

Os parâmetros referentes a parte aérea da planta estão expressos na Tabela 29, e se referem ao peso da matéria seca da parte aérea, % de nitrogênio, N total, atividade da nitrogenase e eficiência relativa.

Pela Tabela 29 podemos verificar que três dos 11 tratamentos apresentaram valores de peso da matéria seca da parte aérea muito próximos ao tratamento com nitrogênio.

Quanto ao N total dois tratamentos se destacaram superando inclusive a planta com nitrogênio e a planta inoculada com a turfa da Patagônia e foram a planta inoculada com a turfa São José sem misturas e a turfa São José com 40% MATR-24.

A turfa São José se destaca também quanto a eficiência relativa e na atividade da nitrogenase.

Quanto a eficiência relativa os maiores valores são observados para as turfas São José (89,56%), turfa São José + 20% diatomita (86,58%) e turfa São José + 40% MATR-24 (86,50%) e estatisticamente.

Tabela 29 - Média de 3 repetições de valores que avaliaram a eficiência simbiótica da estirpe CM-01 em diferentes substratos.

Tabela 29 -

Tratamento	Peso P.A. mg/pl	N %	N total mg/pl	Efic. relat. a %	Ativ. Nitrogenase $\mu\text{mo C}_2\text{H}_4/\text{h.apl}$
Turfa Comercial	0.9877a	2.47a	24.35a	80.95a	15.36a
T.C + 20% diatonita	0.8977a	2.40a	21.72a	73.58a	8.22a
T.C. + 40% diatonita	0.9550a	2.77a	26.54a	78.28a	13.06a
T.C + 20% MATR-24	0.8977a	2.31ab	20.84a	73.58a	9.42a
T.C + 40% MATR-24	0.9420a	2.66a	25.28a	77.21a	10.77a
Turfa São José	1.0927a	2.65a	28.97a	89.56a	14.71a
T.S.J + 20% diatonita	1.0563a	2.45a	25.42a	86.58a	14.38a
T.S.J. + 40% diatonit	0.9517a	2.73a	26.40a	78.00a	14.84a
T.S.J + 20% MATR-24	0.8200a	2.41a	19.46ab	67.21a	6.35a
T.S.J + 40% MATR-24	1.0553a	2.81a	29.45a	86.50a	9.30a
Patagônia	0.9573a	2.51a	23.82a	78.47a	9.29a
N	1.2210a	2.16ab	26.53a	100.00a	
T	0.2740ab	1.22b	3.28b		

$$a = \frac{\text{mg da planta nodulada}}{\text{mg da planta com nitrogênio}} \times 100$$

A atividade de nitrogenase se mostrou superior na turfa comercial e o tratamento inferior para esse parâmetro foi a São José com 20% MATR-24.

4.4. Uso do Rhizobium selecionado em suporte modificado

Nos passos anteriores de seleção de isolados de Rhizobium tolerantes à temperatura, um deles (isolado 6) se destacou em relação às características estudadas.

Na seleção de substrato, os parâmetros variaram muito mostrando uma tendência de que a turfa São José tenha se mostrado superior, independente de misturas e aditivos.

A turfa São José com 20% MATR-24 foi usada como teste de sobrevivência e eficiência do isolado 6 em comparação com a CM-01, em estudos de temperatura.

Os resultados de sobrevivência do Rhizobium estão expressos nas Tabelas 30 e 31.

4.4.1. Sobrevivência do Rhizobium

Como no experimento anterior, o período de incubação de 10 dias não foi suficiente para proporcionar crescimento de células (Tabela 30). Nos quatro tratamentos houve um decréscimo na população nesse período de incubação, em relação a população inicial. Houve uma diferença

Tabela 30 - Média de 3 repetições da sobrevivência de duas estirpes de Rhizobium (CM-01 e "6") em duas temperaturas (28 °C e 38 °C), em 4 épocas (0, 10, 20 e 30 dias após inoculação).

Tratamento	0	10	20	30
A CM-01 (28 °C)	⁸ 5,9 x 10 ⁸ abB	⁷ 4,3 x 10 ⁷ ac	⁹ 7,0 x 10 ⁹ aA	⁸ 1,3 x 10 ⁸ ac
B "6" (28 °C)	⁸ 2,7 x 10 ⁸ ba	⁷ 1,8 x 10 ⁷ abc	⁷ 5,6 x 10 ⁷ bB	⁸ 1,3 x 10 ⁸ aAB
C CM-01 (38 °C)	⁹ 1,5 x 10 ⁹ aA	⁷ 1,3 x 10 ⁷ bc	⁷ 2,0 x 10 ⁷ bBC	⁷ 5,7 x 10 ⁷ aB
D "6" (38 °C)	⁸ 8,0 x 10 ⁸ abA	⁷ 1,6 x 10 ⁷ abB	⁶ 4,0 x 10 ⁶ cC	⁷ 1,0 x 10 ⁷ bBC

estatística significativa à nível de 1% quanto a estirpe CM-01 nas duas diferentes temperaturas.

Aos 20 dias apenas o tratamento com a CM-01 a 38°C não se mostrou dentro dos parâmetros exigidos e o tratamento com a CM-01 a 28°C se mostrou o melhor para a população de Rhizobium.

Aos 30 dias, embora o tratamento com o isolado "6" a 38°C tenha atingido a população exigida, se mostrou diferente estatisticamente, e inferior aos demais à nível de 5% de significância.

Tabela 31 - Log da média do número de células/g substrato.

Tratamento	0	10	20	30
A CM-01 (28 °C)	8,7708abB	7,6335aC	9,8451aA	8,1139aC
B "6" (28 °C)	8,4313bA	7,2553abC	7,7482bB	8,1139aAB
C CM-01 (38 °C)	9,1761aA	7,1139bC	7,3010bBC	7,7482aB
D "6" (38 °C)	8,9030abA	7,2041abB	6,6020cC	7,0000bBC

Análise estatística baseada no teste de Tukey com nível de significância 1%.

Letras minúsculas comparam coluna e maiúsculas comparam linha.

