

# Biofertilizante Contendo Bactérias Diazotróficas







*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1517-8498  
Março/2008*

# ***Documentos 247***

**Biofertilizante Contendo Bactérias Diazotróficas**

**Carlos Alberto Bucher  
Veronica Massena Reis**

***Seropédica – RJ  
2008***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Veronica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Marco Antônio de Almeida Leal e Gustavo Ribeiro Xavier

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2008): 50 exemplares

B919b Bucher, Carlos Alberto

Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas / Veronica Massena Reis.  
Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 17 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498 ; 247)

1. Fertilizante. 2. Bactéria diazotrófica. I. Reis, V. M., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 631.8

## **Autores**

### **Carlos Alberto Bucher**

Estudante de Pós-Graduação do Instituto de Agronomia - UFRRJ  
BR 465, km 7  
23890-000 – Seropédica/RJ

### **Veronica Massena Reis**

Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da  
Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: [veronica@cnpab.embrapa.br](mailto:veronica@cnpab.embrapa.br)



# Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais presentes na sociedade moderna gerando uma busca por sistemas de produção agropecuários apoiados em bases agroecológicas.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação com a seguinte missão “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 247 intitulada “Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas” apresenta, em linhas gerais, o potencial que existe na utilização de microrganismos benéficos, que se associam às plantas, como uma forma alternativa aos fertilizantes químicos, para manter a produtividade agrícola e obter eficiência na nutrição de diversas culturas vegetais. O atual cenário mundial com os preços do petróleo bastante elevados cria sérias limitações à aplicação de fertilizantes, pois estes são dependentes dos processos energéticos derivados da indústria petroquímica. Os biofertilizantes apresentados como inoculantes já se mostram como uma realidade para plantas como a soja e espécies arbóreas. Contudo, também podem suprir nutrientes para gramíneas como milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar, entre outras.

A presente publicação mostra o potencial de uso de biofertilizantes para o público em geral interessado em buscar caminhos que associem produção com uma boa qualidade ambiental.

Eduardo Francia Carneiro Campello  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# SUMÁRIO

Introdução.....	7
Conceito .....	7
Visão geral do uso e composição de biofertilizantes.....	8
Considerações finais .....	13
Referências bibliográficas .....	14



# Biofertilizante Contendo Bactérias Diazotróficas

---

*Carlos Alberto Bucher  
Veronica Massena Reis*

## Introdução

---

A revolução verde trouxe um grande aumento no uso de fertilizantes, ocasionando um substancial incremento de produtividade das culturas. No entanto, os adubos representam porções significativas nos custos de produção, além de poder causar problemas ambientais. O nitrogênio é um dos nutrientes com baixo índice de eficiência, sendo utilizado pelas culturas em quantidade inferiores a 50% do N aplicado, enquanto o restante é perdido por lixiviação, podendo causar contaminação do lençol freático, ou perdido por desnitrificação como  $N_2O$  que contribui para o efeito estufa (BRONSON et al., 1997). Uma alternativa ao uso de adubos químicos é o uso de microrganismos, como bactérias fixadoras de nitrogênio. Estes microrganismos são normalmente utilizados como inoculantes ou biofertilizantes. O maior obstáculo para a utilização da tecnologia de inoculantes é a inconsistência de dados, que está ligada a fatores como condições edafo-climáticas, interação com a biota do solo, seleção de estirpes e qualidade dos inoculantes (REIS, 2006).

Apesar do grande número de fatores que afetam a eficiência dos inoculantes, neste trabalho foi dada maior atenção à composição dos inoculantes e problemas relacionados a sobrevivência de bactérias durante o armazenamento e inoculação.

## Conceito

---

De acordo com a Lei nº 6894, de 16 de novembro de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4954, de Janeiro de 2004, o inoculante é o produto que contém microrganismos com ação favorável ao crescimento das plantas, entendendo-se como: 1) suporte: material excipiente e esterilizado, livre de contaminantes segundo limites estabelecidos, que acompanha os microrganismos e tem a função de suportar ou nutrir, ou ambas as funções, ou que permite o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, facilitando sua aplicação, e 2) pureza do inoculante: ausência de qualquer tipo de microrganismos

que não sejam especificados. Segundo a mesma lei, biofertilizante é o produto que contém princípios ativos, isento de substância tóxica, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre todas ou parte das plantas cultivadas, elevando sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante. Segundo a Lei nº 6894, antes de sua regulamentação, inoculante era designado apenas para produtos contendo bactérias diazotróficas e os demais microrganismos entravam na categoria de biofertilizantes.

