

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**  
**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Composições Poliméricas a Base de  
Carboximetilcelulose (CMC) e Amido como  
Veículos de Inoculação de Rizóbio em  
Leguminosas**

**Paulo Ivan Fernandes Júnior**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE AGRONOMIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**COMPOSIÇÕES POLIMÉRICAS A BASE DE  
CARBOXIMETILCELULOSE (CMC) E AMIDO COMO  
VEÍCULOS DE INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO EM LEGUMINOSAS**

**PAULO IVAN FERNANDES JUNIOR**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Paulo Jansen de Oliveira**

*e Co-orientação da Pesquisadora*  
**Norma Gouvêa Rumjanek**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências** em  
Agronomia, Área de Concentração  
em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2006

635.6592

F363c

T

Fernandes Júnior, Paulo Ivan, 1981-  
Composições poliméricas a base de  
carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos  
de inoculação de rizóbio em leguminosas / Paulo Ivan  
Fernandes Júnior. – 2006.  
43 f. : il.

Orientador: Paulo Jansen de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de  
Agronomia.

Bibliografia: f. 37-43.

1. Feijão-de-corda - Inoculação – Teses. 2.  
Leguminosa - Inoculação - Teses. 3. Rizóbio –  
Teses. 4. Soluções poliméricas – Teses. I. Oliveira,  
Paulo Jansen de, 1965-. II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III.  
Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

**PAULO IVAN FERNANDES JÚNIOR**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, em Agronomia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2006

---

Paulo Jansen de Oliveira. Dr. UFRRJ  
(Orientador)

---

Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Dr. UFRRJ

---

Marivaine da Silva Brasil. Dra. Nitral Urbana

## DEDICATÓRIA

*A memória de Leila Terra Fernandes,  
cujas últimas palavras proferidas a  
mim servem de motivação até hoje.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Paulo Jansen de Oliveira e à Pesquisadora Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação na elaboração deste trabalho.

Ao pesquisador Gustavo Ribeiro Xavier pela colaboração com sugestões e na discussão dos resultados.

Ao CPGA-CS e à Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de realizar este trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

A meu pai Paulo Ivan Fernandes, e minhas tias Leda Terra e Emília Maria da Fernandes, pelo incentivo dado a mim desde o início dos estudos, até o presente.

Aos companheiros do laboratório de Ecologia Microbiana Samuel Passos, Rejane Guedes, Alanir Bratti, Adriano Knupp, Anelise Dias, Cláudia Paixão, Sheila Vasconcelos, Enderson Ferreira, Marcela Drechsel, Marcela Aboim, Rafael Pacheco, Glória Botelho, Cláudia Martins, Rachel Pinton, Gessimar Andrade (Mazinho) e especialmente João Luiz Bastos pela amizade e pelo ambiente de trabalho extremamente agradável.

Especial agradecimento aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Ecologia Microbiana Leandro Simões Gonçalves Azeredo e Jamileh Costa Carvalho, pela ajuda na realização dos experimentos e discussão dos dados.

Aos grandes amigos Thiago do Valle Paiva, Sandro da Silveira Júnior, Wardsson Lustrino Borges, Carlos Brasil Batista Júnior, Alicia Santana de Castro e Alexandre Souza Mendes Borges pelo companheirismo e amizade, beirando a cumplicidade em certos momentos.

A Priscila Castilho Gouvêa pelo incentivo, amizade, cumplicidade, compreensão, carinho e preocupação.

Aos grandes amigos alemparaibanos João Batista Pinheiro da Costa e Roberto César Júnior Costa Miguel pela amizade e pelos momentos vividos juntos na cidade natal.

A Sociedade Brasileira por ter financiado os meus estudos, direito o qual poucos têm a oportunidade de gozar.

## **BIOGRAFIA**

Paulo Ivan Fernandes Júnior filho de Leila Terra Fernandes e Paulo Ivan Fernandes, nasceu em Além Paraíba, Minas Gerais em 06 de março de 1981. Mudou para Mogi das Cruzes (SP) em 1982, onde morou por 10 anos, até retornar para Além Paraíba, onde concluiu o ensino fundamental em 1995 e o ensino médio em 1998. Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no primeiro semestre de 1999 no curso de graduação em ciências biológicas. Durante a graduação exerceu atividades de pesquisa como bolsista de iniciação científica no laboratório de coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Concluiu a licenciatura em ciências biológicas em março de 2003 e o bacharelado em ecologia em outubro do mesmo ano. Ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo em 2004, desenvolvendo o seu trabalho junto ao laboratório de Ecologia Microbiana na Embrapa Agrobiologia.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
	2.1 Fixação Biológica do Nitrogênio.....	3
	2.2 Inoculação de Estirpes de Rizóbio como Alternativa à Adubação Nitrogenada	4
	2.3 Produção de Inoculantes.....	5
	2.4 Veículos de Inoculação .....	7
	2.5 Turfeiras: Características Gerais e Peculiaridades .....	9
	2.6 Utilização da Misturas Poliméricas .....	10
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
	3.1 Seleção do Método de Preparação de Misturas Poliméricas.....	12
	3.2 Estirpe Bacteriana: Condições de Crescimento e Incubação.....	12
	3.3 Sobrevivência de Células Rizobianas em Composições Poliméricas a Base de CMC e Amido.....	13
	3.4 Contagem de Células Rizobianas em Sementes Pré-Inoculadas Utilizando Misturas Poliméricas ou Turfa como Veículos de Inoculação .....	13
	3.5 Experimento em Condições de Casa de Vegetação.....	14
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	16
	4.1 Seleção de Método para o Preparo das Composições Poliméricas .....	16
	4.2 Avaliação das Composições Poliméricas Compatibilizadas com ZnO e Não Compatibilizadas, como Veículo de Inoculante Rizobiano Durante 30 Dias de Armazenamento.....	18
	4.3 Avaliação das Composições Poliméricas Compatibilizadas com MgO e não Compatibilizadas, como Veículo de Inoculante Rizobiano.....	22
	4.4 Comparação da Turfa usada como o Veículo para o Inoculante Sólido Comercial, com Veículos Preparados a partir de Composições Poliméricas a Base de CMC/Amido Compatibilizadas com ZnO e MgO.....	26
	4.5 Avaliação da Sobrevivência de Células Rizobianas em Sementes de Feijão Caupi Peletizadas Utilizando Inoculantes Preparados a Partir de Diferentes Veículos.....	29
	4.6 Desenvolvimento e Nodulação de Feijão Caupi Inoculado com Inoculantes Preparados a partir Diferentes Veículos em Condições de Casa de Vegetação. . . . .	32
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	35
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	36
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Aumento de pH da mistura polimérica em função do percentual de ZnO (A) e MgO (B). ..... 17
- Figura 2:** Sobrevivência de células rizobianas inoculadas utilizando-se como veículos composições poliméricas CMC/amido M3 e M4 não compatibilizadas (A), compatibilizadas com 1% ZnO (B) e compatibilizadas com 1% de MgO (C) e turfa (Barras representam o desvio padrão). NC= Não compatibilizado. .... 31
- Figura 3:** Nodulação de feijão caupi aos 35 DAE (Coleta 1) e 50 DAE (Coleta 2) inoculado com a estirpe BR 3267 de *B. japonicum*, utilizando diferentes veículos de inoculação. (Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. Não houve diferenças estatísticas para a primeira coleta). ..... 33

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composições poliméricas utilizadas nos experimentos de seleção de misturas para um período de incubação de 30 dias a temperatura ambiente. Os agentes compatibilizantes foram o óxido de zinco (ZnO) e o óxido de magnésio (MgO)..	12
<b>Tabela 2:</b> Resultado da análise da amostra de solo, utilizadas no experimento de casa de vegetação. ....	14
<b>Tabela 3:</b> pH das misturas poliméricas compatibilizadas com ZnO.....	16
<b>Tabela 4:</b> pH das misturas poliméricas compatibilizadas com MgO.....	17
<b>Tabela 5:</b> Sobrevivência de células de <i>B. japonicum</i> (BR 3267) armazenadas até 30 dias após a inoculação (DI) a temperatura ambiente em diferentes proporções de composições poliméricas a base de CMC/ Amido (M1; M2; M3; M4; M5) compatibilizadas com ZnO (1, 1.5 e 2.5%) e não compatibilizadas.....	19
<b>Tabela 6:</b> Análise de variância dos dados referentes à sobrevivência das células rizobianas incubadas em composições poliméricas compatibilizadas com ZnO e não compatibilizadas, aos 23 e 30 dias após a inoculação. ....	21
<b>Tabela 7:</b> Sobrevivência de células de <i>B. japonicum</i> (BR 3267) armazenadas por 30 dias a temperatura ambiente em diferentes proporções de composições poliméricas a base de CMC/ Amido (M1; M2; M3; M4; M5) compatibilizadas com MgO (1, 1.5 e 2.5%) e não compatibilizadas. ....	23
<b>Tabela 8:</b> Análise de variância dos dados referentes à sobrevivência das células rizobianas incubadas em composições poliméricas compatibilizadas com MgO e não compatibilizadas, aos 23 e 30 dias após a inoculação. ....	25
<b>Tabela 9:</b> Sobrevivência de células de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (estirpe BR 3267) durante 3 meses a temperatura ambiente inoculadas em misturas poliméricas a base de CMC e amido nas proporções M3 e M4, com ou sem agente compatibilizante (1% ZnO ou MgO).....	28
<b>Tabela 10:</b> Concentração de células presentes em sementes de feijão caupi após a peletização com inoculantes formulados com diferentes veículos e com o estirpe BR 3267 de <i>B. japonicum</i> (valores são médias de 3 repetições). ....	29
<b>Tabela 11:</b> Matéria seca e Nitrogênio total da parte aérea das plantas de feijão caupi inoculadas com diferentes veículos e coletadas aos 35 (coleta 1) e aos 50 (coleta 2) DAE. ....	34

## RESUMO

FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas.** Seropédica: UFRRJ. 2006. 43f. (Dissertação, Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo).

Esse estudo teve por objetivo avaliar a eficiência de composições poliméricas a base de CMC e Amido como veículo de inoculação de rizóbio em caupi. Foram realizados dois testes de sobrevivência da estirpe BR3267 de *Bradyrhizobium japonicum* incubadas a temperatura ambiente em composições nas proporções M1; M2; M3; M4 e M5 (CMC/Amido) não compatibilizadas e compatibilizadas com ZnO ou MgO. As composições M3 e M4 não compatibilizadas e compatibilizadas com 1% de ZnO ou MgO apresentaram a capacidade de sustentar elevadas populações bacterianas até o 30º dia de incubação. Foi realizado um experimento com essas misturas, além do inoculante turfoso, para avaliar a sobrevivência das células rizobianas por um período de incubação de 12 semanas. As composições compatibilizadas com ZnO, não foram capazes de manter elevadas concentrações de células, até o final do período de incubação, porém as composições incubadas com MgO apresentaram capacidade de sustentar elevadas populações bacterianas (acima de  $10^9$  células por mL) por todo o período do experimento, mantendo-se estatisticamente igual ao inoculante turfoso. Sementes de caupi pré-peletizadas foram mantidas em geladeira para avaliar a capacidade de manutenção das células inoculadas por um período de 8 semanas, nas composições utilizadas no experimento anterior. Todos os tratamentos receberam um número de células superior a ordem de  $10^6$  células por semente, porém, não foram capazes de manter um elevado número de células (acima de  $6 \times 10^6$ ) por um período de incubação superior a 5 semanas, indicando a necessidade de adequação da composição para este fim. Para avaliar a eficiência das composições poliméricas na veiculação de células rizobianas em caupi, foi realizado um ensaio em condições de em casa se vegetação. Todos os tratamentos cujos veículos utilizados foram composições poliméricas apresentaram-se iguais à turfa, o que mostra que os inoculantes rizobianos desenvolvidos a partir de veículos a base de composições poliméricas são capazes de apresentar desempenho igual aos métodos já utilizados tradicionalmente na inoculação de estirpes rizobianas em leguminosas. Dessa forma, é possível desenvolver um inoculante polimérico para inoculação de células rizobianas em leguminosas.

**Palavras chave:** FBN, caupi, inoculantes, veículos de inoculação, misturas poliméricas.

## ABSTRACT

FERNANDES JÚNIOR, Paulo Ivan. **Carboximethylcelulose (CMC) and starch polymer blends as carrier of rhizobia in legume plants**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 43f. (Dissertation, Master Science in Agronomy, Soil Science).

This study had the objective of evaluating the efficiency of carboximethylcelulose (CMC) and starch based blends as carrier material of rhizobia to cowpea. Two tests were conducted to evaluate the survival of BR 3267 strain of *Bradyrhizobium japonicum* incubated at room temperature in compositions in the proportions of M1; M2; M3; M4 e M5 (CMC/Starch) compatibilized with ZnO and MgO or not compatibilized. The compositions M3 and M4 compatibilized and the non-compatibilized with 1% of ZnO and MgO showed capacity to sustain high bacterial populations till the 30<sup>th</sup> incubation day. It was established an experiment with these blends and with peat based inoculant, to evaluate the survival of rhizobial cells by a period of 12 weeks. The compositions compatibilized with ZnO, were not capable to maintain high cells concentrations till the end of the incubation period. However the CMC/Starch/MgO compatibilized blends showed capable to sustain high bacterial populations (above 10<sup>9</sup> cells per mL) through the experiment time, being statistically the same as the peat based inoculant. Cowpea seeds pre-pelletized were maintained in refrigeration to evaluate de capacity of maintenance of the cells inoculated, during a period of 8 weeks, using the same compositions used in the last experiment. In all the treatments, the seeds received a number of cells above 10<sup>6</sup> cells per seed, but they were not capable of maintaining a high cell number (above 6 x 10<sup>5</sup>), during a period up to 5 weeks, suggesting that it is necessary to adequate the composition to this purpose. An assay in greenhouse conditions was made to evaluate the efficiency of polymeric blends as a delivery system of rhizobial cells to cowpea plants. All the treatments that used as carrier the polymeric blends were statistically equal to the treatments with peat based inoculants. This result shows that the rhizobial inoculants developed with the carrier based on polymeric blends using CMC and Starch are capable to produce the same performance, when compared with methods traditionally used for the inoculation of rhizobial cells to leguminous seeds. Thus, it is possible to develop a polymeric based inoculant to the inoculation of rhizobial cells to legume seeds.

**Key words:** Biological Nitrogen Fixation, cowpea, inoculants, inoculant carrier, polymeric blends.

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são indivíduos chave na ciclagem de nutrientes devido a sua versatilidade metabólica, permitindo a sua participação em diversos processos biológicos fundamentais à sustentabilidade ambiental. Dentre os processos, a decomposição da matéria orgânica e a fixação biológica do nitrogênio (FBN) são os principais processos biológicos conduzidos pelos microrganismos (PINTO-COELHO, 2000).

As leguminosas e gramíneas constituem famílias botânicas com diversas espécies com importante papel na alimentação, e paisagismo. As leguminosas destacam-se por representar uma importante fonte de proteínas, principalmente para as regiões mais carentes do globo. Por esse motivo, é de fundamental importância explorar o potencial que essas plantas apresentam para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN).

A FBN é um processo realizado por diversas bactérias que podem ser de vida livre (*Nostoc* spp., dentre outras), associativas (*Azospirillum* spp., dentre outras) e mutualísticas (*Rhizobium* spp., dentre outras). Essas bactérias estão conspicuamente distribuídas em diversos ecossistemas do planeta, contribuindo para a incorporação do nitrogênio nesses sistemas. Portanto, o manejo de sistemas naturais ou agroecossistemas é profundamente influenciado pela gestão do nitrogênio, uma vez que grande parte do N disponibilizado para as teias alimentares é fixada pelas bactérias diazotróficas.

