

# NODULAÇÃO E RENDIMENTO DE SOJA CO-INFECTADA COM *BACILLUS SUBTILIS* E *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* / *BRADYRHIZOBIUM ELKANII*<sup>1</sup>

FÁBIO FERNANDO DE ARAÚJO<sup>2</sup> e MARIANGELA HUNGRIA<sup>3</sup>

RESUMO - O *Bacillus subtilis* pode favorecer o desempenho simbiótico do rizóbio, pelos efeitos na inibição de fitopatógenos ou pela exsudação de fitormônios. Com o objetivo de verificar a viabilidade da co-infecção de sementes de soja com *Bradyrhizobium* e *Bacillus* foram conduzidos três experimentos, no Paraná, em solos com população estabelecida de *Bradyrhizobium*, em que as estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 e SEMIA 5080 e suas variantes tolerantes aos metabólitos de *Bacillus* foram co-infectadas com duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 e PRBS-1), ou seus metabólitos. Na safra 1993/94, em Londrina, o tratamento de co-inoculação de *Bradyrhizobium* com os metabólitos formulados de *Bacillus* incrementou, significativamente, em relação ao não-inoculado, o número de nódulos (59%, estágio V3), a ocupação dos nódulos pelas estirpes de *Bradyrhizobium* (76%, R2) e o rendimento de grãos (24%); em Ponta Grossa, esses incrementos foram de 60%, 145% e 22%, respectivamente. Nessa safra, em Londrina, a co-inoculação das variantes tolerantes com os metabólitos de *Bacillus* também aumentou o rendimento (26%) e N total (17%) dos grãos de soja e incrementos significativos foram constatados, na ocupação dos nódulos, pela co-inoculação das variantes tolerantes com as células de *Bacillus* (78%). Os resultados obtidos indicam a viabilidade da co-inoculação, em sementes de soja, de metabólitos brutos ou formulados ou, ainda, de células de *Bacillus subtilis*, para incrementar a contribuição do processo de fixação biológica do nitrogênio.

Termos para indexação: controle biológico, fixação biológica do nitrogênio, *Glycine max*, inoculação, inoculante.

## SOYBEAN NODULATION AND YIELD WHEN CO-INOCULATED WITH *BACILLUS SUBTILIS* AND *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* / *BRADYRHIZOBIUM ELKANII*

ABSTRACT - *Bacillus subtilis* can improve rhizobial symbiotic performance by inhibiting plant pathogens or by the exudation of hormones. To verify the viability of co-inoculation of soybean seeds with *Bradyrhizobium* and *Bacillus*, three experiments were performed, in the State of Paraná, Brazil, in soils with established population of *Bradyrhizobium*. The *Bradyrhizobium* strains SEMIA 5019 and SEMIA 5080, and their natural variant strains tolerant to the metabolites of *Bacillus* were co-inoculated with two strains of *Bacillus* (AP-3 and PRBS-1), or their metabolites. In 1993/94, in Londrina, the co-inoculation of *Bradyrhizobium* with formulated metabolites increased significantly, in relation to non-inoculated control, nodule number (59%, stage V3), nodule occupancy by *Bradyrhizobium* strains carried on the inoculant (76%, R2) and soybean yield (24%); in Ponta Grossa, these increases were of 60%, 145% and 22%, respectively. Also in Londrina, the co-inoculation of the variant strains with crude metabolites of *Bacillus* has also increased yield (26%) and total N in grains (17%) and increases were verified by the co-inoculation of the *Bradyrhizobium* variant strains with *Bacillus* cells (78%). Consequently, the results have shown the viability of co-inoculating soybean seeds with crude or formulated metabolites, or with cells of *Bacillus subtilis*, to increase the contribution of the biological nitrogen fixation process.

Index terms: biological control, biological nitrogen fixation, *Glycine max*, inoculation, inoculant.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 6 de outubro de 1998.

Financiado pela FINEP/CNPq/MICT, PRONEX, 41.96.0884.00.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo), Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. Bolsista da Capes.

<sup>3</sup> Eng<sup>a</sup> Agr<sup>a</sup>, Ph.D., Embrapa-CNPSo. Bolsista do CNPq.