Atualmente, o termo biofertilizante é utilizado de forma mais generalizada, para todos os produtos contendo microrganismos capazes de influenciar o desenvolvimento das plantas de forma positiva, incluindo os inoculantes de bactérias diazotróficas (REIS, 2006). O uso de biofertilizante, contendo bactérias fixadoras, tem como objetivo fornecer um número suficiente de células viáveis para induzir a rápida colonização da rizosfera, permitindo a rápida ocorrência da nodulação após a germinação das sementes e resultar em ótimas produtividades (CATROUX, 1991).

O potencial máximo dos inoculantes ainda não foi alcançado, e para isto, os inoculantes devem apresentar certas características tais como: a estirpe utilizada ser competitiva e o número de células viáveis permitir a rápida colonização das raízes (DEAKER et al., 2004). Os inoculantes turfosos, líquidos ou em outras formulações devem conter uma população mínima de  $1 \times 10^9$  células/g ou ml de inoculante e devem ter comprovada a eficiência agrônômica, conforme normas oficiais da RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola), aprovadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A quantidade mínima de inoculante a ser utilizada deve ser a que forneça 600.000 células/semente. Resultados de pesquisa indicam benefícios crescentes à nodulação e à fixação biológica do nitrogênio pela utilização de populações de até 1.200.000 células/sementes.

## **Visão geral do uso e composição de biofertilizantes**

A capacidade de promover nodulação em leguminosas depende da quantidade de células ativas e da efetividade da estirpe bacteriana. Um dos fatores que influenciam a sobrevivência de bactérias é o veículo de inoculação, sendo o inoculante à base de turfa o mais

utilizado mundialmente devido suas características, como alta capacidade de retenção de água e alta superfície específica que suporta o alto desenvolvimento, sobrevivência e número de células (SMITH, 1992). Infelizmente a turfa é um recurso limitado e ausente em alguns países e poderá se tornar um recurso escasso no futuro. A turfa necessita, também, de rigoroso processamento como sua extração do campo, moagem, secagem, neutralização e esterilização antes de seu uso nos sistemas de produção comercial, e não é fácil de se usar em equipamento de plantio (TITTABUTR et al., 2007; BROCKWELL & BOTTOMLEY, 1995). Dessa forma, várias outras formas de inoculantes, como a forma líquida ou à base de argila 2:1 (vermiculita) são utilizados (TITTABUTR et al., 2007; MAURICE et al., 2001).

Segundo FERNANDES JÚNIOR (2006), a produção de inoculantes utilizando veículos biodegradáveis, atóxicos, hidrossolúveis, obtidos de fontes renováveis e de baixo custo, associada com estirpes de rizóbio 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.

Além de conter bactérias fixadoras de nitrogênio, os biofertilizantes podem ser compostos contendo diversos tipos de microrganismos com habilidade de converter elementos da forma indisponível para a disponível para as plantas através de processos biológicos (VESSEY, 2003). Assim, os biofertilizantes têm sido uma alternativa em relação aos fertilizantes químicos em sistemas de produção sustentável. Em experimento em casa de vegetação, o uso de biofertilizante contendo uma mistura de fungos micorrízicos, bactérias fixadoras e solubilizadores de fosfato e potássio resultaram no aumento na produção de grãos e massa seca de milho e, além disso, melhorou as propriedades do solo como o conteúdo de matéria orgânica e nitrogênio total (WU et al., 2005).

A seleção de estirpes de bactérias eficientes e tolerantes a estresse é um importante fator para o sucesso da inoculação (REIS, 2006). As bactérias diazotróficas estão presentes em diferentes ambientes agrícolas e sua sobrevivência é afetada por fatores como a seca, o pH e a salinidade (ZAHRAN, 1999). Em alguns casos, os inoculantes são aplicados às sementes e após estas estarem secas, são

armazenadas, sendo então as células submetidas a condições adversas como temperatura, salinidade, substâncias produzidas pela semente, dissecação (DEAKER et al., 2004), sendo necessária a busca por meios de composição que proporcionem a sobrevivência de um maior número de bactérias.

Muitos fatores que afetam a sobrevivência do rizóbio durante a dissecação têm sido identificados. Estes incluem diferenças nos métodos de secagem, como a secagem forçada usando vácuo ou ao ar (VRIEZEN et al., 2006). O tipo de material utilizado no inoculante pode afetar a sobrevivência da bactéria, desde compostos naturais como turfa, óleo vegetal e carvão até polímeros sintéticos (géis de biopolímeros) (KACI et al., 2005).