As bactérias que se associam mutualisticamente com plantas da família leguminosae pertencem a seis gêneros e são chamados coletivamente de rizóbio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2000). Essa associação é bastante complexa e seu estabelecimento depende de fatores genéticos da bactéria e da planta, além de diversos fatores ambientais. Embora algumas bactérias sejam bastante específicas, sendo capazes de infectar um pequeno número de espécies de leguminosas, outras são muito promíscuas, sendo capazes de nodular um grande número de espécies de leguminosas. A especificidade e promiscuidade exemplificam a complexidade ecológica da associação rizóbio-leguminosa.

Para se explorar essa associação na agricultura, é de fundamental importância a seleção de estirpes de rizóbios eficientes com capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico e infectividade das plantas hospedeiras, aliada a competência saprofítica.

Na produção de inoculantes rizobianos, a seleção de estirpes eficientes é acompanhada de um trabalho intenso de seleção e formulação de veículos de inoculação eficientes e de interesse industrial. Esse trabalho, tem colaborado para a produção de inoculantes com qualidades bastante elevadas. Um inoculante de qualidade deve ser capaz de manter grandes quantidades de células rizobianas durante um período de prateleira longo, deve também ser capaz de manter um grande número de células por semente inoculadas. Após o plantio, deve ser capaz de manter elevadas concentrações de células nas sementes, uma vez que o solo pode representar um ambiente bastante hostil para as células na fase do plantio (CAUTROUX, et al. 2001).

Além disso, a produção de inoculantes utilizando veículos biodegradáveis, atóxicos, hidrossolúveis, obtidos de fontes renováveis e de baixo custo; associada com estirpes de rizóbios competitivas, deve ser o objetivo de estudos para o desenvolvimento de novos inoculantes, inseridos no contexto atual da indústria, da responsabilidade ambiental e social, economia de recursos e inovação tecnológica.

A atual lei de propriedade intelectual (Lei nº9279/96) cria mecanismos legais que estimulam a interação entre o setor produtivo industrial, órgão de pesquisa e universidades, propiciando o desenvolvimento de novos produtos e processos passíveis de proteção da propriedade intelectual.

É nesse contexto que esse trabalho se insere, com o objetivo de contribuir para a FBN, desenvolvendo um inoculante composto por um veículo de inoculação alternativo à turfa, utilizando como modelo uma estirpe eficiente (BR 3267 de *Bradyrhizobium japonicum*) em feijão caupi.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fixação Biológica do Nitrogênio.

A Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) é responsável por cerca de 139 toneladas de Nitrogênio fixado por ano, só nos ecossistemas terrestres, dando a esse processo enorme importância na manutenção da vida no planeta, situando-se o como o segundo processo biológico mais importante na terra, juntamente com a decomposição da matéria orgânica, estando atrás apenas da fotossíntese (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). A FBN é realizada por uma série de bactérias denominadas fixadoras de nitrogênio ou diazotróficos, que são capazes de sintetizar a enzima nitrogenase, que catalisa a reação:



As leguminosas têm a capacidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio, chamadas coletivamente de rizóbio. O rizóbio pode suprir total ou parcialmente a necessidade de nitrogênio da planta hospedeira, enquanto esta fornece carboidratos para o nódulo bacteriano (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). A família Leguminosae (Fabaceae) apresenta três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, totalizando 19.700 espécies (POLHILL, 1994), das quais estima-se que mais de 90% das espécies de Mimosoideae e Papilionoideae, sejam capazes de nodular, enquanto menos de 25% das Caesalpinioideae o sejam (HIRSCH et al., 2001).

Os gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Alorhizobium* e *Azorhizobium*, fazem parte do grupo dos rizóbios capazes de nodular diversas espécies de leguminosas, como arbóreas (*Caesalpinia* spp., *Cassia* spp., etc), forrageiras (*Macrottilium artroporporeum*, *Arachis pintoi*, etc) e de grãos (*Phaseolus vulgaris*, *Glicine max*, *Vigna unguiculata*, etc.).

O rizóbio tem a capacidade de viver saprofiticamente no solo, competindo com os demais microrganismos pelos recursos disponíveis (KEYSER, et al.,1997), o que pode reduzir a população de determinada espécie de rizóbio no solo na ausência de uma planta hospedeira, e por outro lado, na presença desta, há um processo de interação química e molecular entre o rizóbio e a planta. A planta exsuda pela raiz uma série de substâncias, na maioria flavonóides, as quais o rizóbio tem a capacidade de reconhecer por meios de mecanismos de fitotaxia. Já foram identificados mais de 4.000 flavonóides, dos quais um grupo está particularmente relacionado à sinalização entre leguminosa e rizóbio (PERRET et al., 2000). Após o reconhecimento dos sinais moleculares emitidos pela planta, o rizóbio migra para a rizosfera e é iniciada a síntese dos fatores Nod, exopolissacarídeos sintetizados em resposta a presença dos sinais moleculares exsudados pela leguminosa. Esses fatores Nod têm sua síntese comandada por uma série de genes denominados genes *Nod* (HIRSCH et al., 2001; BAI et al.,2002). KEYSER, et al.,(1997), denominam essa fase como Fase Infectiva do ciclo de vida do rizóbio. Hoje também já são conhecidos diversos mecanismos de “Quorum Sensing” utilizados pelas espécies de rizóbio na infecção da planta hospedeira, mecanismos esses responsáveis por ativação de genes importantes no processo (GONZÁLEZ e MARKETON, 2003).

Após a colonização da rizosfera as bactérias apresentam expressiva divisão celular ao redor dos pêlos radiculares. Neste momento estes curvam-se, induzidos pelos fatores Nod, envolvendo uma quantidade de bactérias. As bactérias penetram no pêlo

radicular pela região apical e começam intensa multiplicação celular em sentido do córtex da raiz. Essa multiplicação direcionada ao córtex forma um cordão denominado cordão de infecção. O cordão se desenvolve até a região cortical, onde ramifica-se e invade algumas células que darão origem ao primórdio do nódulo, ainda não efetivo para a fixação do nitrogênio. Nesse primórdio, a célula bacteriana sofre uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas, transformando-se em uma célula efetiva para a fixação do N, o bacteróide, que irá se multiplicar novamente dando origem ao nódulo propriamente dito (concomitantemente com a multiplicação das células corticais) (PERRET et al., 2000). KEYSER, et al. (1997), denominaram essa etapa da infecção de leguminosas pelo rizóbio de Fase Simbiótica.

A capacidade de uma estirpe de rizóbio nodular uma ou mais espécies de leguminosas vêm da coevolução destes dois parceiros, em que os sinais moleculares emitidos e reconhecidos por ambos parceiros tornaram-se específicos. A elevada promiscuidade de algumas estirpes é um evento recente, ocasionado por adaptação das plantas e do rizóbio às variações climáticas locais e de transferência lateral de genes entre as diferentes espécies de rizóbio (SPRENT, 1994; PERRET et al., 2000). Um exemplo de estirpe altamente promíscua é a estirpe NGR234 de *Rhizobium* sp. que é capaz de nodular 232 espécies de 112 gêneros, incluindo uma espécie de não leguminosa (PERRET et al., 2000).

## **2.2 Inoculação de Estirpes de Rizóbio como Alternativa à Adubação Nitrogenada**

A inoculação de estirpes de rizóbio é uma tecnologia que permite alcançar elevadas produtividades com a diminuição ou a completa exclusão dos fertilizantes nitrogenados. Diversos estudos já comprovaram que a inoculação de estirpes selecionadas de rizóbio pode resultar em produtividades iguais ou superiores quando comparadas com a adição de fertilizantes nitrogenados. FERREIRA et al.,(2000) demonstraram que a inoculação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L), com cinco estirpes de *Rhizobium tropici*, apresentou produtividade e teor de nitrogênio nas folhas e grãos iguais aos apresentados por tratamentos que receberam adubação nitrogenada na semeadura e adubação em cobertura. HUNGRIA et al (2000) demonstraram que a inoculação da estirpe PRF 81 de *Rhizobium tropici* no feijoeiro comum, proporcionou produtividades iguais ao controle adubado com nitrogênio mineral por dois anos consecutivos em experimentos realizados no Estado do Paraná. Esta estirpe é hoje uma das recomendadas para o inoculante desta cultura. MARTINS et al., (2003) demonstraram que a inoculação da estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium japonicum* em feijão caupi, em experimentos realizados na região do Semiárido nordestino, propicia produtividade equivalente às obtidas com tratamento de adubação nitrogenada, 50 kg N.ha<sup>-1</sup>. Em recente revisão, ALVES et al., (2003) relatam que o programa de melhoramento genético e de seleção de cultivares de soja para diferentes regiões do Brasil ocorreu para a seleção de plantas que tivessem forte dependência da FBN, em detrimento adubação nitrogenada, permitindo que a seleção de cultivares de soja ocorresse concomitantemente à seleção de estirpes de rizóbio eficientes, capazes de proporcionar produtividades elevadas. Por esse motivo, a soja plantada hoje no Brasil não recebe adubação nitrogenada e o nitrogênio é provido totalmente da FBN. A importância de um programa de seleção cultivares produtivos para a cultura de soja pode ser ressaltado comparando a soja cultivada no Cerrado brasileiro (cuja única fonte de nitrogênio é o nitrogênio atmosférico advindo da FBN) com a soja cultivada no Norte dos Estados Unidos, onde a FBN supre no máximo 50% do nitrogênio requerido para a planta (HUNGRIA e VARGAS, 2000).

A adoção da prática de inoculação de rizóbio, em detrimento a utilização de fertilizantes nitrogenados, representa uma diminuição significativa nos custos de produção vegetal, uma vez que os fertilizantes nitrogenados são onerosos (DÖBEREINER, 1997). É importante destacar também o ganho ambiental na adoção desta tecnologia em relação ao uso de fertilizante nitrogenado que apresentam algumas implicações ambientais como a emissão de gases do efeito estufa e eutrofização de corpos de água devido a lixiviação dos adubos (POWSON, 1993). Deve-se levar em conta ainda os prejuízos ambientais causados na fabricação dos fertilizantes nitrogenados. Para a quebra da tripla ligação entre os átomos de nitrogênio no gás  $N_2$  são necessárias condições extremas de temperatura (400°C) e pressão (300 atm). Essas condições são alcançadas com a queima de grandes quantidades de combustíveis fósseis, emitindo para a atmosfera uma grande quantidade de gases, contribuindo significativamente para o efeito estufa (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

### 2.3 Produção de Inoculantes

De acordo com BASHAN (1998) os inoculantes bacterianos são definidos como sendo formulações contendo uma ou mais estirpe bacteriana que tem a capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal por mecanismos como biocontrole de agentes fitopatogênicos, promoção de crescimento pela produção de fitormônios, dentre outros, concomitantemente ou não com a fixação do nitrogênio atmosférico. Já os biofertilizantes são formulações bacterianas contendo uma ou mais estirpe bacteriana que tem ações benéficas aos vegetais pela substituição total ou parcial de fertilizantes químicos, (enquanto os demais efeitos das estirpes bacterianas nas plantas são ignorados). De acordo com o protocolo da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), um inoculante é “todo produto que contenha microrganismos com ação estimulante para o crescimento das plantas”, incluindo, em um mesmo grupo, os inoculantes e os biofertilizantes, até então classificados separadamente por BASHAN (1998). A proposta deste trabalho é a contribuição para o desenvolvimento de uma tecnologia de inoculação para aplicação na cultura do feijão caupi, de acordo com as normas estabelecidas pela RELARE, dessa forma será utilizada a denominação deste protocolo.

A “inoculação” de rizóbio para a produção de leguminosas, data do final do século 19. Logo após a documentação de HELLRIEGEL e WILFARTH (1888) (*apud* HIRSCH et al., 2001) a respeito dos rizóbios como formadores de nódulos e fixadores do nitrogênio atmosférico nas raízes de leguminosas. A incorporação de solos de regiões previamente cultivadas com essas plantas em outras regiões já era recomendada aos agricultores dos Estados Unidos, com o intuito de incrementar a produção de leguminosas em áreas de primeiro plantio (SMITH, 1992; BASHAN, 1998). Em 1896 o primeiro inoculante rizobiano foi patenteado nos Estados Unidos por Nobbe e Hitner sob o nome de “Nitragin”, utilizando-se culturas puras de rizóbio (SMITH, 1992; *apud* NOBBE e HITNER, 1896). A partir de então a inoculação por incorporação de solo deixou de ser utilizada, dando lugar à produção de inoculantes oriundos de culturas puras de rizóbio.

No Brasil, a produção destes inoculantes começou na década de 50 (FREIRE, 1968) e hoje o mercado brasileiro de inoculantes é um dos maiores do mundo, sendo comercializadas, na safra 2001/2002, aproximadamente 14 milhões de doses, sendo 95% para a cultura da soja e 4 % para a cultura do feijoeiro (CHUEIRE et al., 2003 *apud*; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, dados não publicados) e na safra 2003/2004 foram comercializadas cerca de 28 milhões de

doses (BRASIL, comunicação pessoal). A economia com a adoção da tecnologia de inoculação de sementes de soja com estirpes eficientes de rizóbio foi estimada em R\$ 8 bilhões (ZILLI, 2005), com base em dados da safra 2003/2004, quando foram plantados aproximadamente 21 milhões de hectares (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2006).

A qualidade dos inoculantes presentes no mercado é essencial para a eficiência deste produto. Muitos dos inoculantes vendidos em diversos países acabam que resultando em nodulação incipiente, possivelmente em função da falta de controle de qualidade de alguns países. GOMEZ et al., (1997) examinaram a presença de contaminantes em 18 inoculantes comerciais para a cultura da soja vendidos na Argentina, dos quais apenas 1 era completamente livre de células não rizobianas, os demais apresentavam um número entre  $10^5$  e  $10^9$  de células não rizobianas. OLSEN et al.,(1994) verificaram que dentre 40 inoculantes comercializados na América do Norte, e produzidos a partir de turfa não estéril, apenas um apresentou mais células rizobianas que contaminantes, dentre as quais estavam presentes alguns patógenos humanos oportunistas, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Outro estudo feito por OLSEN et al. (1996) demonstrou que mais de 90% dos inoculantes produzidos na América do Norte a base de turfa não estéril apresentaram de 2 a 1000 vezes mais células não rizobianas do que células do rizóbio em questão. Alguns países como Brasil, Uruguai, França e Canadá apresentam legislações que controlam a qualidade dos inoculantes rizobianos comerciais, enquanto em outros países como Austrália, África do Sul, Estados Unidos e Nova Zelândia a qualidade dos inoculantes é de responsabilidade das empresas produtoras (DEAKER et al., 2004; OLSEN et al., 1994).

Os inoculantes comercializados no Brasil têm sua qualidade controlada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que utiliza os parâmetros determinados pelo protocolo da RELARE. Segundo este documento os inoculantes comercializados no Brasil devem ter prazo de validade de 6 meses e apresentar no mínimo  $10^9$  células de rizóbio por grama ou mililitro de inoculante. Esse inoculante deve ser capaz de fornecer por volta de  $6 \times 10^5$  células rizobianas por semente. A presença de células não rizobianas é permitida desde que não seja detectada até a partir da diluição  $10^{-5}$  em uma diluição seriada para contagem em placa. Se os níveis de contaminantes estiverem acima deste valor, o inoculante é considerado inapropriado para a comercialização, independentemente do número de células de rizóbio presentes.