E-mail: hungria@cnpso.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

Na cultura da soja, como na maioria das espécies cultivadas, o fornecimento de fertilizantes nitrogenados apresenta baixa eficiência de utilização por parte da planta, devido às perdas elevadas que ocorrem, particularmente por lixiviação e

volatilização. O nitrogênio (N), necessário para o desenvolvimento da soja, que exporta cerca de 150 kg ha<sup>-1</sup> de N nos grãos, poderá ser fornecido eficientemente através da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (Hungria et al., 1994). Taxonomicamente, as bactérias que nodulam a soja foram classificadas, inicialmente, na espécie *Rhizobium japonicum* (Fred et al., 1932), posteriormente reclassificada como *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) e, recentemente, subdividida em *B. japonicum* e *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992). Contudo, existe grande variabilidade, entre as estirpes que nodulam a soja, quanto à eficiência do processo simbiótico e à capacidade competitiva frente às bactérias estabelecidas no solo.

Triplett (1990) citou que a introdução de estirpes de rizóbio, superiores na fixação de N<sub>2</sub>, geralmente não é bem-sucedida, dada a sua inabilidade em ocupar os nódulos em solos com população elevada de estirpes nativas (indígenas) ou naturalizadas (introduzidas e estabelecidas). A competitividade de uma estirpe de rizóbio é influenciada por diversos fatores, relacionados com os genótipos das bactérias, da planta hospedeira e fatores ambientais (Triplett, 1990; Bottomley, 1992; Mytton & Skøt, 1993; Hungria et al., 1994; Streeter, 1994).

A ocupação dos nódulos por estirpes de rizóbio introduzidas no solo, via inoculantes, tornou-se um desafio para os rizobiologistas, que vêm desenvolvendo diversos trabalhos, em diferentes áreas da pesquisa, para solucioná-lo. Além das pesquisas conduzidas estritamente com o rizóbio para aumentar sua competitividade intrínseca, outros estudos avaliam o efeito da interação entre o rizóbio e outros microrganismos. Nesse contexto, Li & Alexander (1988) conseguiram incrementar a colonização e a nodulação de soja, através da co-inoculação de *B. japonicum* com bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de antibióticos. Inicialmente, foram obtidas variantes de *B. japonicum* eficientes e tolerantes aos antibióticos de *Bacillus* spp. A seguir, a variante resistente a antibióticos ocupou mais nódulos quando co-infectada com *Bacillus* em um solo com população de *Bradyrhizobium* estabelecida (Li & Alexander, 1988).

Outros relatos demonstram efeitos positivos na nodulação pela co-inoculação de rizóbio com outras espécies de bactérias. Essa contribuição foi relacionada com a produção de fitormônios, pectinase ou sinais moleculares, em *Bacillus cereus* (Halverson & Handelsman, 1991), *Azospirillum* spp. (Singh & Rao, 1979; Plazinski & Rolfe, 1985; Andreeva et al., 1991), *Agrobacterium* (Caetano-Anollés & Bauer, 1988) e outras espécies de microrganismos (Omar & Abd-Alla, 1994).

Diante desses resultados, em diversos laboratórios tem-se procurado isolar e identificar microrganismos, ou componentes presentes em seus metabólitos, que possam influenciar a eficiência de fixação do N<sub>2</sub> e a capacidade competitiva do rizóbio. No Brasil, porém, estudos sobre a co-inoculação de bradirrizóbio e bacilos na cultura da soja ainda não foram conduzidos.

Este trabalho buscou, portanto, estudar a viabilidade da co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum/Bradyrhizobium elkanii* com *Bacillus subtilis* em soja, como uma alternativa viável para incrementar a competitividade das estirpes de rizóbio e a eficiência da simbiose com a soja.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bactérias e plantas

As estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas foram *B. elkanii* SEMIA 5019 (=29w, =BR 29) e *B. japonicum* SEMIA 5080 (=CPAC 7). As estirpes de *Bacillus subtilis* utilizadas foram a AP-3, de comprovado efeito antagônico a fungos fitopatogênicos (Bettiol & Kimati, 1990) (cedida pelo Dr. Wagner Bettiol, Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental (CNPMA), Jaguariúna, SP) e a estirpe PRBS-1, isolada de solo sob cultivo com soja, no campo experimental da Embrapa-Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSo) (Araújo et al., 1995).

Foram utilizadas as cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] BR-16 e BR-37 e, como cultura de inverno, a cultivar BR-23 de trigo (*Triticum aestivum* L.). As sementes foram fornecidas pelo banco de germoplasma da Embrapa-CNPSo.