Em muitos casos, novas bactérias que apresentam elevada fixação de N “in vitro” podem, no entanto, apresentar algumas dificuldades quando aplicadas no campo. Um dos maiores problemas para o uso de estirpes superiores de rizóbio é a rápida morte das bactérias quando aplicadas nas sementes ou no solo. Poucos trabalhos têm analisado a sobrevivência de bactérias em sementes, sendo que a maioria realiza os testes em membranas, areia e esferas de vidro (STREETER, 2007). Em inoculação de *Bradyrhizobium* sp. em sementes de Lupim, utilizando inoculante a base de turfa, foi verificada a morte de 95 % das células em um período de quatro horas entre a inoculação e o plantio, e 99% em 22 horas após a inoculação (ROUGHLEY et al., 1993). Isto indica a necessidade de desenvolver inoculantes que proporcionem a maior sobrevivência de bactérias quando aplicadas em sementes ou mesmo no solo, o que poderia resultar em uma colonização e nodulação mais rápida.

Em estudos comparando substratos para testes de desidratação *Rhizobium meliloti*, foi verificado que a sobrevivência de bactérias é maior sobre filtros de nitrocelulose e areia quando comparado com sementes e sob umidade relativa do ar mais elevadas e temperatura de 37°C (VRIEZEN et al., 2006). Neste mesmo trabalho, foi observado que a sobrevivência de células é maior quando as células estão em meio extrato de levedura–manitol-agar (YMB) e menor em água. A sobrevivência também aumentou quando se utilizou culturas na fase estacionária e maiores concentrações de cloretos e sulfatos. Os autores atribuem o aumento na sobrevivência de células à síntese de trealose e betaína em resposta ao estresse osmótico. De fato, a

trealose protege contra dissecação e a betaína contra a toxicidade de NaCl, em inóculo seco após aplicado em sementes, por até quatro meses (KOSANKE et al., 1992). Alguns pesquisadores têm adicionado trealose no meio de cultura para aumentar o teor deste na célula, no entanto, alguns trabalhos mostraram que o acúmulo desta substância pode ser induzido em várias bactérias diferentes quando cultivadas em meio contendo NaCl (ZAVALLIA et al., 2003; WOLF et al. 2003; STREETER, 2007).

O acúmulo de trealose é crítico para a sobrevivência das células bacterianas sob processo de secagem. A trealose não pode ser utilizada por *Bradyrhizobium japonicum* como fonte de carbono, dessa forma a concentração da substância no citoplasma das células bacterianas pode ser aumentada pelo fornecimento deste dissacarídeo durante o período de cultivo (STREETER, 2003). Uma das formas de adicionar trealose ao meio de cultura é pela adição de extrato de levedura, pois contém em torno de 4% de trealose. A adição de 1 g l<sup>-1</sup> de extrato de levedura aumentou de 50 a 80 vezes a sobrevivência de cinco estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja, utilizando inóculo líquido, apesar de ter pouco efeito sobre o aumento no número de unidades formadoras de colônia (STREETER, 2007). Neste trabalho foi verificada uma grande correlação entre concentração de trealose na célula e sobrevivência nas sementes, indicando ser uma substância importante. No trabalho de STREETER (2007), quando os melhores resultados de trealose, NaCl e umidade relativa foram combinados, foi alcançado uma sobrevivência de células 100 vezes superior que no controle.

Os aditivos usados nas formulações inoculantes líquidos devem ter a função de proteger as células de rizóbio sobre a semente em condições de elevadas temperaturas. Durante a secagem, alguns tipos de inoculantes têm sido utilizados na produção de inoculantes devido a sua capacidade de limitar a transferência de calor, boa solubilidade em água e não sofrer grandes alterações físicas sob condições adversas (TEMPRANO et al., 2002; TITTABUTR et al., 2007).

Durante o umedecimento as sementes liberam compostos para o meio, alguns destes compostos, como compostos fenólicos, podem inibir o crescimento ou até matar as células bacterianas, dessa forma, o uso de substâncias que neutralizam estes compostos pode ser vantajoso (DEAKER et al., 2004). A adição de diferentes polímeros (polivinil

pirrolidona (PVP), polivinil álcool (PVA), goma arábica, polietilenoglicol (PEG), amido de mandioca e alginato de sódio mostraram que o PEG, PVA e alginato afetaram o desenvolvimento das bactérias, causando redução da densidade de células. A avaliação destes aditivos em experimentos de campo mostraram que o amido de mandioca proporcionou uma maior quantidade de nódulos e acúmulo de matéria seca em plantas de soja, enquanto os outros aditivos não diferiram do inoculante a base de turfa. No entanto não houve diferenças na produtividade (TITTABUTR et al., 2007).