O veículo de inoculação mais utilizado é a turfa, que do ponto de vista geológico, é um combustível fóssil de idade recente, resultante da lenta decomposição de vegetais em ambiente aquoso. Ela foi sendo acumulada em condições de anaerobiose ao longo de ciclos geológicos e submetida à pressão, ao ser recoberta por outros sedimentos (BRADY, 1989). O teor de matéria orgânica e a capacidade de retenção de água são propriedades da turfa que possibilitam a sua utilização como veículo de inoculação, pois isso favorece a proliferação e a viabilidade das células por um período de tempo bastante longo (FIGUEIREDO et al., 1992), principalmente quando esterilizadas por radiação gama ou por autovaclavagem (BROCKWELL e BOTTOMLEY, 1995; DEAKER et al., 2004). O inoculante rizobiano turfoso é de fácil aplicação, depois de misturado com água este é aplicado às sementes formando uma peletização uniforme sobre a superfície das mesmas. A mistura pode ser feita de forma manual ou mecânica. Alguns produtos foram desenvolvidos de forma garantir uma maior adesão à semente independente da adição de água ou de outros aderentes químicos (NITRAL URBANA, 2004).

## 2.4 Veículos de Inoculação

Apesar de ser o veículo de inoculação mais utilizado, a turfa apresenta algumas desvantagens, dentre as quais destacam-se: com a intensa utilização da turfa as turfeiras ideais para a produção de inoculantes estão cada vez mais raras, o que obriga o deslocamento deste material a longas distâncias (DEAKER et al., 2004). Em alguns países devido às políticas de preservação de regiões de terras úmidas, a exploração de turfeiras é controlada ou proibida (TEMPRANO et al. 2002). O pH da turfa é outro fator importante no crescimento e manutenção das células rizobianas. As fontes de turfa utilizadas para a produção de inoculantes são bastante ácidas, o que torna necessária uma correção no pH com carbonato de cálcio ou magnésio (DEAKER et al., 2004; DAZA et al., 2000). A garantia de manutenção da umidade em torno de 40 a 50% é essencial para a proliferação e viabilidade das células rizobianas e, quando a turfa é previamente seca a 100°C, a sobrevivência do rizóbio é comprometida devido ao ressecamento do material. A autoclavagem ou esterilização com radiação gama podem provocar a produção de substâncias tóxicas às células rizobianas, reduzindo a sobrevivência das células, conseqüentemente a ineficiência do inoculante (DAZA et al., 2000). Para contornar esses problemas são necessárias mais etapas na produção dos inoculantes, o que eleva o custo do produto final.

Quando uma estirpe é inoculada no campo existem diversos fatores adversos que esta estirpe deve superar para ter sucesso na infecção da planta hospedeira. A competição das estirpes nativas do solo, o baixo pH, a disponibilidade de N mineral e elevada concentração de alumínio dos solos tropicais são alguns exemplos destes fatores (THIES et al., 1991; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). O veículo utilizado para inocular uma estirpe deve ter a capacidade de manter uma grande quantidade de células inoculadas viáveis no solo e na semente até o período em que essa começa a germinar e a emitir os pêlos radiculares, que são os sítios de nodulação para a maioria dos rizóbios (BROCKWELL e BOTTOMLEY, 1995; CAUTROUX et al., 2001; DEAKER et al., 2004). Por esses motivos a pesquisa por veículos de inoculação alternativos a turfa tem sido objeto de intensa investigação científica.

Um veículo de inoculação de elevada qualidade deve ser de fácil obtenção, ser de fácil processamento e manuseio, ter características constantes, assegurar a nutrição e viabilidade das células durante o período de armazenamento, ser atóxico, não exigir condições especiais de armazenamento, ser de fácil transporte, permitir a aplicação mecânica e não ser abrasivo a máquinas e equipamentos (ROUGLEY, 1970; EL HADDAD, 1985; CASSIDY, et al., 1996; DENARDIN, 1997).

Diversos trabalhos já estudaram a sobrevivência de estirpes de rizóbio em veículos de inoculação alternativo, bem como a eficiência destes na inoculação de plantas em vasos e em condições de campo. KREMER e PETERSON (1983) verificaram a sobrevivência de estirpes de *Rhizobium* sp. em quatro veículos alternativos à turfa. Os resultados observados nesses trabalhos mostraram que a 35°C a estirpe de amendoim CA001 apresenta tendência a sustentar uma quantidade de células viáveis mais elevada que a sustentada pelo inoculante turfoso em até 125 dias de incubação. No mesmo estudo utilizando-se uma estirpe "*Rhizobium phaseoli*" incubada em óleo de milho a 30° C, foi observado que o número de células viáveis, avaliado aos 56 dias de incubação por contagens em placa, foi mais elevado quando comparado ao veículo turfoso. As células inoculadas no veículo oleoso foram oriundas de culturas liofilizadas, o que ressalta a importância da origem da estirpe inoculada para a manutenção da eficiência do inoculante.

KOSTOV e LYNCH (1998) avaliaram a sobrevivência de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em maravalha pré-decomposta por um fungo celulolítico. As estirpes

apresentaram taxa de crescimento e sobrevivência bastante elevadas, uma vez que até os nove meses todas as estirpes testadas apresentaram quantidades de células viáveis superior a  $10^9$  células por grama de inóculo. Em experimentos em condições de campo, as estirpes de *Rhizobium* proporcionaram um aumento na nodulação de leucena e amendoim de 82% e 39% respectivamente, quando comparado ao inoculante turfoso. A estirpe de *Bradyrhizobium* inoculada em soja apresentou nodulação que superou em até 62% a nodulação daquelas plantas inoculadas com o inoculante turfoso.

BEN REBAH et al., (2002) testaram a sobrevivência de uma estirpe de *Sinorhizobium meliloti* em lodo de esgoto tratado, turfa e uma mistura entre ambos. O crescimento das bactérias foi feito em meio de cultura YMA e em meio YMA contendo lodo de esgoto tratado. Quando acondicionados nas temperaturas de 4°C ou 25°C, os três veículos de inoculação apresentaram igual sustentabilidade das células após 120 dias de incubação, para as culturas crescidas em meio de cultura YMA. As culturas bacterianas crescidas em meio YMA contendo lodo de esgoto, não apresentaram boa sobrevivência nos veículos contendo lodo de esgoto. Neste estudo também foi avaliada a sobrevivência das células rizobianas após congelamento a -20°C por 90 dias de culturas crescidas em meio YMA e YMA contendo lodo de esgoto. As culturas congeladas no meio de cultura padrão apresentaram viabilidade de apenas 1% das células quando comparadas com a quantidade de células viáveis presentes no meio no momento do congelamento. Por outro lado, as culturas bacterianas crescidas em meio YMA contendo lodo de esgoto apresentaram viabilidade de 18% das células congeladas. Sendo assim, o meio de cultura com incorporação de lodo de esgoto e congelamento pode ser utilizado como inoculante, dependendo da quantidade de células inoculadas.

Em um estudo para avaliar a sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium* em diferentes materiais, FIGUEIREDO et al., (1992) testaram a diatomita, vinhaça seca, composto urbano, pó de coco e vermiculita em comparação com a turfa para avaliar a sobrevivência de uma estirpe de *Bradyrhizobium* sp.. Nesse estudo o rizóbio inoculado em diatomita apresentou sobrevivência igual ao incubado em turfa aos seis meses de incubação, armazenados a 5°C. Em outro estudo para avaliar a aplicabilidade de minerais como veículo de inoculação de estirpes de rizóbio, DAZA et al., (2000) avaliaram a sobrevivência de estirpes de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* sp. em perlita. Os resultados mostraram sobrevivência similar das estirpes incubadas em turfa e em perlita. Inoculações realizadas em condições de campo, em plantas de soja e feijão a produção de nódulos mostraram resultados estatisticamente iguais nos tratamentos utilizando-se o inoculante turfoso e o inoculante a base de perlita. Esses dados corroboram o resultados obtidos por TEMPRANO et al., (2002), em estudos com vermiculita, em que avaliaram a sobrevivência de várias estirpes de rizóbio, tendo a perlita melhor desempenho sendo estatisticamente igual à turfa.

No contexto da pesquisa por veículos de inoculação alternativos a turfa, JUNG e MUNGNIER, (1982) demonstraram que os biopolímeros são eficientes para o crescimento e incubação de bactérias, devido a capacidade de limitar a transferência de calor, boas propriedades reológicas e alta atividade em água. Alguns testes pioneiros foram realizados por DOMMARGUES et al., (1979), para observar a sobrevivência de *Bradyrhizobium* em matrizes de poliácridamida, bem como a sua eficiência em nodular plantas de soja em condições de casa de vegetação. Os resultados obtidos mostraram que tanto a sobrevivência quanto a nodulação do rizóbio foram iguais na poliácridamida e na turfa. A poliácridamida também foi capaz de sustentar um grande número de células viáveis de rizóbio após 75 dias de incubação, sendo estatisticamente igual às concentrações bacterianas sustentadas pela turfa e comparativamente melhor do que a observada com a casca de amendoim e a espigas de milho (SPARROW e HAM, 1983),

quando incubados a temperatura de 4° C. A poliacrilamida não foi capaz de sustentar elevadas concentrações de células rizobianas quando incubadas por igual período à temperatura de 30° C, o que pode representar uma limitação para o uso deste veículo de inoculação em determinadas regiões do globo. JUNG et al., (1982) testaram alguns biopolímeros secos e semi-secos, goma xantana e alginatos, como veículos de inoculação de *Bradyrhizobium*. Os autores observaram que tanto a sobrevivência quanto a nodulação aos 100 dias foi igual para os inoculantes à base de goma xantana e turfa. JAWSON et al., (1989) observaram que estirpes de rizóbio, em géis de celulose incubados por 70 dias e inoculados em sementes de soja, permitiram a formação de nódulos em número superior aos inoculantes turfosos, em condições de campo, apesar da competitividade e das altas populações rizobianas nativas. Esses autores também observaram que a metodologia de preparo do inoculante é de fundamental importância para a obtenção de elevadas populações de rizóbio nas matrizes de celulose ao final do período de incubação.

Alguns polímeros como alginato já foram bastante testados como veículos de inoculação de estirpes de bactérias promotoras de crescimento em plantas, como *Azospirillum* (BASHAN et al., 2002), porém poucos estudos avaliaram a utilização dessa matriz polimérica como veículo de inoculação para as células rizobianas.

São poucos trabalhos publicados utilizando-se misturas poliméricas como veículo de inoculação de células rizobianas em sementes de leguminosas. Considerando as boas propriedades físico-mecânicas desses materiais, se abrem novas perspectivas na pesquisa e desenvolvimento nesta área de aplicação. Nesse contexto destaca-se o trabalho realizado por DENARDIN e FREIRE (2000), em que foram estudadas misturas envolvendo as gomas xantana e jataí com dois polímeros sintéticos, a polivinilpirrolidona (PVP) e o polietilenoglicol (PEG). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que as misturas que as misturas goma xantana/jataí e goma xantana/PVP e goma jataí/ PVP apresentaram elevada sobrevivência de células de uma estirpe de *Bradyrhizobium elkanii*, sendo essas misturas capazes de manter concentrações na ordem de 10<sup>9</sup> células rizobianas por grama de mistura polimérica. Em alguns países, como por exemplo na Nova Zelândia o PVP é utilizado como adesivo para inoculantes microbianos a sementes (LLOYD, 1983).

## **2.5 Turfeiras: Características Gerais e Peculiaridades**

As turfeiras podem ser classificadas como sistemas palustres, compostos por corpos de águas rasas permanente ou periodicamente alagados por água de precipitação pluviométrica, sem margem bem definida e com fundo coberto por vegetação e lodo orgânico. O acúmulo no sedimento de matéria orgânica vegetal composta por celulose, lignina e outras substâncias com estrutura química cíclica de difícil degradação, combinado com condições desfavoráveis à decomposição aeróbica, como o excesso de água e a ausência de oxigênio, facilitam o processo de humificação. As condições ambientais acima descritas propiciam a formação de turfeiras, cujos solos apresentam freqüentemente teores de carbono iguais ou maiores do que 50% do peso do solo seco (MITSCH e GOSELINK, 1986 *apud* COSTA, et al., 2003). Diversas espécies vegetais colaboram para a incorporação do carbono ao solo das formações de turfeiras, dentre as quais as principais são pteridófitas do gênero *Sphagnum*.

As turfeiras propiciam o desenvolvimento de espécies animais e vegetais bastantes características, com um grau de endemismo elevado, devido às peculiaridades dessa formação (CARLILE, 2000), a preservação das formações turfosas é consoante com a preservação da biodiversidade. As turfeiras também guardam um grande número de registros fósseis preservados, o que nos permite fazer reconstruções

paleobiogeográficas e paleoclimáticas, entendendo melhor a formação dos ecossistemas atuais (BARBER, 1993; LEDRU, et al., 1996; CARLILE, 2000), além dessas características, as turfeiras representam elevado estoque de carbono. A utilização intensa das turfeiras tende a aumentar a quantidade de gás carbônico atmosfera, por decompor o carbono ali fixado e desta forma colaborar com o aumento do efeito estufa (CARLILE, 2000). Por essas características BARBER (1993) coloca as turfeiras como os ecossistemas mais frágeis e com menor capacidade de recuperação após um impacto antrópico.

A maioria das turfeiras conhecidas no globo terrestre foi formada durante a última glaciação, por esse motivo, cerca de 90% das turfeiras encontram-se nos cinturões temperados e sub temperados do Hemisfério Norte, segundo estimativa da INTERNATIONAL PEAT SOCIETY (IPS, 1997). As turfeiras brasileiras têm gênese bastante diferente das turfeiras do hemisfério norte, enquanto as turfeiras do norte se formaram durante a última glaciação no quaternário, as turfeiras tropicais são holocênicas, formadas a partir do último período de regressão e transgressão dos oceanos e conseqüentemente dos ambientes fluviais nesta era geológica (FRANCHI, 2004). As características de gênese tornam ainda mais peculiares as turfeiras tropicais, potencializando a necessidade de sua preservação.

## **2.6 Utilização da Misturas Poliméricas**

Desde o século passado, o estudo de misturas poliméricas tem recebido bastante destaque na área da ciência tecnologia de polímeros, tendo estas misturas inúmeras aplicações na área médica, farmacêutica, indústria de plásticos, borracha, etc. (ROBESON, 1984). O desenvolvimento de misturas poliméricas como materiais utilizáveis em diversas áreas é uma estratégia para reunir em um único material, propriedades de polímeros diferentes a custo muito baixo (SOARES e OLIVEIRA, 2001). KONING et al., (1998) destacam a viabilidade do uso de misturas poliméricas como estratégia no desenvolvimento de materiais de engenharia, uma vez que a síntese de novas moléculas que tenham as propriedades de interesse pode ser muito onerosa e despende muito tempo.

Porém, uma pequena quantidade de misturas poliméricas é formada por polímeros parcial ou completamente miscíveis (naturalmente compatíveis). Essas misturas tendem a serem naturalmente homogêneas, ou seja, algumas propriedades individuais de cada um dos dois polímeros não são observadas, adquirindo a mistura propriedades intermediárias entre as propriedades dos polímeros utilizados. A maioria das misturas poliméricas é parcialmente ou completamente imiscível, devido ao seu peso molecular elevado, formando na sua maioria misturas heterogêneas, misturas nas quais as características dos polímeros utilizados nem sempre são mantidas. (KONING et al., 1998).

Como a maioria das misturas poliméricas são imiscíveis, a compatibilização do par polimérico misturado é de fundamental importância para se obter o sinergismo de propriedades. Para se conseguir a compatibilidade de misturas poliméricas, são utilizados agentes compatibilizantes, esses agentes são moléculas que atuam na interface da mistura, permitindo que haja uma maior interação na mistura, devido a sua elevada atividade junto a elas. Os agentes compatibilizantes podem ser polímeros ou copolímeros, moléculas orgânicas de baixo peso molecular com abundância de grupos reativos, por exemplo carboxilas e hidroxilas (KONING, et al., 1998).