Possivelmente, o número de Rhizobium mostrou uma tendência ao decréscimo no período estudado devido ao crescimento rápido de bactérias contaminantes que se mostraram presentes já aos 10 dias após inoculação do substrato.

A Tabela 32 mostra o número de bactérias contaminantes presentes nos inoculantes nos diferentes períodos de avaliação e a Tabela 33 mostra o log da média do número de células de bactérias contaminantes dos inoculantes.

Pelas Tabelas 32 e 33 podemos observar que a população de contaminantes foi crescendo com o período de armazenamento, tornando-se competidor forte do Rhizobium e após 30 dias se apresentam em número maior do que o Rhizobium inoculado.

Estatisticamente os tratamentos não diferem entre si aos 10 dias, aos 20 dias o tratamento com a CM-01 a 28 °C difere dos demais, apresentando menor número de contaminantes e aos 30 dias o número de contaminantes é muito alto existindo diferença significativa apenas entre os tratamentos com o isolado "6" à 28 °C e o tratamento com a estirpe CM-01 à 38 °C.

4.4.2. Eficiência em plantas

A eficiência em plantas foi avaliada pelos mesmos parâmetros do experimento anterior com referência a nodulação e a planta mais especificamente a parte aérea.

Tabela 32 - Numero de populações de bactérias contaminantes/g de inoculante (média de 3 repetições).

Tratamento		10 dias	20 dias	30 dias
A	CM-01	⁴ a	⁵	⁹
	(28 C)	1,5 x 10 aC	5,6 x 10 bB	2,3 x 10 abA
B	"6"	⁴	⁷	⁹
	(28 C)	1,1 x 10 AC	2,7 x 10 aB	2,6 x 10 aA
C	CM-01	⁴	⁸	⁸
	(38 C)	1,3 x 10 aB	1,0 x 10 aA	3,0 x 10 bA
D	"6"	⁴	⁷	⁸
	(38 C)	2,2 x 10 aC	4,3 x 10 aB	7,3 x 10 abA

a = letras minúsculas comparam a coluna e letras maiúsculas comparam linhas.

Tabela 33 - Log da média do número de células/g substrato.

Tratamento		10 dias	20 dias	30 dias
A	CM-01	⁴	⁵	⁹
	(28 C)	4.1761aC	5.7482bB	9.3617abA
B	"6"	⁴	⁷	⁹
	(28 C)	4.0414aC	7.4314aB	9.4149AA
C	CM-01	⁴	⁸	⁸
	(38 C)	4.1139aB	8.0000aA	8.4771bA
D	"6"	⁴	⁷	⁸
	(38oC)	4.3424aC	7.6335aB	8.8633abA

a = letras minúsculas comparam coluna e maiúsculas comparam linha.

A Tabela 34 mostra os valores referentes à nodulação.

Existe uma tendência de que o tratamento com a CM-01 à 38 °C tenha sido o pior para 3 dos parâmetros avaliados: número de nódulos, tamanho e atividade da nitrogenase, embora não exista diferença estatística significativa entre os tratamentos.

O maior peso de nódulos foi apresentado pelo tratamento com o isolado "6" à 38 °C que também apresentou o maior tamanho de nódulos.

A Tabela 35 mostra os valores referentes à avaliação da parte aérea.

Tabela 34 - Peso, número, tamanho e taxa de redução de C H /g de nódulos (média de 3 repetições) aos 2 4 35 dias após germinação.

Tratamento	peso	no.	tam.	nmolC H /hmg nód.
	mg/pl	pl	µg/nód.	2 4
A CM-01 (28 °C)	54,15a	124a	445,52a	225,89a
B "6" (28 °C)	62,25a	143a	436,56a	216,10a
C CM-01 (38 °C)	64,32a	123a	411,48a	171,08a
D "6" (38 °C)	66,87a	123a	582,62a	215,69a

Tabela 35 - Média de 3 repetições de valores da eficiência simbiótica.

Tratamento	Peso P.A. mg/pl	N %	N total mg/pl	Efic.relat. %	ativ.Nitrogenase $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{h.pl}$
A CM-01 (28 °C)	0,471b	1,78ab	8,49b	49,58b	12,16a
B "6" (28 °C)	0,495b	1,75ab	8,64b	52,14b	13,57a
C CM-01 (38 °C)	0,459b	1,75ab	8,04b	48,32b	8,73a
D "6" (38 °C)	0,519b	1,85a	9,60b	54,63b	14,10a
N	1,289a	2,00a	18,95a	100,00a	
T	0,387b	1,27b	5,01b		

5. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permite concluir que:

1. A estirpe CM-01 se mostrou superior a CM-34 nos estudos efetuados. Em condições normais de temperatura, continua sendo melhor que qualquer outro isolado obtido. A estirpe CM-01 deve continuar sendo utilizada na produção de inoculantes para feijão devido a sua estabilidade demonstrada nos testes efetuados.
2. Foi possível obter um isolado "6", originário da CM-01 com características de tolerância a altas temperaturas e eficiência em plantas.
3. A turfeira da Região de São José dos Campos, produz uma turfa com características similares a uma turfa ideal, quando comparada com as turfas comerciais, com grande potencialidade de utilização.

4. É possível a utilização de aditivos para melhorar a qualidade das turfas usadas como veículos de bactérias fixadoras de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIFY, N.M.; MOHARRM, A.A.; EL-NADY, M.A.L.; HAMDY, Y.A.; ELOSHERBINI, M.F.; LOTFI, M. Studies on the carriers of root bacteria. I. Effect of organic materials on longevity of Rhizobia in the carriers (Review). Agricultural Research, Washington, 46(2): 1-5. 1968.
- ALLISON, F.E. Soil organic matter and its role in crop production. Amsterdam, Elsevier, 1973. 637p.
- AMARGER, N. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of Rhizobium meliloti. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 13: 475-480, 1981.
- ANGLE, J.S.; PUGASHETTI, B.K.; WAGNER, G.H. Fungal effects on Rhizobium japonicum soybean symbiosis. Agronomy Journal, Madison, 73: 301-6, 1981.