### Obtenção de variantes de *Bradyrhizobium* tolerantes aos metabólitos de *Bacillus*

As estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 e SEMIA 5080 foram submetidas a testes de tolerância aos metabólitos de *B. subtilis* AP-3, seguindo metodologia de Li & Alexander (1988). O *B. subtilis* foi multiplicado por sete dias, a 28°C, em meio líquido batata-dextrose (BD, contendo 250 g L<sup>-1</sup> de batata, 10 g L<sup>-1</sup> de dextrose, pH 6,5), sob agitação de 100 rpm. As células foram separadas por centrifugação (10.000 g, 10 minutos) e o sobrenadante foi adicionado ao meio com extrato de levedura-manitol YMC (Somasegaran & Hoben, 1994), acondicionado em frascos erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL da mistura, nas proporções de 1/3, 1/1 e de 9/1 (sobrenadante de *Bacillus*/meio YM). As estirpes de *Bradyrhizobium* foram inoculadas, primeiramente, nos frascos com a proporção 1/3 (sobrenadante/meio de cultura), sendo as culturas incubadas a 28°C, sob agitação de 100 rpm. Quando o crescimento foi evidente, as culturas foram plaqueadas em meio extrato de YMA (com ágar) na proporção 1/3 (sobrenadante/meio). As colônias formadas foram isoladas e inoculadas em meio líquido YM contendo a proporção 1/1 dos dois componentes e, a seguir, o procedimento foi repetido para a proporção 9/1. As colônias formadas no meio sólido com a proporção 9/1 foram isoladas e caracterizadas como tolerantes aos metabólitos do *B. subtilis* (AP-3), sendo mantidas em tubos com meio sólido (YM), contendo sobrenadante na proporção 9/1. Os estudos, a partir deste teste, foram conduzidos, também, com as variantes tolerantes, as quais foram denominadas de *B. japonicum* SEMIA 5080-T e *B. elkanii* SEMIA 5019-T.

### Ensaios, a campo, com co-inoculação de *Bacillus* e *Bradyrhizobium*

Foram conduzidos três experimentos de campo. Na safra 93/94, foram implantados dois experimentos, um no campo experimental da Embrapa-CNPSO, em Londrina, distrito da Warta, em um Latossolo Roxo distrófico e outro na Embrapa-Serviço de Produção de Sementes Básicas, em Ponta Grossa, em um Latossolo Vermelho-Escuro álico. Na safra 94/95, o experimento foi repetido na mesma

área de Londrina, com os mesmos tratamentos reinfetados nas mesmas parcelas. As propriedades químicas dos solos, na camada de 0-20 cm, podem ser vistas na Tabela 1. Na área do experimento de Ponta Grossa foram incorporadas, ao solo, 5 t ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico, um ano antes da semeadura. A parcela experimental, nos três experimentos, teve dimensões de 3,0 m x 2,0 m, com linhas de soja distanciadas por 0,5 m. As parcelas foram separadas, uma das outras, por caminhos de 2,0 m e por pequenos terraços, para evitar contaminação entre os tratamentos. Na safra 93/94 foi realizada, em Londrina, uma adubação cinco dias antes da semeadura, a lanço, com incorporação de 250 kg de superfosfato simples e 35 kg de cloreto de potássio. Em Ponta Grossa, foram adicionados 500 kg de superfosfato simples, 35 kg de cloreto de potássio e 30 kg de micronutrientes (FTE-BR-12, óxido silicatado contendo, em %: Zn, 9,0; B, 1,80; Cu, 0,8; Fe, 3,0; Mn, 2,0; Mo, 0,10). No experimento realizado em Londrina, na mesma área, no ano seguinte, foi realizada a adubação com 300 kg ha<sup>-1</sup> de N-P-K (0-20-20).

A população de rizóbio do solo foi determinada pela técnica do número mais provável em plantas (NMP), utilizando-se a cultivar de soja BR-16, conforme descrito em Andrade & Hamakawa (1994). Em Londrina, o solo apresentou uma população estabelecida de 3,6.10<sup>4</sup> e 5,0.10<sup>4</sup> células g<sup>-1</sup> de solo, no primeiro e no segundo ano, respectivamente. Em Ponta Grossa, a população foi de 6,0.10<sup>5</sup> células g<sup>-1</sup> de solo. Na safra 93/94, a população de *Bacillus* foi estimada pela contagem das colônias formadas em placas, após choque térmico de 70°C, por 10 minutos (Buchanan & Gibbons, 1975), em 3,0.10<sup>4</sup> e 3,5.10<sup>5</sup> células g<sup>-1</sup> de solo, respectivamente em Londrina e Ponta Grossa. Na safra seguinte, em Londrina, a população de *Bacillus* foi, em média, de 1,5.10<sup>4</sup> células g<sup>-1</sup> de solo.