Dentre os trabalhos a respeito de compatibilização de misturas poliméricas presentes na literatura, destacam-se os estudos de JANSEN e SOARES (1996), que demonstraram que misturas de borracha natural (NR) e Poli (etileno-co-acetato de

vinila) (EVA), podem ser bem compatibilizadas com a adição de Poli(etileno-co-acetato de vinila) modificado com ácido 2 mercapto acético (EVASH), conservando suas características por mais tempo se comparado a misturas NR/ EVA sem esse tratamento. E o trabalho de BARRA et al.; (2003), que demonstraram que a compatibilização de misturas de poliamida 6 e do copolímero elastomérico etileno-propileno-dieno (EPDM) com anidro maléico, modifica as propriedades micro e macroscópicas da mistura devido a maior interação entre os domínios EPDM com a matriz de poliamida 6.

Dentre as misturas poliméricas utilizadas em diversos ramos da indústria, as misturas poliméricas biodegradáveis destacam-se como materiais não poluentes a de baixa recalcitrância no meio ambiente (ROSA et al.; 2001). Misturas biodegradáveis a base de celulose e amido apresentam custo muito reduzido e a sua aplicabilidade na indústria de plásticos tem sido pesquisado recentemente, embora já sejam utilizadas para diversos fins, como na indústria de alimentos para enchimento e na fabricação de diversas colas e emulsificadores. Essas misturas envolvem um par polimérico onde ambos polímeros apresentam elevado peso molecular e estruturas químicas distintas, o que resulta numa mistura imiscível, apesar dos polímeros envolvidos apresentarem certa compatibilidade (SUVOROVA, et al.; 1999). Misturas a base de carboximetilcelulose (CMC) e amido foram estudadas por SUVOROVA, et al (1999). Nesse estudo, os autores demonstraram que as misturas com cinquenta por cento de massa de cada um dos polímeros apresentavam elevada interação com a água, baixa energia livre e elevada biodegradabilidade em solo, essas misturas foram mais estáveis quando comparadas a misturas de amido e metilcelulose. Essas características permitem a utilização destas misturas em ramos da indústria. Um setor da economia onde essa combinação ainda não foi utilizada é a agricultura. A utilização de composições a base de CMC e amido na agricultura podem representar o desenvolvimento de produtos de baixo custo, biodegradáveis e de baixo impacto ambiental. Uma das possíveis aplicações destas composições na agricultura é como veículos de inoculação de rizóbio em leguminosas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção do Método de Preparação de Misturas Poliméricas

Foram testadas duas formas de preparo das composições: manual e sob agitação no liquidificador. As composições preparadas manualmente foram agitadas de forma ininterrupta em Becker de 1 litro por aproximadamente 30 minutos. A adição dos reagentes (polímeros e agente compatibilizante) foi feita de uma só vez no volume total de água (300 mL).

Para as misturas preparadas em liquidificador, foram ajustadas a quantidade de polímeros e agente compatibilizante também para 300 mL de água destilada. O volume total de água foi colocado no liquidificador sendo, em seguida, adicionado o agente compatibilizante, seguido de uma leve agitação até formar uma solução de aparência homogênea. Foram preparadas 5 composições poliméricas a base de CMC e amido (M1, M2, M3, M4 e M5). A seleção do melhor método de preparo foi feita de acordo com a homogeneidade da mistura observada após o procedimento de agitação, selecionando-se a forma onde a mistura polimérica preparada apresenta-se mais homogênea.

**Tabela 1:** Composições poliméricas utilizadas nos experimentos de seleção de misturas para um período de incubação de 30 dias a temperatura ambiente. Os agentes compatibilizantes foram o óxido de zinco (ZnO) e o óxido de magnésio (MgO).

Composições	Agentes compatibilizantes
M1	ZnO ou MgO
M2	
M3	
M4	Ausência; 1; 1,5; 2,5%
M5	

#### 3.2 Estirpe Bacteriana: Condições de Crescimento e Incubação

A estirpe BR 3267 de *Bradyrhizobium japonicum* recomendada para a cultura do feijão caupi no nordeste brasileiro (MARTINS et al., 2003) foi crescida em meio de cultura YMA líquido (VINCENT, 1970) sob agitação orbital por 6 dias, com velocidade constante de 90 rpm. Após o período de crescimento, o meio de cultivo crescido foi centrifugado a 10.000 g, o sobrenadante descartado e o “pellet” contendo as bactérias foi ressuspensão em água destilada estéril. Foram inoculados 2,5 mL da suspensão bacteriana em 5 mL do gel formado pela mistura polimérica e agitado manualmente para incorporação das células à matriz polimérica. O inoculante, formado pelas composições poliméricas contendo células rizobianas, foi incubado à temperatura ambiente, por um período de até 30 dias. Durante o tempo de incubação foram realizadas contagens utilizando diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  em placas de Petri contendo o meio de cultura YMA modificado (FRED e WAKSMAN, 1929; VINCENT, 1970) com a seguinte composição (para 1 L de meio de cultura):

$K_2HPO_4$ .....1 mL (Solução 10%) Manitol .....10 g  
 $KH_2PO_4$ .....4 mL (Solução 10%) Extrato de levedura.....0,4 g  
 $MgSO_4$ .....2 mL (Solução 10%) Agar.....15g  
 NaCl.....1 mL (Solução 10%)  
 Azul de Bromotimol.....5 mL (Solução 10% em KOH 0,5 N)  
 pH entre 6,8 e 7,0 ajustado com KOH 10%

As contagens foram feitas pelo método da gota (MILES e MISRA, 1938), adotado pela RELARE. As placas inoculadas foram incubadas a 30° C por um período de 5 a 6 dias para subsequente contagens das unidades formadoras de colônia (ufc) (VINCENT, 1970).

### **3.3 Sobrevivência de Células Rizobianas em Composições Poliméricas a Base de CMC e Amido**

Foram realizados três experimentos com o intuito de avaliar a sobrevivência de células rizobianas em composições poliméricas a base de CMC e Amido.

Nos dois primeiros experimentos o objetivo foi selecionar as misturas poliméricas capazes de manter as populações mais elevadas de células rizobianas por um período de incubação de 30 dias. Ao longo deste período, foram realizadas nove contagens em placa de Petri aos 1, 2, 3, 5, 8, 12, 17, 23, e 30 dias de incubação (DI), pelo método da gota (MILES e MIRRA, 1938). As composições poliméricas utilizadas estão relacionadas na Tabela 1 No primeiro experimento o agente compatibilizante utilizado foi o óxido de zinco (ZnO) enquanto no segundo experimento foi utilizado o óxido de magnésio (MgO). O delineamento experimental foi um fatorial de 5 x 4, inteiramente casualizado com 2 repetições.

Após a seleção das melhores composições poliméricas, M3 e M4 não compatibilizadas e compatibilizadas com 1% de ZnO ou MgO, foi realizado um terceiro experimento para avaliar a sobrevivência de células rizobianas por um período de incubação de até 12 semanas, nas mesmas condições dos experimentos anteriores. As contagens foram realizadas às 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 12 semanas de incubação e o delineamento experimental aplicado foi do inteiramente casualizado com 3 repetições. A homogeneidade de variâncias foi analisada pelo software SAEG®, a normalidade de os erros e as análises de variâncias e os testes de médias foram analisados pelo software Sisvar®.

### **3.4 Contagem de Células Rizobianas em Sementes Pré-Inoculadas Utilizando Misturas Poliméricas ou Turfa como Veículos de Inoculação**

As composições poliméricas utilizadas no terceiro experimento foram novamente preparadas conforme descrito no item 3.1, em seguida o volume de 5 mL foi transferido um erlenmeyer de 125 mL, que foi incubado por 12 dias em temperatura ambiente. A peletização foi realizada adicionando-se aproximadamente 300 sementes ao inoculante, seguida de agitação manual por cerca de 20 minutos. Para o tratamento utilizando a turfa como veículo de inoculação, a peletização foi feita em sacos plásticos na mesma proporção de inoculante e sementes. Como adesivo foi adicionado 1 mL de uma solução estéril de sacarose (10%) e a mistura foi agitada manualmente (TEMPRANO et al, 2002). As sementes foram distribuídas em placas de Petri e secas em capela de fluxo horizontal por 2 horas As placas foram acondicionadas em geladeira, onde a temperatura foi mantida a aproximadamente em 10°C.

Para contagem das bactérias aderidas às sementes, foi utilizada a metodologia desenvolvida por TEMPRANO et al, (2002), na qual um total de 10 sementes foi

colocado em um erlenmeyer contendo 100 mL de NaCl (0,85%) e agitado por um período de 10 a 15 minutos. Em seguida foi retirada uma alíquota (1 mL) para diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura YMA com vermelho congo. Foram plaqueadas as diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ . As análises estatísticas foram feitas segundo o item 3.2. O delineamento experimental utilizado foi do inteiramente casualizado com 3 repetições. A homogeneidade de variâncias foi analisada pelo software SAEG®, a normalidade de os erros e as análises de variâncias foram feitas pelo software Sisvar®.

### 3.5 Experimento em Condições de Casa de Vegetação

Para avaliar a eficiência das composições poliméricas como veículo de inoculação da estirpe BR 3267 para o feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) foi realizado um experimento em condições de casa de vegetação onde foram utilizadas as composições poliméricas utilizadas no experimento 3 (M3 e M4 não compatibilizadas e compatibilizadas com 1% de ZnO ou MgO).

As sementes foram desinfestadas superficialmente em álcool (70%) por 30 segundos, seguindo de 3 minutos em peróxido de hidrogênio concentrado e 10 lavagens em água destilada estéril (VINCENT, 1970). A inoculação das sementes foi feita como descrito no item anterior.

Para o plantio do experimento foi coletada uma amostra de terra do horizonte superficial de um Planossolo na área do SIPA (Sistema Integrado de Produção Agroecológica-Seropédica, RJ), mantido em parceria pela UFRRJ, Pesagro-Rio, Embrapa Solos e Embrapa Agrobiologia. O solo foi destorroado, peneirado e homogeneizado. amostras foram submetidas à análise segundo EMBRAPA (1997). Dados referentes à análise do solo encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultado da análise da amostra de solo, utilizadas no experimento de casa de vegetação.

pH	N g.kg <sup>-1</sup>	Complexo Sortivo e Nutrientes					
		Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup> +Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	P
		cmol <sub>c</sub> .kg <sup>-1</sup>				mg.kg <sup>-1</sup>	
5,8	0,49	0,0	2,1	1,36	0,8	71	49

A análise de solo demonstrou que o solo utilizado não apresentava teores de Al<sup>3+</sup> potencialmente tóxicos às plantas e que os teores de K<sup>+</sup>, P, e o valor da saturação de bases apresentava-se em níveis razoáveis para ao desenvolvimento vegetal, não sendo necessário a realização adubação corretiva para correção de pH ou teor de Al<sup>3+</sup>, por esse motivo não foi procedida nenhum tipo de adubação. Os teores de N também não se apresentaram altos o suficiente para inibir ou reduzir nodulação (Tabela 12). A análise demonstrou que o solo não apresentou nenhuma limitação para sua utilização neste experimento.

O plantio foi realizado em vasos contendo aproximadamente 2,5 kg de solo. Foram plantadas três sementes por vaso e após 7 dias de emergência, foi realizado um desbaste para 1 planta por vaso. Foram realizadas duas coletas, aos 35 e aos 50 dias após a emergência (DAE). Os parâmetros avaliados foram matéria seca da parte aérea, matéria seca radicular, N total da parte aérea, pelo método de digestão de Kjeldhal (MALAVOLTA et al, 1989), e número total e matéria seca de nódulos.

A inoculação foi feita utilizando os inoculantes cujos veículos foram as composições poliméricas M3 e M4, não compatibilizados e compatibilizados com 1% de ZnO ou MgO, além do inoculante turfoso e das testemunhas nitrogenada e absoluta (sem suprimento de N). A testemunha nitrogenada recebeu nitrogênio sob forma de nitrato de amônio, parcelado em doses semanais de 100 mg N/ planta, totalizando 7 tratamentos.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com 4 repetições. A homogeneidade de variâncias foi avaliada utilizando-se o teste de Cochran e Bartlett através do software SAEG®, a normalidade da distribuição dos erros foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, através do software Sisvar®. Pelo mesmo software foi feita a análise de variância e aplicado o teste Tukey, ao nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção de Método para o Preparo das Composições Poliméricas

O preparo das composições poliméricas a base de CMC e amido pelos dois métodos (manualmente e em liquidificador) permitiu avaliar as diferenças na homogeneidade da mistura, e selecionar a melhor maneira de preparo dessas misturas. Do ponto de vista industrial esse ponto é muito importante uma vez que o maquinário terá que se adequar para o preparo dos veículos de inoculação.

A análise visual das composições poliméricas preparadas manualmente e em liquidificador, revelou que as composições preparadas manualmente apresentavam-se pouco homogeneizadas, principalmente em relação à distribuição do amido. Este reagente é pouco solúvel em água e a sua distribuição uniforme não é obtida facilmente, principalmente nas misturas onde há menor concentração de CMC. A padronização da metodologia de preparo das misturas poliméricas é de fundamental importância uma vez que o método de preparo de uma mistura polimérica pode influenciar nas propriedades reológicas da composição, como já foi observado por VISCONTE et al. (2001). Estes autores demonstraram que a adição dos reagentes de diferentes formas em misturas NR/butadieno-estireno (SBR), determinou diferentes características mecânicas e morfológicas das misturas. Utilizando a mesma metodologia, ALCÂNTARA et al. (2004) observaram resultados semelhantes no preparo de misturas polibutadieno (BR)/SBR.

O pH das composições poliméricas utilizadas no experimento de seleção, utilizando ZnO ou MgO como agente compatibilizante, foram medidos antes da adição da suspensão bacteriana. Independente da composição, o pH se manteve próximo ao pH fisiológico para a incubação de células rizobianas, conforme pode ser visto nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3:** pH das misturas poliméricas compatibilizadas com ZnO.