Uma outra forma para aumentar a eficiência da inoculação é melhorar o crescimento da população microbiana introduzida utilizando suplementação de nutrientes. A suplementação estimula o crescimento do inóculo bacteriano, mas uma grande quantidade de carbono é necessária, além disso, a competição por nutrientes no solo é intensa e a microflora do solo pode usar uma grande quantidade do substrato introduzido. Dessa forma, o uso de inoculantes sólido (peletizado) pode servir como uma barreira contra a alta atividade metabólica da microflora nativa (ANANDHAM et al., 2007). Além disso, o uso de inoculante sólido reduz o risco de redução do número de bactérias causado por equipamento durante o plantio, evita danos as sementes frágeis e evita os efeitos de pesticidas e fungicidas aplicados às sementes (STEPHENS & RASK, 2000; DEAKER et al., 2004). Em inoculante granular para *Burkholderia* sp., composto de argila e farelo de arroz, a suplementação com 1% de glicose e 10 % de fosfato de rocha resultou em aumento do número de células viáveis após 90 dias de armazenamento tanto a 4 como a 25 °C e considerável fonte de fósforo para as plantas (ANANDHAM et al., 2007), no entanto, não foi verificado o comportamento similar em experimento de campo.

FOUILLEUX et al. (1996) utilizaram microgrânulos minerais suplementados com glicose, glutamato, fosfato e extrato de levedura, inoculado com inóculo de *Bradyrhizobium japonicum* a base de turfa ou líquido. Neste trabalho foi observada uma maior sobrevivência de *B. japonicum* em solo sob secagem quando os microgrânulos foram suplementados e, um aumento no crescimento e recuperação de bactérias em teste de incubação feito em solo não esterilizado. Em experimento de casa de vegetação com soja, a suplementação dos microgrânulos proporcionou um significativo aumento na nodulação sob condições de estresse hídrico e em condições de campo foi

observado aumento significativo na nodulação inicial, produção e no teor de nitrogênio nos grãos.

Substratos de baixo custo também podem ser utilizados na produção de inoculantes. PANDEY & MAHESHWARI (2007) testaram substratos sólidos e resíduos do processamento de produtos agrícolas, incluindo bagaço de cana, serragem, resíduo cacau, casca de arroz, farelo de trigo, carvão e fosfato de rocha para produção de inoculante para *Burkholderia* sp. estirpe MSSP. O farelo de trigo mostrou-se eficiente enquanto fosfato de rocha, palha de arroz e resíduo de cacau mostraram-se mediantemente eficientes. O uso do inoculante a base de farelo de trigo contendo *Burkholderia* sp juntamente com *Sinorhizobium meliloti* estirpe PP3, *Rhizobium leguminosarum* estirpe Pcc e *Bacillus* sp resultou no aumento de biomassa e no número de nódulos e vagens em guandu sob condições de campo comparado ao controle.

FERNANDES JUNIOR (2006), testando inoculantes a base de combinações de carboximentilcelulose e amido com suplementação de ZnO e MgO verificou que o inoculante suplementado com MgO apresentou uma sobrevivência de células igual ao inoculante a base de turfa em condições de laboratório e promoveu um desenvolvimento de plantas de caupi igual ao inoculante a base de turfa. FERNANDES JUNIOR (2006) descreve ser possível desenvolver inoculantes polimérico para inoculação de células rizobianas, com desempenho igual aos inoculantes tradicionais a base de turfa.

## **Considerações finais**

---

Em resumo, a composição dos inoculantes e a forma de produção podem afetar a eficiência destes em campo, o que pode, em parte, ser responsável pela inconsistência de dados observados quando se utiliza esta tecnologia. No entanto, a eficiência dos inoculantes pode ser aumentada através de alternativas simples como a suplementação. Além disso, problemas futuros de custo e disponibilidade de turfa podem ser contornados com o uso de outros substratos, podendo chegar até a resultados superiores, assim, mais trabalhos devem ser realizados, para se esclarecer e encontrar formas de contornar os problemas que levam a baixa eficiência dos inoculantes.

## Referências bibliográficas

---

ANANDHAM, R.; CHOI, K. H.; GANDHI, I. P.; YIM, W. J.; PARK S. J.; KIM, K. A.; MADHAIYAN M.; SA, T. M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 1121–1129, aug. 2007.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P. J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4-5, p. 683–697, apr./may 1995.