Os experimentos foram conduzidos com as cultivares de soja BR-16 (safra 93/94) e BR-37 (safra 94/95), em Londrina e BR-37, na safra 93/94, em Ponta Grossa. Foram utilizadas, aproximadamente, 30 sementes m<sup>-1</sup> e os seguintes tratamentos: 1- inoculação de estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 5019 + SEMIA 5080. Estirpes crescidas em YM e padronizadas a 5,0.10<sup>7</sup> células semente<sup>-1</sup>; 2- inoculação das variantes de *Bradyrhizobium* tolerantes aos metabólitos

TABELA 1. Propriedades químicas dos solos.

Local	pH em CaCl <sub>2</sub>	Al	K	Ca	Mg	H+Al	C	P
		----- (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> ) -----			----- (g kg <sup>-1</sup> ) -----		(g kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )
Londrina (93/94)	4,60	0,05	0,47	2,14	1,71	5,71	1,77	9,6
Ponta Grossa	4,23	0,60	0,13	0,59	1,95	10,21	2,63	1,4
Londrina (94/95)	4,89	0,07	0,56	4,68	1,69	3,08	1,12	9,4

de *Bacillus* (5019-T e 5080-T), também na concentração de  $5,0 \cdot 10^7$  células semente<sup>-1</sup>; 3- co-inoculação de *Bradyrhizobium* (5019 + 5080) e células de *Bacillus* spp. (AP-3 + PRBS-1). As estirpes de *Bacillus* foram crescidas em meio BD por sete dias, a 28°C e agitação a 100 rpm. As culturas foram, então, centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos, obtendo-se a fração de metabólitos brutos e células. As células foram lavadas por duas vezes com solução salina (NaCl, 0,85%) e padronizadas em  $1 \cdot 10^6$  células semente<sup>-1</sup>; 4- co-inoculação das estirpes tolerantes de *Bradyrhizobium* (5019-T e 5080-T) e das células de *Bacillus*, conforme descrito no tratamento 3; 5- co-inoculação de *Bradyrhizobium* (5019 + 5080) com os metabólitos brutos de *Bacillus*. Os metabólitos brutos foram obtidos conforme descrito no tratamento 3 e utilizados na concentração de 40 mL 500 g<sup>-1</sup> de sementes; 6- co-inoculação das variantes tolerantes de *Bradyrhizobium* (5019-T + 5080-T) com os metabólitos brutos de *Bacillus*, conforme descrito no tratamento 5; 7- metabólitos formulados de *B. subtilis* (AP-3) na forma de pó-molhável (formulação técnica desenvolvida pela Embrapa-CNPMA). Para a obtenção do formulado, os metabólitos brutos, obtidos conforme descrito no tratamento 3, foram solubilizados em metanol e, a seguir, centrifugados a 20.000 g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado contendo os antibióticos foi utilizado como ingrediente ativo na formulação do pó molhável. A formulação, contendo 5% dos metabólitos, foi utilizada na concentração de 0,15 g do princípio ativo 500 g<sup>-1</sup> de sementes; 8- extrato de antibióticos de *B. subtilis* (AP-3), utilizado na concentração de 0,1 g de extrato 500 g<sup>-1</sup> de sementes. O precipitado contendo antibióticos foi obtido conforme descrito no tratamento 7 e solubilizado em metanol e centrifugado a 20.000 g por 10 minutos. A seguir, coletou-se o sobrenadante contendo os antibióticos brutos solubilizados, sendo determinada a concentração aproximada dos mesmos através da relação peso:volume, em comparação com o mesmo volume de metanol puro. Desse modo, encontrou-se uma concentração de 0,5 g de antibióticos 100 mL<sup>-1</sup> de metanol. Essa metodologia fundamentou-se na descrita por McKeen et al. (1986); 9- tratamento não-inoculado.