- ANELIS, A.; BERKOWITZ, D.; KEMPER, D. Comparative resistance of non-sporogenic bacteria to low-temperature gamma irradiation. Applied Microbiology, Berlin, 25: 517-23, 1973.
- ANUSUYA, D. & SULLIA, S.B. The antibiotic effect of culture filtrates of some soil fungi on rizobial growth in cultures. Plant and Soil, The Hague, 77: 387-90, 1984.
- ARAUJO, S.C. Produção de inoculantes para feijão. In: REUNIAO NACIONAL SOBRE NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM Phaseolus vulgaris L., 1. Viçosa. 1974. Anais. Viçosa, UFV, 1974. 44-8.
- AVELLA, L.M.; PASTOR, M.D.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P. Growth and survival of R. meliloti 323 in liquid medium and on steam sterilized peat. Revista Latinoamericana de Microbiologia, Mexico, 29(4): 321-8, 1987.
- BARAIBAR, A.V.L. Caracterização e seleção de Rhizobium phaseoli para a produção de inoculantes comerciais. Piracicaba, 1986. 171p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP).

- BERGENSEN, F.J. Some Australian studies relating to the long-term effects of the inoculation of legume seeds. Plant and Soil, The Hague, 32: 727-36, 1970.
- BEYNON, J.L. & JOSEY, D.P. Demonstration of heterogeneity in a natural population of Rhizobium phaseoli using variation in intrinsic antibiotic resistance. Journal of General Microbiology, London, 118: 437-42, 1980.
- BHUIYA, Z.H.; ISLAM, M.R.; UDDIN, M.J.; HOQUE, M.S. Performance of some Rhizobium inoculants on black gram *Vigna mungo*. Bangladesh Journal of Agricultura Sciences, Mymensingh, 11(4): 55-64, 1986.
- BONNIER, C. Symbiose Rhizobium - legumineuses: aspects particuliers aux régions tropicales. Annales de L. Institut Pasteur, Paris, 98: 537-56, 1960.
- BOONKERD, N. & WEAVER, R.W. Survival of cowpea rhizobia as affected by soil temperature and moisture. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C., ed. BNF technology for tropical agriculture. Cali, CIAT. 1982. p. 39-44.

BOONKERD, N.; WEBER, D.F.; BEZDICER, D.F. Influence of Rhizobium japonicum strains and inoculation methods on soybeans grown in rhizobia populated soil. Agronomy Journal, Madison, 70: 547-49, 1978.

BOWEN, G.D. & KENNEDY, M.M. Effect of high soil temperatures on Rhizobium spp. Queensland Journal Agricultural Science, Brisbane, 16: 177-97, 1959.

BROCKWELL, J. Incorporation of peat inoculant in seed spelling for inoculation of Medicago tribuloides. Desr. sown in dry soil. Australian Journal Science, Melbourne, 24: 458-60, 1962a.

BROCKWELL, J. Studies on seed peluting as an aid to legume seed inoculation. I. Coating materials, adhesives, and methods of inoculation. Australian Journal Research, Melbourne, 13: 638-49, 1962b.

BROCKWELL, J. & PHILIPS, L.J. Survival at high temperatures of Rhizobium meliloti in peat inoculant on lucerne seed. Australian Journal Science, Melbourne, 27: 332-3, 1970.

BROCKWELL, J.; DUDMAN, N.F.; GIBSON, A.H.; HELY, F.W.; ROBINSON, A.C. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 9 Transaction, v.2, p. 103-14. 1968.

BROCKWELL, J. & WHALLEY, R.D.B. Studies on seed pelleting as an aid to legume seed inoculation. 2. Survival of Rhizobium meliloti applied to medic seed sown into dry soil. Australian Journal Experimental Agricultural Animal Husbandry, Melbourne, 10: 455-9, 1970.

BROCKWELL, J. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. eds. Current perspectives in nitrogen fixations. Canberra, Australia. 1981. p.208.

BROCKWELL, J.; DIATLOFF, A.; ROUGHLEY, R.J.; DATE, R.A. Selection of Rhizobium for inoculants. IN: VINCENT, J.M. ed. Nitrogen fixation in legumes. New York, Academic Press, 1982. p.173-89.

BROMFIELD, E.S.P. & JONES, D.G. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labeled antibiotic resistant mutants of Rhizobium trifolii. Annals Applied Biology, Cambridge, 91: 211-9, 1979.

- BURTON, J.C. Rhizobium Culture and use. In: PEPPLER, H.J. ed. Microbiology and Technology. New York, Van Nostrand, 1967. p. 1-33.
- BURTON, J.C. Associations of some uncommon leguminous plants with various rhizobia. In: Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical Agriculture Proceedings of a workshop. 1976. NIFTAL. 381-384. 1976.
- BURTON, J.C. New developments in inoculating legumes. In: SUBBA RAO, N.S.. ed. Recent advances in nitrogen fixation. London, Edwards Arnold, 1980. p.380-405.
- BURTON, J.C. Modern concepts in legume inoculation. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C., ed. Biological nitrogen technology for tropical agriculture. Cali, CIAT, 1982. p. 105-14.
- BUSHBY, H.V.A. & MARSHALL, R.C. Some factors affecting the survival of root. Nodule bacteria on desiccation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 9: 143-7, 1976.

CASSE, F.; BOUCHER, C.; JULLIET, J.S.; MICHEL, M.; DENARIE, J. Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarose gel electrophoresis. Journal General Microbiology, London, 113: 229-42, 1979.

CECCATO, E. Tolerância e competitividade do Rhizobium phaseoli em solo ácido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA EM CIENCIAS AGRARIAS, 5., Lavras, 1985. Lavras, ESAL, 1985.

CHAMBERS, M.A. & MONTES, F.J. Effects of some seeds desinfectants and methods of rhizobial inoculation on soybean (Glycine max L. Merrill). Plant and Soil. The Hague, 66: 353-60. 1982.

CHAO, W.L. & ALEXANDER, M. Mineral soils as carriers for Rhizobium incoulants. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 47(1): 94-7, 1984.