BRONSON, K. F.; NEUE, H. U.; SINGH, U.; ABAO, E. B. Automated chamber measurements of methane and nitrous oxide flux in a flooded rice soil. 1. Residue, nitrogen, and water management. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 3, p. 981-987, may/jun. 1997.

CATROUX, G. Inoculant quality standards and controls in France. In: THOMPSON, J. A. (Ed.). **Expert consultation on legume inoculant production and quality control**. Rome: FAO, 1991. p. 113–120.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology - a review. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1275-1288, aug. 2004.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. **Composições poliméricas a base de carboximetilcelulose e amido como veículo de inoculação de rizóbio em leguminosas**. 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

FOUILLEUX, G.; REVELLIN, C.; HARTMANN, A.; CATROUX, G. Increase of *Bradyrhizobium japonicum* numbers in soils and enhanced nodulation of soybean (*Glycine max* (L) Merr.) using granular inoculants amended with nutrients. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 173–183, jul. 1996.



KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 156, n. 4, p. 522–531, may 2005.

KOSANKE, J. W.; OSBORN, R. M.; SHUPPE, G. I.; SMITH, R. S. Slow dehydration improves the recovery of dried bacterial populations. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 520–525, jun. 1992.

MAURICE, S.; BEAUCLAIR, P.; GIRAUD, J. J.; SOMMER, G.; HARTMANN, A.; CATROUX, G. Survival and change in physiological state of *Bradyrhizobium japonicum* in soybean (*Glycine max* L. Merrill) liquid inoculants after long-term storage. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 635–643, 2001.

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Bioformulation of *Burkholderia* sp. MSSP with a multispecies consortium for growth promotion of *Cajanus cajan*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, n. 2, p. 213–222, feb. 2007.

REIS, M. R. Inoculantes contendo bactérias fixadoras de nitrogênio para aplicação em gramíneas. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 27., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 11., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6., 2006, Bonito, MS. **A busca das raízes. anais...** Bonito: SBM; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. 1 CD ROM. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 82).

ROUGHLEY, R. J.; GEMELL, L. G.; THOMPSON, J. A.; BROCKWELL, J. The number of *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) applied to seed and its effect on rhizosphere colonization, nodulation and yield of lupin. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1453–1458, oct. 1993.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 485–492, jun. 1992.

STEPHENS, J. H. G.; RASK, H. M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2-3, p. 249–258, mar. 2000.

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxon, v. 95, n. 3, p. 484–491, 2003.

STREETER, J. G. Factors affecting the survival of *Bradyrhizobium* applied in liquid cultures to soya bean [*Glycine max* (L.) Merr.] seeds. **Journal of Applied Microbiology**, Oxon, v. 103, n. 4, p. 1282-1290, oct. 2007.

TEMPRANO, F. J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO, M.; DAZA, A.; SANTAMARIA, C.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N. Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds. **International Microbiology**, v. 5, p. 81-86, 2002.

TITTABUTR, P.; PAYAKAPONGA, W.; TEAUMROONGA, N.; SINGLETONB, P. W.; BOONKERDA, N. Growth, survival and field performance of bradyrhizobial liquid inoculant formulations with polymeric additives. **Science Asia**. v. 33, p. 69-77, 2007.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant & Soil**, Dordrecht, v. 255, n. 2, p. 571–586, aug. 2003.

VRIEZEN, J. A. C.; BRUIJN, F. J.; NUSSLEIN, K. Desiccation responses and survival of *Sinorhizobium meliloti* USDA 1021 in relation to growth phase, temperature, chloride and sulfate availability. **Letters in Applied Microbiology**, Oxon, v. 42, n. 2, p.172–178, feb. 2006.

WOLF, A.; KRAMER, R.; MORBACH, S. Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 and their significance in response to osmotic stress. **Molecular Microbiology**, Oxon, v. 49, n. 4, p.1119–1134, aug. 2003.

WU, S. C.; CAO, Z. H.; LI, Z. G.; CHEUNG, K. C.; WONG, M. H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 155–166, mar. 2005.

ZAHARAN, H. H. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 63, n. 4, p. 968-975, 1999.

ZAVAGLIA, A. G.; TYMCZYSZYN, E.; DE ANTONI, G.; DISALVO, E. A. Action of trehalose on the preservation of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by heat and osmotic dehydration. **Journal of Applied Microbiology**, Oxon, v. 95, n. 6, p. 1315–1320, 2003.











---

*Agrobiologia*

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