A primeira coleta foi realizada no estádio vegetativo V3 de desenvolvimento e dez plantas de cada parcela foram coletadas, determinando-se o número e a massa de nódulos secos. Foi avaliada, também, a população de *Bacillus* spp. na rizosfera de soja. Para isso, coletaram-se dez plantas por parcela, cujas raízes foram separadas e, posteriormente, agitadas levemente para descartar o solo não aderido. No laboratório, as raízes foram agitadas vigorosamente durante um minuto dentro de um saco de

plástico e o solo remanescente no fundo do saco foi homogeneizado, por agitação manual, extraído-se, a seguir, 1 g desse solo que estava aderido às raízes. A contagem de *Bacillus* spp. no material foi realizada pelo método de diluição em placa, precedido de choque térmico, conforme já relatado. A segunda coleta foi realizada no estádio R2, avaliando-se o número e a massa de nódulos secos de dez plantas. Além disso, 40 nódulos por parcela foram caracterizados sorologicamente, pela técnica de aglutinação direta em placas de poliestireno em “U” (Somasegaran & Hoben, 1994) contra os anti-soros das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 5080. A parte aérea foi separada da raiz, e ambas, colocadas para secagem a 65°C, até atingirem massa constante. A parte aérea foi moída avaliando-se, então, o teor de N total pelo método de Feije & Anger (1972). Na coleta final, foi determinado o rendimento dos grãos, após correção para 13% de umidade e o teor de N total dos grãos. Após a cultura da soja, nos três ensaios, foi semeado trigo nas mesmas parcelas, sem receber nenhuma adubação ou correção de solo. Na coleta final, foi determinado o rendimento de grãos de trigo, corrigido para 13% de umidade. Os experimentos foram conduzidos em blocos ao acaso, com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em Londrina, na safra 93/94, foi constatado, na coleta realizada no estádio V3, que a co-inoculação de *Bradyrhizobium* com metabólitos formulados de *Bacillus* aumentou significativamente o número de nódulos, em 59%, em relação ao tratamento não-inoculado, e em 27% (não-significativo estatisticamente) em relação à inoculação exclusivamente de *Bradyrhizobium*, resultando, ainda, em maior massa nodular (Tabela 2). Provavelmente pela população naturalizada elevada de rizóbio no solo, o número e a massa de nódulos não tenham sido, nos demais tratamentos inoculados com *Bradyrhizobium*, significativamente superiores ao controle sem inoculação. Na coleta realizada no estádio R2, não foram constatadas diferenças estatísticas, entre os diversos tratamentos, nos parâmetros de nodulação. O tratamento co-inoculado com metabólitos e estirpes de *Bradyrhizobium* tolerantes, porém, apresentou boa nodulação, resultando em maior acúmulo de N total na parte aérea, superior em 116% em relação à testemunha não-inoculada e em 120% em relação à inoculação exclusivamente com as estirpes tolerantes (Tabela 2).

**TABELA 2.** Nodulação (estádios V3 e R2), massa e N total acumulado na parte aérea (R2) de soja, cultivar BR-16, infectada com duas estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019 + SEMIA 5080) ou suas variantes naturais tolerantes aos metabólitos de *Bacillus* e co-infectada com duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 + PRBS-1), ou seus metabólitos. Experimento conduzido em Londrina, na safra 93/94, em um Latossolo Roxo distrófico com população estabelecida de  $3,6.10^4$  células de *Bradyrhizobium* e  $3,0.10^4$  células de *Bacillus* por g de solo. Médias de seis repetições<sup>1</sup>.

Tratamento	Nodulação (V3)		Nodulação (R2)		Parte aérea (R2)	
	(nº pl <sup>-1</sup> )	(mg pl <sup>-1</sup> )	(nº pl <sup>-1</sup> )	(mg pl <sup>-1</sup> )	Massa (g pl <sup>-1</sup> )	N total (mg pl <sup>-1</sup> )
<i>Bradyrhizobium</i>	14,8ab	40,9ab	30,8a	129,6a	7,03bc	248,4bc
<i>Bradyrhizobium</i> (T) <sup>2</sup>	14,3ab	41,0ab	34,3a	134,3a	6,21bc	163,9c
<i>Brady.</i> + <i>Bacillus</i> <sup>3</sup>	14,1ab	38,6ab	33,4a	140,5a	7,28bc	172,3c
<i>Brady.</i> (T)+ <i>Bacillus</i>	14,6ab	35,6b	35,0a	147,5a	7,09bc	170,2c
<i>Brady.</i> +metabólitos <sup>4</sup>	14,7ab	37,9ab	30,2a	138,9a	7,80b	265,6b
<i>Brady.</i> (T)+metabólitos	17,8ab	49,2ab	41,7a	159,5a	10,60a	360,7a
<i>Brady.</i> +formulação <sup>5</sup>	18,8a	56,6a	38,9a	144,3a	6,57bc	241,1bc
<i>Brady.</i> +ext. alcoólico <sup>6</sup>	15,6ab	42,6ab	40,1a	164,7a	7,46bc	229,9bc
Não-inoculado	11,8b	40,1ab	29,8a	132,8a	4,90c	166,6c
CV (%)	20,3	24,8	21,8	22,7	28,2	29,1

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>2</sup> *Bradyrhizobium* tolerante (T) aos metabólitos de *Bacillus*.