CHATEL, D.L. & GREENWOOD, R.M. The colonization of host--root and soil by rhizobia. II. Strain differences in the species Rhizobium trifolii. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 5: 433-40, 1973.

CHATEL, D.L. & PARKER, C.A. Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts. Soil Biology and Biochemistry, 4: 289-94, 1972.

CHHONKAR, P.D. & SUBBA RAO, N.S. Fungi associated with legume root nodule and their effect on rhizobia. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 12: 1253-61, 1966.

DATE, R.A. A decade of legume inoculant quality control in Australia. J. Austr. Inst. Agr. Sci. 35: 27-37. 1969.

DATE, R.A. Microbiologica problems in the inoculation and nodulation of legumes. Plant and Soil, The Hague, 32: 703-25, 1970.

DATE, R.A. & ROUGHLEY, R.J. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H. eds. A treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley, p.243-76, 1977.

DAY, J.M.; ROUGHLEY, R.J.; EAGLESHAM, A.R.J.; DYE, M. & WHITE, S.P. Effect of high soil temperatures on nodulation of cowpea. Vigna unguiculata. Annals of Applied Biology, Cambridge, 88: 476-81, 1978.

- DIATLOFF, A. & LANGFORD, S. Effective natural nodulation of peanuts in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science, Vrisbane, 32: 95-100, 1975.
- DIPROSE, M.F.; LYON, A.J.E.; HACKAN, R.; BENSON, F.A. Partial soil sterilization and leaf moisture content measurement by microwave radiation. In: BRITISH CROP. PROTECTION CONFERENCE WEEDS, Proceedings, 1978. p.491-8.
- DOBEREINER, J.; FRANCO, A.A.; GUSMAN, I. Estirpes de Rhizobium japonicum de excepcional eficiência. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 5: 155-61, 1970.
- DUNIGAN, E.P.; BOLLICH, P.K.; ZAUNBRECHER, F.C.; HICKS, P.M.; MORRISON, W.C. Soybean inoculation in Louisiana. Bulletin of Lousiana Agricultural Experimental Station, Baton Rouge, no. 749. 19p. 1983.
- EDEN, T. Elements of tropical soil science. 2. ed. London, McMillan, 1973. 164p.
- FAIZAH, A.W.; BROUGHTON, W.J. & JOHN, C.K. Rhizobia in tropical legumes - XI. Survival in the seed environment. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 12: 219-27, 1980.

FAO - Production Year Book 32:33. 1978.

FERRIS, R.S. Effects of microwave oven treatment on microorganism in soil. Phytopathology, Lancaster, 74: 121-6, 1984.

FONSECA, S.; SAITO, S.M.T. & VIDOR, C.A. A vantagem dos mutantes resistentes à estreptomicina. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 20(5): 609-14, 1985.

FOO, E.L. & VERMA, A.K. Inhibitory effect of Streptomyces antibioticus and other microorganisms on Rhizobium. Folia Microbiologica Prague, 21: 315-9, 1976.

FRANCO, A.A. Contribution of the legume-rhizobium symbiosis to the ecosystem and food production. In: DOBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLLAENDER, A. eds. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics, New York, Plenum. 1978a. p. 65-74.

FRANCO, A.A. Micronutrients requirements of legume - Rhizobium symbiosis in the tropics. In: DOBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLLAENDER, A. ed. Limitation and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. New York, Plenum. 1978b. p.161-71.

- FRANCO, A.A. & DOBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com Rhizobium - feijão e influência de diferentes nutrientes. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 2: 467-74. 1967.
- FRANCO, A.A. & VINCENT, J.M. Competition among rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. Plant and Soil, The Hague, 45: 27-48, 1976.
- FREIRE, J.R.J. & KOLLING, J. Alguns tópicos sobre o manejo para a maximização da fixação do N² pela simbiose Rhizobium - leguminosas. In: REUNIÃO LATINOAMERICANA SOBRE O RHIZOBIUM, 12., Campinas, 1986. Anais. Campinas, IAC, 1986. p. 461-81.
- FREIRE, J.R.J. & VIDOR, C. Fixação de nitrogênio pela simbiose R. japonicum - soja. In: MIYASAKA, J. ed. A soja no Brasil. 1978.
- GIBSON, A.H. Physical environmental and symbiotic nitrogen fixation. V. Effect of time of exposure to unfavorable root temperatures. Australian Journal of Biology Science, Melbourne, 20:1105-17, 1967.

GIBSON, A.H. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. VII. Effects of fluctuating root temperature. Australian Journal Biology Science, Melbourne, 22:839-46, 1969.

GIBSON, A.H. Factors in the physical environment effecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. Plant and Soil. The Hague (Special Volume). 139-52, 1971.

GIBSON, A.H. Limitation to dinitrogen fixation by legumes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF NITROGEN FIXATION, 1a., Pullman, 1976. Proceedings. Pullman, Washington State University Press, 1976. v.2, p. 400-28.

GIBSON, A.H. The influence of the environment and managerial practices on the legume - Rhizobium symbiosis. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H. eds. A Treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley, 1977. p.393-450.

GRAHAM, P.H. Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 29: 281-91, 1963a.

GRAHAM, P.H. Antibiotic sensitivities of the root nodule bacteria. Australian Journal Biology Science, Melbourne, 16: 557-9, 1963b.

GRAHAM, P.H.; OCAMPO, G.; RUIZ, L.D. & DUQUE, A. Survival of R. phaseoli in contact with chemical seed protectants. Agronomy Journal, Madison, 72(4): 625-7, 1980.

GRAHAM, P.H. Assessment of carrier materials for the inoculation of cowpea in Trinidad. Tropical Agriculture, Surrey, 61(1): 53-5, 1984.

GUNNING, C. & JORDAN, D.C. Studies on humus type legume inoculants. II. Preparational effectivity. Canadian Journal of Agriculture Science, Ottawa, 34:225-33, 1954.

HABTE, M. Seletive medium for recovering specific populations of Rhizobium introduced into tropical soils. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 50(6): 1553-5, 1985.