% CMC/Amido	Percentual de ZnO			
	NC*	1%	1,5%	2,5%
M1	6,63	7,23	7,27	7,29
M2	6,20	7,43	7,53	7,56
M3	6,44	7,35	7,47	7,50
M4	6,66	7,57	7,66	7,81
M5	6,77	7,55	7,62	7,83

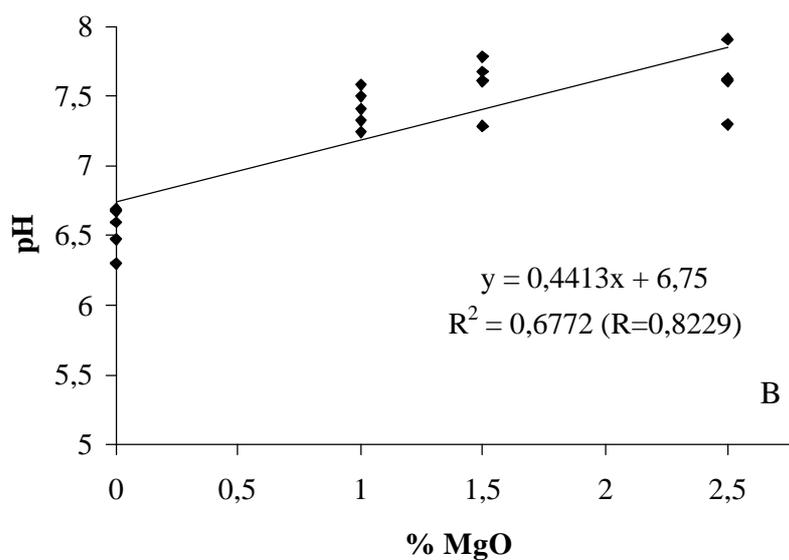
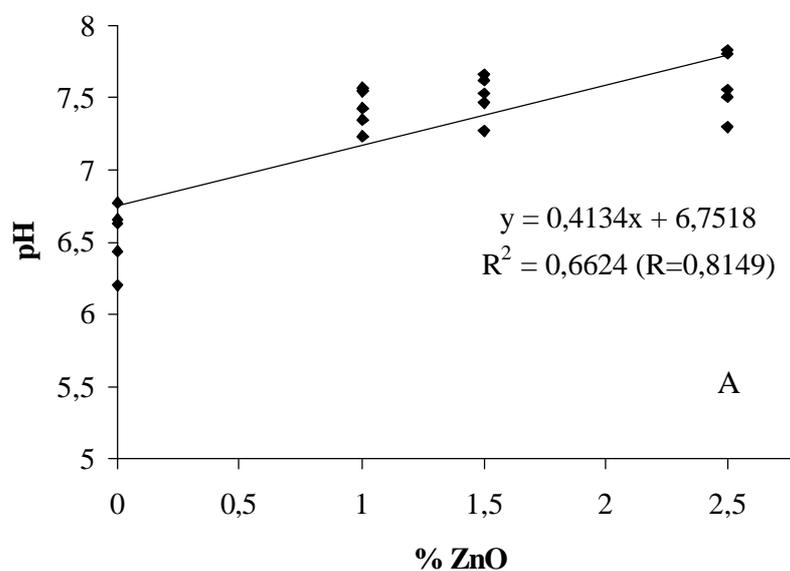
\*NC= Não compatibilizado

Os valores de pH das misturas compatibilizados com MgO foram similares àqueles medidos nas misturas compatibilizadas com ZnO, mantendo-se também próximo à faixa de pH ideal para o crescimento do rizóbio em meio YMA (VINCENT, 1970). Observa-se no entanto que com o aumento da concentração de agente compatibilizante há um aumento no pH da mistura (Figura 1).

**Tabela 4:** pH das misturas poliméricas compatibilizadas com MgO.

Composição	Percentual de MgO			
	NC*	1%	1,5%	2,5%
M1	6,60	7,32	7,28	7,30
M2	6,30	7,25	7,79	7,61
M3	6,47	7,40	7,61	7,62
M4	6,67	7,50	7,68	7,90
M5	6,69	7,58	7,61	7,95

\* NC= Não Compatibilizado



**Figura 1:** Aumento de pH da mistura polimérica em função do percentual de ZnO (A) e MgO (B).

É importante avaliar a variação do pH das misturas de acordo com a adição de agentes compatibilizantes, uma vez que a adição de maiores quantidades desses agentes com o intuito de atingir a estabilidade dimensional da composição pode atingir valores de pH acima daqueles suportados pelas bactérias, causando a redução do número de células, mascarando a influência da composição polimérica na preservação de elevadas concentrações celulares.

OLIVEIRA e MAGALHÃES (1999) demonstraram que diversas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. apresentam crescimento ótimo em meio de cultura YMA com pH 6,5 e apresentam um crescimento menor ou não apresentam crescimento no mesmo meio de cultura com pH 4,5, o que demonstra a preferência das estirpes do gênero *Bradyrhizobium* por pH próximos à neutralidade se comparados com pH ácidos.

#### **4.2 Avaliação das Composições Poliméricas Compatibilizadas com ZnO e Não Compatibilizadas, como Veículo de Inoculante Rizobiano Durante 30 Dias de Armazenamento.**

A determinação de concentrações de ZnO compatíveis com a sobrevivência das células rizobianas e capaz de compatibilizar as misturas poliméricas é importante para otimizar o preparo de uma composição ideal para sua utilização como veículo de inoculante. O ZnO, é um óxido que tem atividade bactericida quando em elevadas concentrações (LIU e YANG, 2003), o que requer especial atenção quanto à concentração de ZnO a ser utilizada na mistura.

As contagens bacterianas para as suspensões bacterianas utilizadas para o preparo de inoculantes rizobianos em veículos de composições poliméricas, descritas na Tabela 1 e ZnO como agente compatibilizante, mostraram que a concentração bacteriana presente no inóculo foi de  $1,5 \times 10^9$  ufc/ mL de inóculo, o que resultou numa concentração de  $4,5 \times 10^8$  ufc/ mL de inoculante incubado.

As contagens de unidades formadoras de colônias nas misturas poliméricas revelaram um perfil bastante heterogêneo, com relação à manutenção do número de células viáveis indicando que a sobrevivência das células foi dependente da composição do veículo. Analisando os dados de número de sobrevivência apresentados na tabela 5, observou-se que até o 5º dia após a inoculação (DI), não houve diferenças significativa entre os tratamentos. No entanto a partir de 8 DI observa-se que o veículo produzido a partir da composição M1, não foi capaz de sustentar elevadas populações bacterianas até os 30 DI. Durante este período concentração de células viáveis diferiu estatisticamente das demais composições. Por outro lado, as misturas compatibilizadas com maiores concentrações de ZnO provocaram uma diminuição do número de células bacterianas, o que pode sugerir um aumento da biodisponibilização de ZnO quando presente no veículo nas quantidades utilizadas neste estudo. Este fato propicia uma baixa dispersão do CMC e do amido causando separação de fases de composição ao longo do período observado. A separação de fases resulta em baixa estabilidade do veículo e, portanto, composições poliméricas com esta característica não podem ser utilizadas.

**Tabela 5:** Sobrevivência de células de *B. japonicum* (BR 3267) armazenadas até 30 dias após a inoculação (DI) a temperatura ambiente em diferentes proporções de composições poliméricas a base de CMC/ Amido (M1; M2; M3; M4; M5) compatibilizadas com ZnO (1, 1.5 e 2.5%) e não compatibilizadas.

CMC/Amido + %ZnO	Log do número de UFC/mL			
	1 DI	2 DI	3 DI	5 DI
M1 NC	9,94 a*	10,42 a	9,22 a	10,12 a
M2 NC	9,98 a	9,73 a	9,08 a	9,27 a
M3 NC	9,65 a	9,78 a	10,64 a	10,39 a
M4 NC	10,13 a	8,68 a	9,63 a	9,45 a
M5 NC	9,54 a	9,12 a	8,12 a	9,49 a
M1 1%	9,51 a	9,45 a	8,81 a	9,78 a
M2 1%	9,77 a	9,64 a	8,25 a	10,31 a
M3 1%	9,56 a	9,62 a	9,10 a	9,31 a
M4 1%	9,51 a	10,59 a	11,23 a	8,64 a
M5 1%	9,23 a	8,81 a	9,67 a	8,69 a
M1 1,5%	9,93 a	9,58 a	9,65 a	7,29 a
M2 1,5%	9,35 a	9,61 a	9,79 a	8,56 a
M3 1,5%	9,92 a	8,87 a	11,00 a	8,80 a
M4 1,5%	9,53 a	9,48 a	8,17 a	7,77 a
M5 1,5%	9,62 a	8,45 a	8,03 a	7,85 a
M1 2,5%	9,34 a	9,51 a	7,99 a	8,53 a
M2 2,5%	9,54 a	9,38 a	8,74 a	8,11 a
M3 2,5%	9,44 a	9,39 a	8,63 a	8,12 a
M4 2,5%	9,65 a	9,18 a	9,82 a	9,36 a
M5 2,5%	9,42 a	9,80 a	9,49 a	7,23 a

\*Médias na mesma coluna não mostraram diferença estatística pelo teste Skott Knot ao nível de significância de 5 %.

**Continuação da Tabela 5...**

CMC/Amido + %ZnO	Log do número de UFC/ mL				
	8 DI	12 DI	17 DI	23 DI	30 DI
M1 NC	8,74 a	8,45 b	6,71 c	6,10 b	5,33 c
M2 NC	8,34 a	8,07 b	9,65 a	7,91 a	8,69 a
M3 NC	9,39 a	9,60 a	9,53 a	9,00 a	8,92 a
M4 NC	10,18 a	7,78 b	8,08 b	9,09 a	8,98 a
M5 NC	9,67 a	9,02 a	7,56 b	9,07 a	8,27 a
M1 1%	7,97 b	8,66 b	6,95 c	6,21 b	5,84 c
M2 1%	8,01 b	8,31 b	8,67 b	8,40 a	8,03 b
M3 1%	8,41 b	9,52 a	8,78 b	8,58 a	6,99 b
M4 1%	8,73 b	7,36 b	8,62 b	7,30 a	8,30 a
M5 1%	9,57 a	9,65 a	7,67 b	8,75 a	7,72 b
M1 1,5%	7,37 b	8,57 b	6,11 c	5,03 b	7,16 b
M2 1,5%	8,55 b	8,61 b	7,66 b	6,78 b	6,92 b
M3 1,5%	7,98 b	8,53 b	7,72 b	7,64 a	4,88 c
M4 1,5%	7,12 b	6,06 c	6,09 c	7,16 a	7,54 b
M5 1,5%	8,26 b	7,74 b	6,04 c	7,85 a	6,61 b
M1 2,5%	6,45 b	7,15 c	5,70 c	5,60 b	5,98 c
M2 2,5%	7,26 b	6,07 c	6,23 c	7,40 b	5,08 c
M3 2,5%	8,53 b	6,80 c	6,20 c	6,04 b	5,82 c
M4 2,5%	7,37 b	5,26 c	5,74 c	6,03 b	5,65 c
M5 2,5%	7,24 b	6,65 c	7,03 c	8,37 a	6,65 b

\*médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Skott Knot ao nível de significância de 5 %.

Apesar de não apresentar interação estatisticamente significativa até os 23 DI, os dois fatores avaliados (composição polimérica e concentração de ZnO), influenciam a sobrevivência das células rizobianas. A interação estatística ocorre tardiamente, sugerindo haver um sinergismo de propriedades das composições poliméricas (Tabela 6). Porém vale ressaltar que a influência dos dois fatores ocorre a partir de 8 dia de incubação (dados não mostrados).

**Tabela 6:** Análise de variância dos dados referentes à sobrevivência das células rizobianas incubadas em composições poliméricas compatibilizadas com ZnO e não compatibilizadas, aos 23 e 30 dias após a inoculação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F calculado	Prob.>F calc
<b>23 dias após a inoculação</b>					
Composição	4	30,01	8,50	10,47	0,0001*
% ZnO	3	23,99	8,00	9,85	0,0003*
Interação Composição/ % ZnO	12	5,55	0,46	0,57	0,8409**
Erro	20	16,24	0,81		
Total	39	79,80			
Coeficiente de Variação=12,68%					
<b>30 dias após a inoculação</b>					
Composição	4	11,80	2,95	9,18	0,0002*
% ZnO	3	24,62	8,21	25,54	0,0000*
Interação Composição/ % ZnO	12	29,17	2,43	7,56	0,0000*
Erro	20	6,43	0,32		
Total	39	72,02			
Coeficiente de Variação=8,32%					

\*Não Significativo ao nível de significância de 5%. \*\* Significativo ao nível de significância de 5%

Os estudos realizados até o momento no laboratório de Ciência e Tecnologia de Polímeros no Departamento de Engenharia Química no Instituto de Tecnologia da UFRRJ têm mostrado que a quantidade de ZnO altera as propriedades reológicas da mistura e permite uma melhor compatibilização do composto tripartite (OLIVEIRA, comunicação pessoal). Neste sentido a utilização de agentes compatibilizantes é vantajosa para as propriedades da mistura. Porém altas concentrações de ZnO podem resultar em grande quantidade de ZnO não complexado, ficando livre na mistura, deixando de atuar como compatibilizante. O ZnO tem ação bactericida sobre alguns microrganismos (LIU e YANG, 2003). Sendo assim, a inoculação de bactérias em meios contendo elevadas concentrações de ZnO, pode reduzir a sobrevivência das células. Porém como a utilização de concentrações muito baixas de ZnO pode não ser suficiente para compatibilizar a mistura, é essencial determinar a concentração ótima de ZnO para a composição de um veículo a base da composição CMC/ amido para um inoculante rizobiano.

Diversas estirpes de rizóbio são sensíveis a concentrações medianas de zinco, o que resulta em baixas populações de rizóbios em solos contaminados com esse metal ou quando este ocorre de maneira natural (BROSS et al., 2004). É possível que a estirpe BR 3267 seja sensível a presença deste metal, o que deve ter influenciado na redução do número de células observado nos tratamentos cujas misturas foram compatibilizadas com maiores concentrações de ZnO.

O comportamento de bactérias inoculadas em géis ou em outras matrizes capazes de manter umidade tem sido descrito na literatura e pode variar de acordo com

a espécie bacteriana, teor de umidade e composição da mistura (JAWSON et al., 1982; OMAR, 1993; CAUTROUX et al., 2001; TEMPRANO et al., 2002). A presença de compostos contendo elevadas concentrações de metais pesados pode influenciar diretamente na manutenção de células sensíveis, como relatado por BEN REBAH et al., (2002).

As populações bacterianas obtidas a 30 DI podem ser consideradas elevadas quando comparadas com dados da literatura em que diversos veículos de inoculação promoveram uma queda percentual muito maior no número de células rizobianas do que a observada neste experimento (DENARDIN, 1997; HAFEEZ, et al., 1989; KREMER e PETERSON, 1983; TEMPRANO et al., 2002).

### **4.3 Avaliação das Composições Poliméricas Compatibilizadas com MgO e não Compatibilizadas, como Veículo de Inoculante Rizobiano**

A utilização de MgO como agente compatibilizante de composições poliméricas foi avaliada quanto à sobrevivência das células da estirpe BR 3267 de *B. japonicum* durante 30 dias de incubação a temperatura ambiente.

No experimento em que o MgO foi utilizado como agente compatibilizante, as contagens bacterianas revelaram que a concentração de células presente na suspensão bacteriana utilizada como inóculo foi de  $1,4 \times 10^9$  ufc/mL. A suspensão foi adicionada às composições poliméricas listadas na Tabela 1. Após a inoculação, a concentração bacteriana foi de  $4,2 \times 10^8$  ufc/mL de inoculante.

Nesse experimento a composição M1 compatibilizada com 2,5% de MgO, revelou um grande número de contaminantes já nas primeiras contagens, o que foi atribuído a uma esterilização ineficiente ou um acondicionamento inadequado do material após a esterilização, por esse motivo os dados dessa mistura não serão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7:** Sobrevivência de células de *B. japonicum* (BR 3267) armazenadas por 30 dias a temperatura ambiente em diferentes proporções de composições poliméricas a base de CMC/ Amido (M1; M2; M3; M4; M5) compatibilizadas com MgO (1, 1.5 e 2.5%) e não compatibilizadas.