HALLIDAY, J. & GRAHAM, P.H. Coal compared to peat as a carrier of rhizobia. Turrialba, 28: 348-9, 1978.

HAVELKA, V.D. & HARDY, R.W.F. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.D. ed. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge, Cambridge University Press. 1976. p.421-39.

HEDLIN, R.A. & NEWTON, J.D. Some factors influencing the growth and survival of rhizobia in humus and soil culture. Canadian Journal of Research, Ottawa, 26: 174-87, 1948.

HELY, F.W.; BERGERSEN, F.J. & BROCKWELL, J. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 8: 24-44, 1957.

HERRIDGE, D.F. & ROUGHLEY, R.J. Survival of some slow-growing Rhizobium on inoculated legume seed. Plant and Soil, The Hague, 40:441-4, 1974.

HOLLAND, A.A. & PARKER, C.A. Studies on microbial antagonism in the establishment of clover pasture. II. The effect of saprophytic soil fungi upon Rhizobium trifolii and the growth of subterranean clover. Plant and Soil, The Hague, 25:329-40, 1966.

- HOLLAND, A.A. & STREET, J.E. Range-legume inoculation and nitrogen fixation by root-nodule bacteria. California Agriculture, Bekiley, 23:842-4, 1969.
- HO OYKAAS, P.J.J.; VANBRUSSEL, A.A.N.; DEN DULK-RAS, H.; VAN SLOGTEREN, G.M.S.; SCHILPEROORT, R.A. Sym plasmid of Rhizobium trifolii expressed in different rhizobial species and Agrobacterium tumefaciens. Nature 291: 351-353. 1981.
- HOSSAIN, A.K.M. & ALEXANDER, M. Enhancing soybean rhizosphere colonization by Rhizobium japonicum. Applied and Environment Microbiology, Baltimore, 48:468-72, 1984.
- HUNGRIA, M. Eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio x evolução do H₂ x respiração dos nódulos de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) Piracicaba, 1981. 190p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP).
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; VICTÓRIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, de redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 9:193-200, 1985.

HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de Phaseolus vulgaris e estirpes de Rhizobium phaseoli na fixação e transporte de nitrogênio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 21(2):127-40, 1986.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. & VICTORIA, R.L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N fixado. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 9:201-9, 1985b.

ISWARAN, V. Effect of aeration on survival of Rhizobium japonicum in peat contained in polythene bags. Mysore Journal of Agricultural Science, Karnataka, 5:230-2, 1971.

ISWARAN, V. Growth and survival of Rhizobium trifolii in coir dust and soybean meal compost. Madras Agricultural Journal, Tamilnadu, 59:52-3, 1972.

JONES, D.G. & BROMFIELD, E.S.P. A study of the competitive ability of streptomycin and spectinomycin mutants of Rhizobium trifolii using various marker techniques. Annals of Applied and Biology, Cambridge, 88:445-87, 1978.

JOSEY, D.P.; BEYNON, J.L.; JOHNSTON, A.W.B. e BERINGER, J.E. Strain identification in Rhizobium using intrinsic antibiotic resistance. Journal of Applied Bacteriology, reading, 46:343-50, 1979.

KADO, C.I. & LIU, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology, Baltimore, 145(3):1365-73, 1981.

KIEHL, E.J. Manual de Edafologia. Relações solo-planta. São Paulo, Editora Ceres. 1979.

KISHINEVSKY, B. & BAR-JOSEPH, M. Rhizobium strain identification in Arachis hypogaea nodules by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Canadian Journal Microbiology, Ottawa, 24: 1537-43, 1978.

KOSSLAK, R.M. & BOHLOOL, B.B. Influence of environmental factors on interstrain competition in Rhizobium japonicum. Applied and Enviromental Microbiology, Baltimore, 49(5):1128-33, 1985.

KREMER, R.J. & PETERSON, H.L. Field evaluation of selected Rhizobium in an improved legume inoculant. Agronomy Journal, Madison, 75:139-43, 1983.

- KREMER, R.J.; SWEARINGIN, M.L.; BECKHAM, L.S. Response of soybeans to commercial soil-applied inoculants. Agronomy Journal, Madison, 70:517-18, 1978.
- LABANDERA, C.A. Producción y uso de inoculantes para leguminosas. In: REUNIAO LATINOAMERICANA SOBRE RHIZOBIUM. 12., Campinas. 1986. Anais. Campinas, IAC, 1986. p. 502-11.
- LEE, K. & DOBEREINER, J. Effect of excessive temperatures on growth of cowpea type Rhizobia " in vitro", on nodulation and on nitrogen fixing activity in symbiosis with siratro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 17(2): 181-4. 1982.
- LOPES, E.S. & GIARDINI, A.R. Survival of R. phaseoli in sterilized peat. Bragantia, Campinas, 36: 1-5, 1977.
- LOPRETO, C.R. Estudio comparativo de crecimiento celular y capacidad de fijación de nitrógeno de una cepa de Rhizobium japonicum. Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata, La Plata 49:201-12, 1973.

LOPRETO, C.R.; MAZZA, L.A.; BALATTI, A.P. Production of soybean inoculants. Studies on carriers prepared with materials of National origin. Revista de la facultad de Agronomia de La Plata, La Plata. 51(1): 34-41, 1975.

MAHLER, R.L. & BEZDICEK, D.F. Diversity of Rhizobium leguminosarum in the Palouse of Eastern Washington. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 36: 780-2, 1978.

MALAVOLTA, E. Matéria orgânica. In: Manual de química agrícola. São Paulo, Agronomica Ceres, 1976. p. 177-202.

MALLIK, M.A.B. & TESFAI, K. Compatibility of Rhizobium japonicum with commercial pesticides "in vitro". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, New York, 31: 432-7, 1983.

MALLIK, M.A.B. & TESFAI, K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. Plant and Soil, The Hague, 85:33-41, 1985.

MARSHALL, K.C. & ROBERTS, F.J. Influence of fine particle materials on survival of Rhizobium trifolii in sandy soil. Nature, London, 198:410-1, 1963.

MARSHALL, K.C. Survival of root nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. Australian and Environmental Microbiologia Research, Melbourne, 15(2): 273-81, 1964.

MATERON, L.A. & WEAVER, R.W. Inoculant maturity influences survival of rhizobia on seed. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 49(2):465-7, 1985.

Mc KNIGHT, T. Efficiency of isolates of Rhizobium in the cowpea group with proposed additions to this group. Queensland Journal Agricultural of Agricultural Science, Brisbane, 6:61-76, 1949.

MIRCEN (Microbiological Resources Center) Proceedings of the workshop on Rhizobium/legume inoculants. Porto Alegre. Brasil. 1985.

MORETTI, V.L. & SAITO, S.M.T. Crescimento e sobrevivência de R. phaseoli em torta de filtro de cana, "peat-moss" e turfa comercial. O Solo, Piracicaba, 70(1): 44-8, 1978.

MUNEVAR, F. & WOLLUM, A.G. II. The legume/Rhizobium association as affected by high root temperature. In: GRAHAM, P. H. & HARRIS, S. C., ed. Biological N fixation technology for tropical agriculture. Cali, CIAT. 1982. p. 173-82.

MUNNS, D.N.; FOSLE, V.W.; HALLOCK, B.G. Alfafa root nodule distribution and inhibition of nitrogen fixation by heat. Agronomy Journal, Madison, 69: 377-80, 1977.

NEVES, M.C.P. Manejo da FBN, efeitos de estirpes de Rhizobium. In: REUNIÃO LATINOAMERICA SOBRE RHIZOBIUM, 12., Campinas, 1986. Anais. Campinas, IAC, 1986. p.485-8.

NEWBOULD, F.H.S. Studies on humus type legume inoculants. Science Agriculture, University Park, 31:463-69, 1951.

ODEYEMI, O. & ALEXANDER, M. Use of fungicide-resistant rhizobia for legume inoculation. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 9:247-51, 1977.

OKON, Y.; VOLFOVITCH, M.; HENIS, Y. e PINTHUS, M.J. Inoculation of soybenas (Glycine max) in Israel with Rhizobium japonicum. Experimental Agriculture, London 15: 267-72, 1979.

OZAWA, T.; TAKEMI, A. e YAMAGUCHI, M. Decrease in the proportion of cells capable of inducing nodules to the population of Rhizobium japonicum introduced into soil. Soil Science Plant Nutrition, Tokyo, 30(4):479-84, 1984.

PACOVSKY, R.S.; BAYNE, H.G & BETHLENFALVAY, G.S. Symbiotic interactions between strains of Rhizobium phaseoli and cultivars of Phaseolus vulgaris L. Crop Science, Madison, 24:101-5, 1984.

PANKHURST, C.E. Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant mutants of fast and slow-growing strains of Rhizobium nodulating Lotus species. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 23:1026-33, 1977.

PANTHIER, J.J.; DIEM, H.G. & DOMMERGUES, Y. Rapid method to enumerate and isolate soil actinomycetes antagonistic towards rhizobia. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 11:443-5, 1979.

PARKER, C.A.; TRINICK, M.J. e CHATEL, D.C. Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants. In: HARDY, R.W.F. & GIBSON, A.H. ed. A treatise on dinitrogen fixation. New York, John Wiley, 1977. p.311-52.

- PARKER, F.E. & VINCENT, J.M. Sterilization of peat by gamma radiation. Plant and Soil, The Hague, 61(2):285-93, 1982.
- PATEL, J.J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant and Soil, The Hague, 41:395-402, 1974.
- PEREIRA, J.C. Obtenção e avaliação de mutantes espontaneos de Rhizobium phaseoli resistentes a antibióticos e fungicidas. Porto Alegre, 1983. 88p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- PETERSON, H.L. & LOYNACHAN, T.E. The significance and application of Rhizobium in agriculture. International Review of Cytology, New York, 13:311-31, 1981.
- PHILPOTTS, H. Effect of inoculation method on Rhizobium survival and plant nodulation under adverse conditions. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 17: 308-15, 1977.
- PINTO, C.M.; PHAIKIY, Y. & VINCENT, J.M. Nodulating competitiveness amongst strain of Rhizobium meliloti and R. trifolii. Australian Journal of Agricultural Research, Melbourne, 25:317-29, 1974.

PONS, A.L. Importância da matéria orgânica no solo. IPAGRO Informa, Porto Alegre, 23:96-109, 1980.

PONS, A.L. Matéria orgânica e disponibilidade de nitrogênio para as plantas. IPAGRO informa Porto Alegre, 26:55-66, 1983a.

PONS, A.L. Fontes e usos de matéria orgânica. IPAGRO informa, Porto Alegre, 26:111-47, 1983b.

PUGASHETTI, B.K.; ANGALE, J.J. & WAGNER, G.H. Microorganisms antagonistic towards R. japonicum. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 14:45-9, 1982.

RADCLIFFE, J.C.; MCGUIRE, W.S. & DAWSON, M.D. Survival of rhizobia on pelluted seeds of Trifolium subterraneum L. Agronomy Journal, Madison, 59:56-8, 1967.

RAMOS, M.L.G. & BODDEY, R.M. Yield and nodulation of Phaseolus vulgaris and the competitiveness of an introduced Rhizobium strain: effects of lime, mulch, and repeated cropping. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 19: 171-7, 1987.

RANDRUP, R.G. Obtencion de inoculantes para leguminosas. Estudos de soportes constituídos fundamentalmente a base de turba. La Plata, 1979. 162p. (Doutorado - Facultad de Ciências Extas de La Plata).

RANDRUP, R.G. Inoculation of soyabean. Some factors affecting the survival of the micro-organisms. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 15(4):461-9, 1980.

RANDRUP, R.G. Parâmetros e técnicas de caracterização dos materiais a serem empregados como suporte de inoculantes. In: SEMINARIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2., Brasília, 1981. Anais. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 1982. v.2, p.685-782.

RATNER, E.I.; LOBEL, R.; FELDHA, Y.H. & HARTZOOK, A. Some characteristics of symbiotic nitrogen fixation, Yield, protein and oil accumulation in irrigated planuts (Arahis hypogaea L.) Plant and Soil, The Hague, 51:373-86, 1979.