CMC/Amido + %MgO	Log do número de UFC/ mL			
	1° DI	2° DI	3° DI	5° DI
M1 NC	9,13 a	8,56 b	8,04 a	7,02 a
M2 NC	8,32 a	8,20 b	8,70 a	7,68 a
M3 NC	8,55 a	8,52 b	8,88 a	10,03 a
M4 NC	9,11 a	8,61 b	8,11 a	9,98 a
M5 NC	8,34 a	8,20 b	7,53 a	7,39 a
M1 1%	8,51 a	8,28 b	8,45 a	7,55 a
M2 1%	8,63 a	8,20 b	9,00 a	9,93 a
M3 1%	8,55 a	8,57 b	8,92 a	8,37 a
M4 1%	8,19 a	8,49 b	8,34 a	9,50 a
M5 1%	8,17 a	8,31 b	7,91 a	8,07 a
M1 1,5%	8,42 a	8,54 b	8,61 a	7,73 a
M2 1,5%	8,42 a	8,90 a	9,33 a	8,69 a
M3 1,5%	8,78 a	8,00 b	9,05 a	9,06 a
M4 1,5%	8,42 a	8,35 b	9,34 a	9,37 a
M5 1,5%	8,57 a	8,64 b	9,85 a	8,05 a
M2 2,5%	8,57 a	8,93 a	9,90 a	8,95 a
M3 2,5%	8,42 a	9,37 a	9,36 a	10,53 a
M4 2,5%	8,64 a	9,84 a	8,91 a	10,95 a
M5 2,5%	8,66 a	9,42 a	9,02 a	10,02 a

\*médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Skott Knot ao nível de significância de 5 %.

**Continuação da tabela 7...**

CMC/Amido + %MgO	Log do número de UFC/ mL				
	8° DI	12° DI	17° DI	23° DI	30° DI
M1 NC	6,62 a	7,35 b	6,23 a	5,33 a	4,86 c
M2 NC	7,23 a	6,61 b	6,43 a	6,42 a	5,09 c
M3 NC	8,11 a	10,32 a	8,69 a	7,86 a	8,71 a
M4 NC	7,97 a	10,40 a	8,39 a	8,37 a	9,24 a
M5 NC	8,34 a	8,19 b	7,59 a	6,62 a	6,02 c
M1 1%	5,77 a	6,22 b	6,86 a	5,76 a	6,51 c
M2 1%	7,05 a	7,72 b	7,38 a	6,49 a	7,35 b
M3 1%	8,85 a	8,07b	7,76 a	5,63 a	7,30 b
M4 1%	9,15 a	10,55 a	7,20 a	6,29 a	6,78 b
M5 1%	6,87 a	8,92 a	6,55 a	6,64 a	6,97 b
M1 1,5%	7,51 a	6,26 b	6,05 a	6,54 a	5,43 c
M2 1,5%	6,66 a	10,36 a	7,40 a	5,83 a	5,62 c
M3 1,5%	10,31 a	10,44 a	6,37 a	5,92 a	5,91 c
M4 1,5%	8,77 a	11,27 a	5,37 a	5,84 a	7,03 b
M5 1,5%	9,02 a	9,84 a	5,81 a	5,52 a	5,79 c
M2 2,5%	9,07 a	9,60 a	6,90 a	5,30 a	5,37 c
M3 2,5%	10,18 a	11,03 a	7,03 a	5,71 a	6,08 c
M4 2,5%	11,28 a	11,35 a	5,61 a	6,28 a	5,23 c
M5 2,5%	9,73 a	10,19 a	5,74 a	6,32 a	5,66 c

\*médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Skott Knot ao nível de significância de 5 %.

O comportamento do MgO como agente compatibilizante promoveu bacteriano uma elevação inicial da população bacteriana, seguida de queda do número de células viáveis a partir do 15° dia de incubação (Tabela 7). Não é relatada na literatura atividade bactericida sobre estirpes de rizóbio para este composto (MgO), sendo assim, o aumento das populações bacterianas nas composições compatibilizadas pode ser atribuído ao fato dessas bactérias se beneficiarem das fontes de carbono presentes na mistura.

A análise dos dados referente à sobrevivência das células rizobianas em composições poliméricas compatibilizadas com MgO e não compatibilizadas, revelou que não houve interação entre os dois fatores avaliados, mas que os fatores isolados

(composição e concentração de MgO) influenciam na manutenção ou sobrevivência das células rizobianas como pode ser observado na análise de variância (Tabela 8).

**Tabela 8:** Análise de variância dos dados referentes à sobrevivência das células rizobianas incubadas em composições poliméricas compatibilizadas com MgO e não compatibilizadas, aos 23 e 30 dias após a inoculação.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F calculado	Prob.>F calc
<b>23 dias após a inoculação</b>					
Composição	4	2,90	0,72	0,51	0,7265*
% MgO	3	6,56	2,19	1,55	0,2343*
Interação Composição/ %MgO	11	12,97	1,18	0,84	0,6095*
Erro	19	26,80	1,41		
Total	37	49,23			
Coeficiente de Variação=19,02%					
<b>30 dias após a inoculação</b>					
Composição	4	13,87	3,47	3,06	0,0417**
% ZnO	3	10,94	3,65	3,22	0,0458**
Interação Composição/ %MgO	11	25,31	2,30	2,03	0,0840*
Erro	19	21,50	1,13		
Total	37	71,61			
Coeficiente de Variação=16,78%					

\*Não Significativo ao nível de significância de 5%. \*\* Significativo ao nível de significância de 5%

Avaliando a sobrevivência de estirpes de *B. japonicum* em géis de celulose, JAWSON et al. (1989), observaram que as bactérias inoculadas diretamente do meio de cultura, sem passar pelo processo de centrifugação e ressuspensão das células em água estéril, apresentaram um comportamento semelhante ao observado no experimento em que foi utilizado MgO como agente compatibilizante. Porém, quando as bactérias adicionadas aos géis foram oriundas de centrifugação e ressuspensão das células em água estéril não foi observado o aumento do número de células.

Apesar da centrifugação e ressuspensão de células ter sido realizada no presente estudo, as quantidades de Mg<sup>2+</sup> resultantes da adição de MgO como agente compatibilizante possivelmente possibilitaram o comportamento de células inoculadas diretamente do meio de cultura. Concomitantemente, as bactérias podem ter utilizado o amido ou o CMC das misturas como fonte de carbono, o que pode ter sido evidenciado no experimento anterior devido à utilização do ZnO. Alguns estudos já demonstraram que algumas espécies de rizóbios como *B. japonicum* e *Sinorhizobium fredii* e *Rhizobium* spp. podem sintetizar enzimas que degradam CMC e outros ésteres de celulose (CHEN et al., 2004; HU e LIN, 2003)

Independentemente do agente compatibilizante utilizado, as concentrações bacterianas na proporção M1 foram muito baixas, assim como no experimento utilizando-se anterior (Tabela 7).

#### **4.4 Comparação da Turfa usada como o Veículo para o Inoculante Sólido Comercial, com Veículos Preparados a partir de Composições Poliméricas a Base de CMC/Amido Compatibilizadas com ZnO e MgO.**

Para avaliar o comportamento da estirpe BR3267 nessas duas misturas, foi realizado um terceiro experimento utilizando-se os diferentes agentes compatibilizantes nessas composições poliméricas, bem como o inoculante turfoso para comparação. A partir dos experimentos utilizando-se 20 composições poliméricas compatibilizadas com ZnO ou MgO, foram selecionadas as composições que foram capazes de manter as concentrações mais elevadas de células pelo período de duração dos experimentos. Além deste critério, as composições poliméricas foram selecionadas de acordo com as suas propriedades reológicas, avaliadas por ROHR et al. (2004).

As composições selecionadas para esse experimento foram as composições CMC/amido nas proporções M3 e M4, compatibilizadas com 1% de ZnO ou 1% de MgO e não compatibilizadas. Para avaliar a eficiência das composições a base de CMC e amido. Foi testada também a turfa, substrato mais utilizado para a fabricação do inoculante rizobiano sólido no Brasil. Neste experimento foi avaliada a capacidade dos veículos na manutenção de células rizobianas até a 12<sup>a</sup> semana de incubação (SI).

Foi observada ligeira separação de fases das composições poliméricas compatibilizadas com ZnO a partir da 4<sup>a</sup> SI. A redução do número de células a partir do mesmo período. Ao longo deste período, o ZnO livre provavelmente se tornou biodisponível e portanto, com atividade bactericida. Logo, a separação de fases e a queda do número de células rizobianas podem ser explicadas através de alteração da interação entre os componentes da composição, resultando em modificação do ambiente químico favorável a sobrevivência das bactérias.

As composições compatibilizadas com MgO, foram capazes de manter elevadas concentrações celulares até o final do experimento, não havendo diferenças estatisticamente significativas quando comparado com a turfa. Vale ressaltar que as misturas compatibilizadas com MgO apresentaram o mesmo aumento inicial no número total de células viáveis, semelhante ao que foi observado no experimento anterior onde foi utilizado esse agente compatibilizante. Os dados provenientes dos dois experimentos indicam que para a estirpe BR 3267, as melhores taxas de sobrevivência foram encontradas nas composições poliméricas compatibilizadas com MgO (Tabela 9). A homogeneidade macroscópica das composições compatibilizadas com MgO, possivelmente confere a essas composições propriedades constantes, o que contribui para a maior sobrevivência das células incubadas neste veículo, diferentemente do comportamento das células incubadas nas composições poliméricas compatibilizadas com ZnO.

Com relação às características culturais da estirpe BR 3267 quando incubadas nos veículos de inoculação selecionados ao longo das 12 SI, é importante destacar que não foi observada nenhuma alteração durante o padrão de crescimento em meio de cultura YMA, tais como, tempo de crescimento, morfologia de colônia, pH, produção de muco, etc. Em contraste a essa observação, alguns estudos têm revelado que rizóbios incubado em veículos líquidos (MAURICE et al., 2001) ou em inoculantes turfosos (REVELLIN et al., 2000; FENG, et al., 2002), podem ter suas características culturais modificadas, após o armazenamento. A modificação de características fisiológicas pode culminar na diminuição da eficiência simbiótica e competitiva da bactéria inoculada (PINOCHET et al., 1993).

Semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, bactérias incubadas em géis de celulose também não apresentaram modificações fisiológicas detectáveis (JAWSON et al., 1989), resultados corroborados por DENARDIN e FREIRE (2000) ao

avaliar a sobrevivência de estirpes de *B. ekanii* em diferentes misturas de polímeros naturais e sintéticos. DEAKER et al, (2004) destacaram que a manutenção de células rizobianas em gel pode ser uma estratégia para a formulação de inoculante.

O comportamento de estirpes bacterianas incubadas em diferentes veículos e condições pode diferir significativamente. Alguns estudos têm mostrado que a temperatura de incubação do inoculante é importante para a manutenção do elevado número de células. Células mantidas a temperatura ambiente tendem a diminuir o número de células viáveis, quando incubadas em diversos veículos, como poliacrilamida, maravalha, torta de filtro, turfa entre outros (DOMMERGUES et al.,1979; KREMER e PETERSON, 1983; HAFEEZ, et al., 1989). Porém, alguns polímeros podem manter elevadas populações bacterianas incubadas em temperaturas de até 30° C, como por exemplo, o alginato (HEGDE e BRAHMAPRAKASH, 1992). A capacidade de sustentação de elevado número de células em matrizes poliméricas a base de alginato demonstra que esse polímero é termo estável. Provavelmente a mistura polimérica a base de CMC/amido, também detenha essa característica, o que explicaria a elevada sobrevivência de células rizobianas incubadas a temperatura ambiente, principalmente nas misturas compatibilizadas com MgO. Essa característica é muito importante na redução do custo de transporte dos inoculantes até regiões produtoras mais distantes como no caso do feijão caupi no Nordeste brasileiro e a soja no Centro Oeste.

A capacidade do CMC em sustentar elevada concentração de células em temperaturas relativamente altas já foi demonstrada para bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (KIM et al., 1988). O presente estudo é um dos pioneiros a demonstrar a capacidade de misturas poliméricas contendo CMC em sustentar elevadas quantidades de células rizobianas viáveis quando armazenadas a temperatura ambiente.

Muitos trabalhos que avaliam o desempenho de veículos de inoculação encontrados na literatura começam as contagens bacterianas tardiamente, geralmente após os 7 DI, ignorando o do comportamento inicial das bactérias no veículo. O presente estudo mostra que é importante entender a dinâmica das bactérias incubadas em diferentes veículos desde o início, uma vez que o comportamento pode variar mesmo no estágio inicial de armazenamento. Entender essa dinâmica pode auxiliar a determinação de diferentes estratégias de manuseio e armazenamento, bem como avaliar os efeitos das concentrações de agentes compatibilizantes e de polímeros utilizados para alcançar condições mais estáveis.

Uma das características desejáveis para o desenvolvimento de um bom veículo de inoculação é a manutenção das características do veículo ao longo do período de estocagem (CASSIDY, et al., 1996; EL HADDAD, 1985; DENARDIN, 1997; ROUGLEY, 1970). A instabilidade dimensional observada nas composições compatibilizadas com ZnO compromete essas formulações com relação a esta característica demonstrando a necessidade de um estudo mais aprofundado do sistema CMC/amido-ZnO-água (ROHR et al., 2004).

**Tabela 9:** Sobrevivência de células de *Bradyrhizobium japonicum* (estirpe BR 3267) durante 3 meses a temperatura ambiente inoculadas em misturas poliméricas a base de CMC e amido nas proporções M3 e M4, com ou sem agente compatibilizante (1% ZnO ou MgO).

Composição Polimérica (CMC/Amido)	Semanas de incubação (Log n° células/ mL)								
	1 SI	2 SI	3 SI	4 SI	5 SI	6 SI	8 SI	10 SI	12 SI
M3 NC	9,35 a*	9,19 a	8,84 a	8,33 a	9,36 a	8,40 ab	7,81 a	8,25 a	8,64 ab
M3 1%ZnO	9,97 a	8,31 a	7,82 a	7,72 a	7,32 ab	5,24 b	6,48 a	5,21 b	7,23 ab
M3 1% MgO	9,56 a	11,36 a	8,49 a	8,76 a	9,02 a	8,98 b	8,61 a	9,23 a	9,23 a
M4 NC	8,11 a	9,28 a	9,84 a	9,78 a	8,90 a	8,31 ab	7,25 a	9,28 a	8,21 ab
M4 1% ZnO	9,07 a	8,75 a	8,93 a	8,09 a	5,83 b	6,70 ab	6,54 a	7,20 ab	5,85 b
M4 1% MgO	10,04 a	11,66 a	10,30 a	8,83 a	9,13 a	9,00 a	9,01 a	9,33 a	9,41 a
Turfa	9,93 a	10,11 a	10,14 a	9,46 a	9,99 a	9,16 a	8,93 a	8,43 a	8,96 ab

SI= semanas de incubação/ NC= não compatibilizadas\*Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, ao nível de significância de 5%

#### 4.5 Avaliação da Sobrevivência de Células Rizobianas em Sementes de Feijão Caupi Peletizadas Utilizando Inoculantes Preparados a Partir de Diferentes Veículos

A peletização de sementes de leguminosas já microbiolizadas com células de estirpe de rizóbio eficiente e competitiva pode ser uma prática que a princípio facilitaria o uso da tecnologia, principalmente, em se tratando de agricultores pouco familiarizados com a prática da inoculação. Outros estudos demonstraram que a turfa não é capaz de manter elevadas concentrações de células em sementes pré-inoculadas (RICE, et al., 2001a; THOMPSON e STOUT, 1992).

As sementes peletizadas receberam uma quantidade variável de células, em função do período inicial de incubação de 12 dias a que foram submetidos todos os inoculantes (Tabela 10). Porém todos os tratamentos receberam uma quantidade de células maior que de  $6 \times 10^5$  células por sementes, que é a quantidade mínima de células rizobianas permitida pela legislação brasileira (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA A E ABASTECIMENTO, 2004).

Todos os tratamentos apresentaram uma redução no número de células durante o período de incubação (Figuras 6).