REDDY, V.M. & TANNER, J.W. The effects of irrigation, inoculants, and fertilizer nitrogen on peanuts. (Arachis hypogaea L.) I. Nitrogen fixation. Plant and Science, The Hague, 7:114-9, 1980.

ROBINSON, R.S. The antagonistic action of the by - products of several soil microorganisms on the activities of the legume bacteria. Soil Science Society of America Proceeding, Ann Arbor, 10:206-10, 1945.

ROUGHLEY, R.J. Some factors influencing the growth and survival of root nodule bacteria in peat culture. Journal of Applied Bacteriology, reading, 31:259-65, 1968.

ROUGHLEY, R.J. Preparation and use of legume seed inoculant. Plant and Soil, The Hague, 32: 675-701, 1970.

ROUGHLEY, R.J.; BLOWES, W.M. & HERRIDGE, D.F. Nodulation for Trifolium subterraneum by introduced rhizobia in competition with naturalized strain. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 8:403-7, 1976.

ROUGHLEY, R.J. & VINCENT, J.M. Growth and survival of Rhizobium spp in plant culture. Journal Applied Bacteriology, Reading, 30(2):362-76, 1967.

SAITO, S.M.T. N-interaction in the maize-bean association. In: GRAHAM, P. H. & HARRIS, S. C., ed. BNF technology for tropical agriculture. Cali, CIAT, 1982a. p. 631-9.

- SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de Rhizobium phaseoli. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, 17(7):999-1006, 1982b.
- SAITO, S.M.T.; ARAUJO, J.M.; BARAIBAR, A. e GALLI, L.V. Survival of Rhizobium in the carrier. In: WORKSHOP ON RHIZOBIUM/LEGUME INOCULANTS, Porto Alegre, 1985. Proceedings. Porto Alegre, UFRGS, 1985. p.145-56.
- SAITO, S.M.T. & CARDOSO, E.J.B.N. Seleção de estirpes de Rhizobium phaseoli para o feijoeiro cv carioca. O Solo, Piracicaba, 69(1):44-7, 1977.
- SAITO, S.M.T. & FREITAS, J.R. Eficiência e especificidade hospedeira de Rhizobium phaseoli em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.). O Solo, Piracicaba, 74: 71-5, 1982.
- SAITO, S.M.T.; MARTINS, E.C.S.; FREITAS, J.R.; ROSTON. A.J. Levantamento da presença de micorriza e Rhizobium phaseoli naturalmente estabelecidos em áreas com feijoeiro. Goiânia, p. 320-322. 1982.
- SAITO, S.M.T. & RUSCHEL, A.P. Capacidade competitiva e sobrevivência no solo de uma estirpe de R. phaseoli usada como inoculante. Ciência e Cultura, São Paulo, 32(7):888-92, 1979.

SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ, 1979. 27p. (Mimeografado).

SCHWINGHAMER, E.A. & DUDMAN, W.F. Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with Rhizobium spp. Journal of Applied Bacteriology, Reading, 36:263-72, 1973.

SCOTTI, M.R.M.M.L.; SA, N.M.H.; VARGAS, M.A.T.; DOBEREINER, T. Streptomycin resistance of Rhizobium isolates from Brazilian cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciências. Rio de Janeiro, 54:733-8. 1982.

SCUDDER, W.T. Rhizobium inoculation of soybeans for subtropical and tropical soils. 1. Initial field trials. Proc. Soil Crop Sci. Soc. Fla. 34: 79-82. 1975.

SETHI, R.P. & SUBBA RAO, N.S. Inhibitory or stimulatory effect of soil fungi on rhizobia. Journal General and Applied Microbiology, Tokyo, 14:325-27, 1968.

SKIPPER, H.D.; PALMER, J.H.; GIDDENS, J.E.; WOODRUFF, J.M. Evaluation of commercial soybean inoculants from South Carolina and Georgia. Agronomy Journal, Madison, 72: 673-4, 1980.

SIMS, J.L.; SIGAFUS, R.E.; TIARANA, N. Effect of lime, inoculant and molybdenum pelluting on growth and nitrogen content of crown vetch. Agronomy Journal, Madison, 66: 446-9, 1974.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. Methods in Legume-Rhizobium technology. Qashington, USAID, 1985. p.296-7.

SOMASEGARAN, P.; REYERS, U.G.; HOBEN, H.J. The influence of high temperatures on the growth and survival of Rhizobium spp in peat inoculants during preparation. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 30(1):23-30, 1984.

SPARROW, S.D.Jr & HAM, G.E. Survival of Rhizobium phaseoli in 6 carrier materials. Agronomy Journal, Madison, 75(2):181-4, 1983.

SPEIR, T.W.; COWLING, J.C.; SPARLING, G.P.; WEST, A.W.; CORDEROY, D.M. Effects of microware radiation on the microbial biomass, phosphature activity and levels of extractable N and P in a low fertility soil under pasture. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 18(4):377-82, 1986.

STAPHORST, J.L. & STRIJDOM, B.W. Effects on rhizobia of fungicides applied to legume seed. Phytophylactica Pretoria, 8:47-54, 1976.

STOVOLD, G.E. & EVANS, J. Fungicide seed dressings, their effects on emergence of soybean and nodulation of pea Pisum sativum and soybean Glycine max. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, Melbourne, 20(105):497-503, 1980.

STRIDJDOM, B.W. & DESCHODT, C.C. Carriers of rhizobia and the effects of prior treatment on survival of rhizobia pp. 151-168. In: NUTMAN, P.S. ed. Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge, Cambridge University Press, 1976.

STRIJDOM, B.W. & RENSBURG, H.J. van. Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of rhizobium inoculants. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 41(6):1344-7, 1981.

SUBBA RAO, N.S. Soil microrganisms and plant growth. Oxford, IBH, 1977.

THORNTON, G.D.; ALENCAR, J. de; SMITH, F.B. Some effects of Streptomyces albus and Penicillium spp. on Rhizobium meliloti. Soil Science Society of American, Proceeding, Ann Arbor, 14: 188-91, 1949.

TISDALE, S.L. & NELSON, N.L. Soil fertility and fertilizers. New York, MacMillan. 1975.

TRINICK, M.J. Biology. In: BROUGHTON, W.J. ed. The ecology of nitrogen fixation, Oxford, Oxford University Press, 1981. v.2, p. 76-146.

TRINICK, M.J.; PARKER, C.A. e PALMER, M.J. Interaction of the microflora from nodulation problem and non-problem soils towards Rhizobium spp on agar plates. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 15: 295-301, 1983.

TRINICK, M.J. & PARKER, C.A. Self inhibition of rhizobial strains and the influence of cultural conditions on microbial interactions. Soil Biology and Biochemistry, Oxford 14: 79-86, 1982.

TU, C.M. Effect of fungicides on growth of Rhizobium japonicum "in vitro". Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, New York, 25: 364-8, 1980.

TURCO, R.F.; MOORMAN, T.B.; BECDICEK, D.F. Effectiveness and competitiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutants of Rizobium leguminosarum and Rhizobium japonicum. Soil Biology and Biochemistry Oxford, 18(3): 259-62, 1986.

VALARINI, M.I. Aspectos genéticos e ecológicos em espécies de Rhizobium. Piracicaba. 1980. 92p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP).

VAN SCHREVEAN, D.A. Methods used in the Netherlands for the production of legume inoculants. In: HALLSWORTH, E.G. ed. Nutrition of legumes. London, Butterworth, 1958. p.328-33.

VAN SCHREVEAN, D.A. Ontwikkeling van de methodiek von entstoffen voor vlinderbloemige gewassen en de controle van rhizobium stammen in bet microbiologisch laboratorium. Van. Zee ot Land, Zwolle, 36: 88-108, 1963.

VAN SCHREVEAN, D.A.; OTZEN, D.; LINDENBERGH, D.J. On the production of legume inoculants in a mixture of peat and soil. Antonie von Leeuwenhoek, Amsterdam 20: 33-57. 1954.

VAN SCHREVEAN, D.A. Some factors affectin growth and survival of Rhizobium spp in soil peat cultures. Plant and Soil, The Hague, 32:113-30, 1970.

VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja cultivada em um solo de cerrado. Pesquisa Agropecuaria Brasileira, Brasília, 15: 343-7, 1980.

VELA, G.R. & WU, J.F. Mechanism of lethal action of 2450-MH radiation on microrganisms. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 37: 550-3, 1979.

VIDOR, C. Microbial constrainsts to legume symbiosis. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. ed. BNF Technology for Tropical Agriculture. Cali, CIAT. 1981. p.183-94.

VIDOR, C.; BROSE, E.; PEREIRA, J.S. Competição por sitios de infecção nodular entre estirpes de R. japonicum em culturas de soja. (Glycine max L. Merr). Agronomia Sulriograndense, Porto Alegre, 15(2): 227-38, 1979.

VINCENT, J.M. Serological studies of the root nodule bacteria. I. Strains of Rhizobium meliloti. Proc. Linnean Soc. New South Wales. 66: 145-154. 1941.

VINCENT, J.M. Principles of strain selection. In: INTERNATIONAL GRASS CONGRESS, 1956. Proceedings, v.2, p.179-89. 1956.

VINCENT, J.M. Survival of the root nodule bacteria. In: Nutrition of the legumes. Proc. Univ. Nottingham 5th Easla School in Agric. Sci. 1958.

VINCENT, J.M. Environmental factors in the fixation on nitrogen by legumes. In: BARTHOLOMEW, W.V. G&e CLARR, F.G. ed. Soil Nitrogen. Madison, ASA, 1965. p.384-435.

VINCENT, J.M. Basic considerations affecting the practice of legume seed inoculation. In: Festschrift til Hans Laurits Jensen 145-158. Gadgaard Melsens Bogtrykkeri, Lemvig, Denmark. 1968.

VINCENT, J.M. Manual of the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Backwell, 1970. 163p. (International Biological Program Handbook, 15).

VINCENT, J.M. Root-nodule symbiosis with Rhizobium. In: QUISPTEL, A., ed. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North. Holland, 1974. p.265-341.

- VINCENT, J.M. Rhizobium: General Microbiology. In: HARDY, R.W.F. & SILVER, W.S. ed. A Treatise on dinitrogen fixation section. New York, John Wiley, 1977. p. 277-366.
- VOSS, M.; FREIRE, J.R.J.; SELBACH, P.A. Potencial de fixação de N₂ de estirpes de Rhizobium phaseoli de regiões produtoras de feijão no Estado do Rio Grande do Sul. Revista Brasileiro Ciência do Solo, Campinas, 7: 2203-7, 1983.
- WAINWRIGHT, M.; KILLHAM, K.; DIPROSE, M.F. Effects of 2450 MH₂ microwave radiation on nitrification, respiration and S-oxidation in soil. Soil Biology Biochemistry, Oxford, 12: 489-93, 1980.
- WAKSMAN, S.A. & RAILLY, M.C. Agar streak assay method for assaying antibiotic substances. Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition, Washington, 17: 556-8, 1945.
- WILKINS, J. The effect of high temperatures on certain root nodule bacteria. Australian Journal of Agriculture Research, Melbourne, 18: 229-304, 1967.

WILSON, D.O. & TRANG, K.M. Effects of storage temperature and enumeration methods on Rhizobium spp. Numbers in peat inoculants. Tropical Agriculture, Surrey, 57: 233-8, 1980.

ZURKOWSKY, W. & LORKIEWICZ, Z. Effective methods for the isolation of non-nodulating mutants of Rhizobium trifolii. Genetical Research, London. 32: 311-4. 1978.

ZURKOWSKY, W. & LORKIEWICZ, Z. Plasmid-mediated control of nodulation in Rhizobium trifolii. Archivies of Microbiology, Berlin, 123: 195-201, 1979.

ZURKOWSKI, W. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of Rhizobium trifolii. Journal Bacteriology, Baltimore, 150(3):999-1007, 1982.