Até a quinta semana de armazenamento, verifica-se que o número de células por sementes se manteve, estando próximo da quantidade mínima permitida pela legislação brasileira. É relatado na literatura que a adição de alguns compostos estabilizantes e adesivos pode aumentar a quantidade de células aderidas a sementes incubadas à temperatura ambiente (TEMPRANO et al., 2002). Em contrapartida, a adição destes compostos é capaz de onerar a produção de inoculantes ou de sementes pré-inoculadas, e por isso não foi considerada neste trabalho, cujo objetivo foi otimizar a produção e diminuir custos para a produção de inoculantes para a cultura do feijão caupi. Todos os tratamentos apresentaram uma concentração de  $10^4$  células por semente na 8ª semana de armazenamento, o que representa menos de 10 vezes que o mínimo permitido pela legislação brasileira.

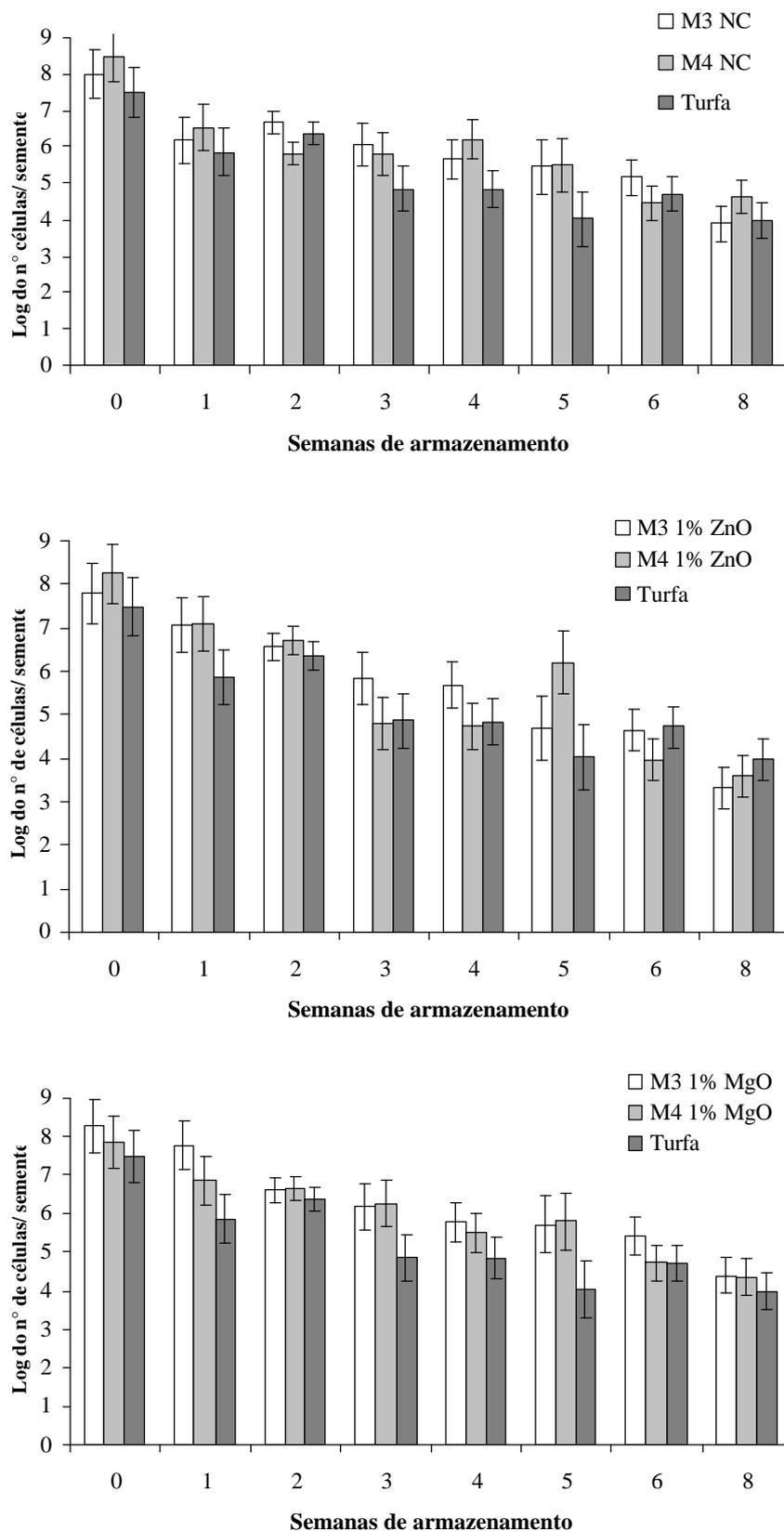
**Tabela 10:** Concentração de células presentes em sementes de feijão caupi após a peletização com inoculantes formulados com diferentes veículos e com o estirpe BR 3267 de *B. japonicum* (valores são médias de 3 repetições).

Veículo de inoculação		Nº de células/semente
Composição Polimérica CMC/Amido	Agente Compatibilizante	
	-	$9,77 \times 10^7$
M3	1% de ZnO	$6,17 \times 10^7$
	1% de MgO	$1,86 \times 10^8$
	-	$2,88 \times 10^8$
M4	1% de ZnO	$1,78 \times 10^8$
	1% de MgO	$6,92 \times 10^7$
Turfa		$3,02 \times 10^7$

Os métodos de pré-inoculação de sementes de alfafa (RICE, et al., 2001a; RICE, et al, 2001b), trevo (BROOKE et al., 1992) e grão de bico (KYEI-BOAHEN et al., 2002) demonstram que a produtividade em condição de campo é geralmente inferior quando comparadas com aquelas alcançadas com a inoculação convencional. RICE et al., (2001a) destaca ainda que a produtividade, nodulação e a FBN são ainda menores para as plantas cultivadas em solos ácidos, por esse motivo, é de fundamental importância a avaliação dessa metodologia para a utilização em cultivos nos solos tropicais.

JUNG e MUNGIER (1985) em estudos realizados com soja, relataram igual nodulação e FBN, comparando os a inoculação no momento do plantio e, sementes pré-inoculadas plantadas após 33 DI, utilizando como veículos as misturas das gomas caroba e xantana. Outro estudo demonstrou resultados semelhantes na nodulação, FBN, e produtividade em *Lupinus* sp. Comparando a inoculação das sementes no momento do plantio e a pré-inoculação 48 dias antes do plantio, utilizando-se goma arábica como veículo de inoculação (GAUTH, et al., 1986).

As misturas poliméricas testadas neste estudo têm a capacidade de incubar elevadas quantidades de células rizobianas em determinadas condições demonstram ter a capacidade de manter elevadas concentrações celulares em sementes de feijão caupi. A utilização de misturas poliméricas requer uma criteriosa seleção de pares poliméricos, agentes compatibilizantes e condições de estudo.



**Figura 2:** Sobrevivência de células rizobianas inoculadas utilizando-se como veículos composições poliméricas CMC/amido M3 e M4 não compatibilizadas (A), compatibilizadas com 1% ZnO (B) e compatibilizadas com 1% de MgO (C) e turfa (Barras representam o desvio padrão). NC= Não compatibilizado.

#### **4.6 Desenvolvimento e Nodulação de Feijão Caupi Inoculado com Inoculantes Preparados a partir Diferentes Veículos em Condições de Casa de Vegetação.**

O experimento em condições de casa de vegetação teve por objetivo avaliar a capacidade de misturas poliméricas atuarem como veículo de inoculação de rizóbio em feijão caupi, comparativamente ao veículo de inoculação sólido mais utilizado no Brasil, a turfa. O experimento foi implantado em condições de casa de vegetação, pois este ambiente apresenta condições mais controladas se comparado com o ambiente do campo experimental. Vale a pena ressaltar que a utilização de misturas poliméricas a base de CMC/amido, como veículos de inoculação, é um tema novo na pesquisa rizobiológica, exige, portanto, avaliações preliminares antes de testes mais próximos das condições de plantio, como os testes em campos experimentais.

O número de células por sementes no plantio do experimento de casa de vegetação é apresentado na Tabela 10, na seção 4.5.

Foram realizadas duas coletas para avaliar a nodulação e os parâmetros relativos ao desenvolvimento vegetal em dois estágios diferentes do desenvolvimento vegetal. A primeira coleta foi feita aos 35 dias após a emergência (DAE), fase onde as plantas encontravam-se ainda no estado vegetativo e a segunda coleta, aos 50 DAE, quando todas as plantas se encontravam no estado reprodutivo e estando todas com flores ou botões florais. Em ambas as coletas as plantas apresentavam-se sadias e sem sintomas de doenças ou ataque por pragas.

Foi observada diferença estatística entre as coletas no parâmetro matéria seca da parte aérea e nitrogênio total da parte aérea. Aos 50 DAE as plantas apresentavam-se maiores e devido ao maior desenvolvimento vegetal, uma vez que aos 35 DAE as plantas eram ainda juvenis. Essa observação é normal em experimentos desta natureza.

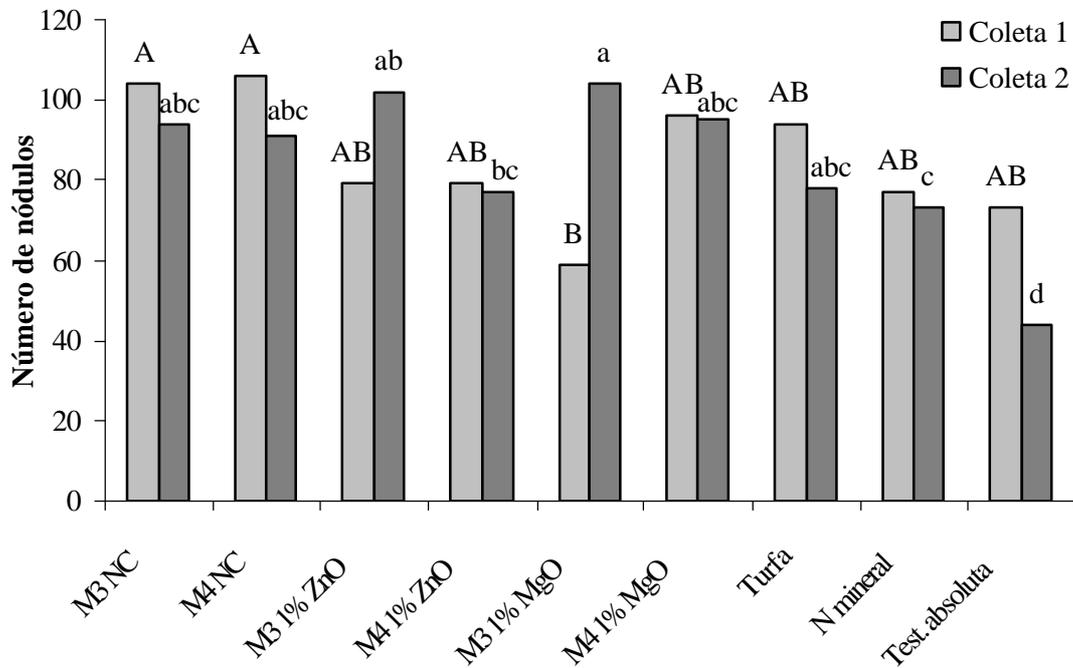
Na primeira coleta a matéria seca da parte aérea no tratamento com a composição polimérica M4 não compatibilizadas, destacou-se em relação à turfa, sendo superior estatisticamente em relação à esta a composição polimérica M4, também apresentou tendência a se destacar dos demais tratamentos no parâmetro nitrogênio total da parte aérea (Tabela 11).

Na segunda coleta não houve diferença estatística entre os tratamentos no parâmetro matéria seca da parte aérea, no entanto, no parâmetro nitrogênio total da parte aérea, as plantas que receberam nitrogênio mineral apresentaram tendência a se destacar em relação aos demais tratamentos, apresentando-se estatisticamente superior aos tratamentos M3 não compatibilizada, M4 compatibilizada com 1% de MgO, e testemunha absoluta (Tabela 11).

A composição M3 compatibilizado com 1% de MgO destacou-se em relação aos demais tratamentos no parâmetro número de nódulos na segunda coleta, o que não havia sido verificado na primeira coleta, onde os tratamentos que apresentaram tendência a destacarem-se foram os veículos M3 e M4 ambos não compatibilizados (Figura 3). As testemunhas nitrogenada e total apresentaram um número de nódulos elevado (Figura 3), uma vez que o feijão caupi é uma planta muito promíscua, nodulando com diversas estirpes de rizóbio nativas (ZILLI et al., 2004).

As plantas inoculadas com bactérias veiculadas pelas composições poliméricas, apresentaram nodulação igual àquelas inoculadas com bactérias veiculadas pela turfa (Figura 3), o que demonstra a capacidade da utilização destas composições como veículos de inoculação de rizóbio em feijão caupi. Esses resultados corroboram os resultados de diversos trabalhos nos quais foram utilizados outros polímeros para veicular células rizobianas a leguminosas se comparando os com técnicas já utilizadas, como o uso de turfa (DENARDIN et al., 1997; JUNG e MUNGIER et al., 1982) ou inoculantes líquidos (SARR et al., 2005). Também não foram observadas diferenças

estatísticas entre os parâmetros do desenvolvimento vegetal, demonstrando que os inoculantes rizobianos não apresentam toxidez às sementes, não influenciando negativamente no vigor da germinação.



**Figura 3:** Nodulação de feijão caupi aos 35 DAE (Coleta 1) e 50 DAE (Coleta 2) inoculado com a estirpe BR 3267 de *B. japonicum*, utilizando diferentes veículos de inoculação. (Barras com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste t ao nível de 5% de significância.)

**Tabela 11:** Matéria seca e Nitrogênio total da parte aérea das plantas de feijão caupi inoculadas com diferentes veículos e coletadas aos 35 (coleta 1) e aos 50 (coleta 2) DAE.

Tratamento	Matéria seca da parte aérea (g/planta)		Nitrogênio total da parte aérea (mg/planta)	
	COLETA			
	1	2	1	2
M3 NC	1,54 B	3,38 A	50,20 B	67,97 B
M4 NC	2,17 A	3,86 A	82,32 A	97,74 AB
M3 1% ZnO	1,72 AB	3,92 A	58,86 AB	93,40 AB
M4 1% ZnO	1,42 B	3,87 A	57,63 B	92,05 AB
M3 1% MgO	1,40 B	3,65 A	51,46 B	92,22 AB
M4 1% MgO	1,78 AB	3,30 A	59,49 AB	66,00 B
Turfa	1,67 B	2,98 A	61,39 AB	78,80 AB
N mineral	1,61 B	3,69 A	64,36 AB	114,60 A
Test. absoluta	1,54 B	2,91 A	64,83 AB	65,82 B
DMS**	0,50	1,22	24,21	38,12
CV***	20,63%	23,94%	27,12%	30,59%

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem pelo teste t ao nível de significância de 5%.

\*\*Diferença mínima significativa (teste t ao nível de significância de 5%)

\*\*\*Coeficiente de variação

O inoculante polimérico M3 compatibilizado com MgO que apresenta grande potencial para a utilização após um período mais longo de armazenamento, visto que a sobrevivência das células incubadas neste veículo foi bastante elevada, como observado na Tabela 9, além de apresentar a capacidade de promover nodulação abundante.

## 5 CONCLUSÕES

É possível obter composições poliméricas que atendam as exigências para um veículo de inoculação de células rizobianas, a partir da escolha adequada do par polimérico, do sistema de compatibilização, e da metodologia de preparo.

A seleção de veículos de inoculantes a base de misturas poliméricas deve ser acompanhado por um trabalho de caracterização físico-mecânico destas misturas, visando aumentar a qualidade do produto.

Misturas poliméricas a base de CMC e amido podem apresentar um potencial para utilização como veículo de inoculação para outras estirpes rizobianas em outras culturas, além do feijão caupi e da estirpe BR 3267, usado com modelo neste estudo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho utilizando misturas poliméricas a base de CMC e amido como veículo para inoculação de células rizobianas abre uma perspectiva inovadora na pesquisa com FBN. A utilização destes polímeros como veículo requer pesquisas interdisciplinares, sendo necessário um diálogo entre as áreas da química de polímeros e microbiologia do solo.

Os estudos dos grupos de pesquisa em microbiologia do solo da Embrapa Agrobiologia e de tecnologia de polímeros do Departamento de Engenharia Química da UFRRJ, associados aos Cursos de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo e de Engenharia Química, respectivamente, resultaram em setembro de 2005, no pedido de depósito de patente do inoculante rizobiano veiculado através de misturas poliméricas, algo que não é comum como produto da pós-graduação brasileira e que deve ser um exemplo a ser seguido, por grupos de pesquisa que de forma séria e compromissada tentam encontrar soluções para a agricultura brasileira.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, A.F. de; NUNES, R.C.R; VISCONTE, L.L.Y. Misturas BR/SBR: propriedades mecânicas em função do modo de preparo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 14 (4): 279-282, 2004.
- ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**. v. 252: 1–9, 2003.
- BAI, Y.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D.L. An inducible activator produced by a *Serratia proteamaculans* strain and its soybean growth-promotion activity under greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**. v. 53: 1495-1502, 2002.
- BARBER, K.E. Peatlands as scientific archives of past biodiversity. **Biodiversity and Conservation**. v.2: 474-489, 1993.
- BARRA, M.O.; ROEDER, J.; SOLDI, V.; PIRES, A.T.N.; AGNELLI, J.A.M. Blendas de poliamida 6/elastômero: propriedades e influência da adição de agente compatibilizante. **Polímeros–Ciência e Tecnologia**. v.13: 94–101, 2003.
- BASHAN, Y. Inoculant of plant-growth-promoting-rhizobacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 16: 729-770, 1998.
- BEN REBAH, F.; TYAGI, R.D.; PRÉVOST, D. Wastewater sludge as a substrate for growth and carrier for rhizobia: the effect of storage conditions on survival of *Sinorhizobium meliloti*. **Bioresource Technology**. v. 83: 145–151, 2002.
- BRADY, N.C. **Natureza e Propriedades dos Solos**. Rio de Janeiro. Livraria Freitas Bastos. 7 ed. 1989. pp. 878.
- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 27: 683–697, 1995.
- BROOKE, B.M; STOUT, D.G.; TUCKER, R.; PRESTON, C.M. Pre-inoculation of clover seed for aerial seeding on logged sites. **Journal of Range Management**. v. 45: 500–502, 1992
- CARLILE, B. For peat's sake. **Biological Sciences Review**. v. 12 (3): 19-21, 2000.
- CASSIDY, M.B.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 16: 79 – 101, 1996.
- CATROUX, G.; HARTMANN, A.; REVELLIN, C.; Trends in rhizobial inoculant production and use. **Plant and Soil**. v. 230: 21–30, 2001.
- CHEN, P.J.; WEI, T.C.; CHANG, Y.T., LIN, L.P. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Sinorhizobium fredii*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**. v. 45: 111 – 118, 2004.

CHUEIRE, L.M.O.; RANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16s rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 27:833–840, 2003.

COSTA, C.S.B. IRGANG, B.E., PEIXOTO, A.R., MARANGONI, J.C. Composição florística das formações vegetais sobre uma turfeira topotrófica da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**. v. 17 (2) 203–212, 2003.

DAZA, A.; SANTAMARÍA, C.; NOMBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C.; CAMACHO, M.; ORIVE, C.; TEMPRANO, F. Perlite as carrier for bacterial inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 32: 567–572, 2000.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R.J.; KENNEDY, I.R. Legume seed inoculation technology—a review. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 36: 1275 – 1288, 2004.

DENARDIN, N.D. **Avaliação de polímeros para formulação de inoculantes com *Bradyrhizobium elkanii***. Porto Alegre RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1997. 87 p. (Tese de Doutorado)

DENARDIN, N.D.; FREIRE, J.R.J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 16:215–217, 2000.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29: 771 – 774, 1997.

DOMMARGUES, Y. R.; DIEM, H. G.; DIVIES, C. Polyacrylamide-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37: 779–781, 1979.

EL-HADDAD, M.E. The present situation of *Rhizobium* legume inoculant in Egypt. In: Workshop on *Rhizobium*/ Legume Inoculants. 1985. Porto Alegre, RS. **Proceedings...** Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 43–100.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa do Solo, 1999. 212p

FENG, L.; ROUGHLEY, R.J.; COPELAND, L Morphological Changes of *Rhizobia* in Peat Cultures. **Applied Environmental Microbiology**. v. 68 (3): 1064–1070, 2002.

FERREIRA, A.N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C. de; ARAÚJO, R.S.; SÁ, M.E. de; BUZZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agrícola**. v.57 (3) 507–512, 2000.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; VIDOR, C.; VILAR, J.J.; OLIVEIRA FILHO, E. C. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. em substratos alternativos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 27 (11): 1497-1506, 1992.

FRANCHI, J.G. **Utilização de turfa como adsorvente de metais pesados. O exemplo da contaminação da Bacia do Rio Ribeira de Iguape por chumbo e metais associados.** São Paulo, SP. Universidade de São Paulo. p. 186, 1996 (Tese de Doutorado).

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology.** New York, McGraw Hill, 145 p. 1928.

FREIRE, J.R.J. Trabalhos em Rizobiologia no Rio Grande do Sul. IN: Reunião Latino-Americana. Inoculantes Leguminosa, 4, Porto Alegre, **Anais...**,1968: 19-24.

GAULT, R.R.; BROCKWELL, J.; CORBIN, E.J.; BOUNDY, K.A. Nodulation Studies on Legumes Exotic to Australia: *Lupinus* and *Ornithopus* spp. **Australian Journal of Experimental Agriculture.** v. 26: 37–48, 1986.

GOMEZ M.; SILVA N.; HARTMANN A.; SAGARDOY M.; CATROUX, G. Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 13, 167–173, 1997.

GONZÁLEZ, J.E.; MARKETON, M.M. Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 67(4): 574–592, 2003.

HAFEEZ, F.Y., IDRIS, M.; MALIK, K.A. Growth and survival of cowpea bradyrhizobia in various carrier materials. **Biology and Fertility of Soils.** v. 7: 279–282, 1989.

HEGDE, S.V.; BRAHMAPRAKASH, G.P. A dry granular inoculant of rhizobium for soil application. **Plant and Soil.** v. 144: 309–311, 1992.

HIRSCH, A.M.; LUM, M.R.; DOWNIE, J.A. What makes the rhizobia–legume symbiosis so special? **Plant Physiology.** v. 127: 1484 – 1492, 2001.

HU, C.Y.; LIN, L.P. Characterization and purification of hydrolytic enzymes in *Sinorhizobium fredii* CCRC15769. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** v.19: 515–522, 2003.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crop Research.** v. 65: 151–164, 2000.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUERIE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ–MAÑERO, F.J.; MEGÍAS, M.. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry.** v. 32: 1515– 528, 2000.

JANSEN, P.; SOARES, B.G. Effect of compatibilizer and curing system on the thermal degradation of natural rubber/EVA copolymer blends. **Polymer Degradation and Stability.** v. 52: 95–99, 1996.

JAWSON, M.D.; FRANZLUBBERS, A.J.; BERG, R.K. *Bradyrhizobium japonicum* survival in and soybean inoculation with fluid gels. **Applied Environmental Microbiology**. v.55: 617-622, 1982.

JUNG, G.; MUGNIER, J. Polymer-entrapped *Rhizobium* as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**. v. 65: 219-231, 1982.

KEYSER, H.H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B.B.. Rhizobial Ecology and Technology. In: METTING JUNIOR., F.B. ed. **Soil Microbial Ecology**. New York. Dekker. 1997. p. 205-206.

KYEI-BOAHEN, S.; SLINKARD, A.E.; WALLEY, F.L. Evaluation of rhizobial inoculation methods for chickpea. **Agronomy Journal**. v. 94: 851-859, 2002.

KIM, H.S.; KAMARA, B.J.; GOOD, I.C. ENDERS JUNIOR, G.L. Method for the preparation of stabile microencapsulated lactic acid bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 3: 253-257, 1988.

KHAVAZI, K. REJALI, F. Effect of carrier, incubation period and method of sterilization on survival of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean inoculant. 17th World Congress of Soil Science. 1985. Bangkok. Thailand. **Proceedings...** 1009-1-1009-6.

KONING, C.; VAN DUIN, M.; PAGNOULLE, C.; JEROME, R. Strategies for compatibilization of polymer blends. **Progress in Polymer Science**. v. 23: 707-757, 1998.

KOSTOV, O.; LYNCH, L.M. Composted sawdust as a carrier for Bradyrhizobium, Rhizobium and Azospirillum in crop inoculation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 14: 389-397, 1998

KREMER, R.J.; PETERSON, H.L. Effects of carrier and temperature on survival of *Rhizobium* spp. in legume inocula: development of an improved type of inoculant. **Applied and Environmental Microbiology**. 45:1790-1794, 1983.

LEDRU, M.P.; BRAGA, P.I.S., SOUBIÈS, F.; FOURNIER, M.; MARTIN, L.; SUGUIO, K.; TURCQ, B. The last 50000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**. v. 123: 239, 257.

LIU, H.L.; YANG, T.C.K. Photocatalytic inactivation of Escherichia coli and Lactobacillus helveticus by ZnO and TiO<sub>2</sub> activated with ultraviolet light. **Process Biochemistry**. v. 39: 475-481.

LLOYD, J. M., **Use of microorganisms in conjunction with seeds**. Patente Neozelandeza N°. NZ194466. 1983.

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W., RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38: 333-339, 2003.

MAURICE, S.; BEUCLAIR, P.; GIRAUD, J.J.; SOMMER, G.; HARTMANN, A.; CAUTROUX, G. Survival and physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after long-term storage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 17: 635–643, 2001.

MILES, A.A.; MISRA, S.S. The estimation of the bacterial power of the blood. **Journal of Hygiene**. v.38: 732–749, 1938.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n° 5 de 10 de agosto de 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Consultado em 03/02/2006.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUERA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA. 2002 p. 625.

NITRAL URBANA. Disponível em: [www.nitralurbana.com.br](http://www.nitralurbana.com.br), consultado em 10/09/2004.

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**. v. 30: 203–208, 1999.

OLSEN, P.E; RICE, W.A.; COLLINS, M.M. Biological contaminants in North American legume inoculants. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 27: 699–701, 1994.

OLSEN, P.E., RICE, W.A., BORDELEAU, L.M., DEMIDOFF, A.H., COLLINS, M.M., Levels and identities of non-rhizobial microorganisms found in commercial legume inoculant made with non-sterile peat carrier. **Canadian Journal of Microbiology**. 42: 72–75, 1996.

OMAR, S.H. Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. 1. In the absence of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 40: 1–6, 1993.

PERRET, X., STAHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64: 180 – 201, 2000.

PINOCHET, X.; ARNOUD, F.; CLEYET-MAREL, J.C. Competition for nodule occupancy of introduced *Bradyrhizobium japonicum* strain SMGS1 in French soils already containing *Bradyrhizobium japonicum* strain G49. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 39: 1022–1028.

PINTO-COELHO, R.M. **Fundamentos em Ecologia**. Porto Alegre. Editora Artmed. 2000. p. 252.

POLHILL, R.M.. Classification of the Leguminosae. In: Bisby, F.A.; Buckingham, J.; Harborne, J.B., eds. **Phytochemical dictionary of Leguminosae**. New York. Chapman and Hall. p. 1994.

POWSON, D.S. Understanding the soil nitrogen cycle. **Soil Use and Management**. 9:86 – 94, 1993.

REVELLIN, C.; MEUNIER, G., GIRAUD, J.J.; SOMMER, G. WADOUX, P.; CAUTROUX, C. Changes in the physiological and agricultural characteristics of peat-based *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after long-term storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 54: 206–211, 2000.

RICE, W.A.; CLAYTON, G.W.; LUPWAYI, N.Z.; OLSEN, P.E. Evaluation of coated seeds as a *Rhizobium* delivery system for field pea. **Canadian Journal of Plant Science**. 247: 253, 2001a.

RICE, W.A.; OLSEN, P.E; LUPWAYI, N.Z.; CLAYTON, G.W. Field comparison of pre-inoculated alfalfa seed and traditional seed inoculation with inoculant prepared in sterile and non-sterile peat. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. v. 32: (13/14). 2091–2107, 2001b.

ROHR, T.G.; GONÇALVES, L.S.A.; JANSEN, P.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. 2004. Use of cellulose/starch polymer blends as a vehicle for bacterial inoculants. IN: 22° Latin-American Conference on Rhizobiology and 1° Brazilian Conference on Biological Nitrogen Fixation. Miguel Pereira, **Anais...**, p. 59.

ROSA, D.S.; FRANCO, B.L.M.; CALIL, M.R. Biodegradabilidade e Propriedades Mecânicas de Novas Misturas Poliméricas. **Polímeros–Ciência e Tecnologia**. v.11 (2) 82–88, 2001.

ROBESON, L.M. Applications of polymer blends: Emphasis on recent advances. **Polymer Engineering and Science**. v 24. 587–597, 1984.

ROUGHLEY, R.J. The preparation and use of legume seed inoculant. **Plant and Soil**. 32: 676–701, 1970.

SARR, A.; DIOP, B.; PELTIER, R.; NEYRA, M.; LESUEUR. Effect of rhizobial inoculation methods and host plant provenances on nodulation and growth of *Acacia senegal* and *Acacia nilotica*. **New Forest**. v. 29. 75–87, 2005.

SMITH R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**. 38, 485–492, 1992.

SOARES, B.G.; OLIVEIRA, P.J. de. Efeito da Compatibilização da Mistura NBR/EVA sobre sua Morfologia de Fase Co-contínua. **Polímeros–Ciência e Tecnologia**. v 13 (1) 28–35, 2001.

SPARROW S. D. JR ; HAM; G. E.. Survival of *Rhizobium phaseoli* in six carrier materials. **Agronomy Journal**,v. 75, 181–184, 1983.

STEEL, R.G.D.; J.H. TORRIE, 1980. **Principles and procedures of statistics: A biometrical approach**. 2 ed. Nova York. McGraw Hill. 1980. p. 625.

SUVOROVA, A.I.; TJUKOVA, I.S.; TRUFANOVA, E.I. Thermodynamic and diffusion of biodegradable systems based on starch and cellulose derivates. **Journal of Environmental Polymer Degradation**. v. 7 (1): 35–40, 1999.

TEMPRANO, F.J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO M.; DAZA A.; SANTAMARÍA, C.; NOMBRE RODRÍGUEZ-NAVARRO, C. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**. v. 5: 81–86, 2002.

THOMPSON, D.J.; STOUT, D.G. Influence of three commercial seed coating on alfalfa seedling emergence, nodulation and yield. **Journal of Seed Technology**. v. 16: 9–16, 1992.

VINCENT, J.M. **A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 197, 164p. (IBP Handbook, 15).

VISCONTE, L.L.Y.; MARTINS, A.F.; NUNES, R.C.R.; SUAREZ, J.C.M. Misturas NR/SBR: Modos de Preparação e Propriedades. **Polímeros–Ciência e Tecnologia**. v. 11 (2): 76–81, 2001.

ZILLI, J.E.; VALISHESKI, R.R.; FREIRE FILHO, F.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of northeastern Brazil **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35: 281–287, 2004.

ZILLI, J.E. **Fixação biológica de nitrogênio pode aumentar a competitividade do Agronegócio em RR**. Disponível em: <http://www.floraef fauna.com/artigostecnicos/artigo35.doc>, consultado em 21/10/2005.