<sup>3</sup> *Bradyrhizobium* adicionado na concentração de  $5,0.10^7$  células semente<sup>-1</sup> e *Bacillus* na concentração de  $1,0.10^6$  células semente<sup>-1</sup>.

<sup>4</sup> Metabólitos adicionados na concentração de 40 mL de metabólitos 500 g<sup>-1</sup> de sementes.

<sup>5</sup> Metabólitos do *Bacillus* extraídos segundo McKeen et al. (1986), formulados como pó-molhável (5% dos metabólitos), misturados às sementes na proporção de 0,15 g do princípio ativo para 500 g de sementes.

<sup>6</sup> Extrato alcoólico contendo 0,5% de metabólitos purificados do *Bacillus*, obtidos segundo McKeen et al. (1986), misturado às sementes na proporção de 0,1 g do extrato para 500 g de sementes.

Em Ponta Grossa, na safra 93/94, observou-se, de um modo geral, tanto na primeira (V3) como na segunda (R2) coleta, um aumento na nodulação em todos os tratamentos infectados com *Bradyrhizobium* (Tabela 3). Esse estímulo no número de nódulos foi estatisticamente superior quando o bradirrízobio foi co-inoculado com a formulação (60% em V3 e 72% em R2) ou, ainda, com bradirrízobio tolerante, na presença de metabólitos de *Bacillus* (60% em V3), em relação ao controle não-infectado. Houve incremento, mas não estatisticamente significativo, em relação à inoculação somente de *Bradyrhizobium*. Não foram constatadas diferenças entre os tratamentos e a população naturalizada na massa e N total da parte aérea em R2 (Tabela 3).

Na safra 93/94, em Londrina, a co-inoculação de variantes de *Bradyrhizobium* tolerantes com células de *Bacillus*, ou de *Bradyrhizobium* com os formulados, incrementou a ocupação total de nódulos, em relação ao tratamento não-infectado, respectivamente, em 78% e 76%; também foram significativos os

incrementos em relação à inoculação exclusiva de *Bradyrhizobium* (88% e 85%, respectivamente) (Tabela 4). Em Ponta Grossa, todos os tratamentos, exceto a variante tolerante, conseguiram incrementar a ocupação dos nódulos em relação à população naturalizada do solo, chegando a um máximo de 200% (*Bradyrhizobium* (T) + metabólitos). Esse tratamento também superou em 25%, mas não estatisticamente, o infectado exclusivamente com *Bradyrhizobium* (Tabela 4). Em ambos os locais, os incrementos na porcentagem de ocupação dos nódulos estiveram relacionados com a maior participação das duas estirpes inoculadas, SEMIA 5019 e SEMIA 5080.

Em Londrina (93/94), a inoculação de *Bradyrhizobium* na soja incrementou, mas não significativamente, o rendimento em relação à testemunha não-infectada.

No tratamento de co-inoculação de metabólitos de *Bacillus* junto com as estirpes de *Bradyrhizobium* tolerantes (T) ou da co-inoculação com as estirpes parentais e o formulado, os ganhos no rendimento

**TABELA 3.** Nodulação (estádios V3 e R2), massa e N total acumulado na parte aérea (R2) de soja, cultivar BR-37, infectada com duas estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019 + SEMIA 5080) ou suas variantes naturais tolerantes aos metabólitos de *Bacillus* e co-infectada com duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 + PRBS-1), ou seus metabólitos. Experimento conduzido em Ponta Grossa, na safra 93/94, em um Latossolo Vermelho-Escuro álico, com população estabelecida de  $6,0 \cdot 10^5$  células de *Bradyrhizobium* e  $3,5 \cdot 10^5$  células de *Bacillus* por g de solo. Médias de seis repetições<sup>1</sup>.

Tratamento	Nodulação (V3)		Nodulação (R2)		Parte aérea (R2)	
	(n° pl <sup>-1</sup> )	(mg pl <sup>-1</sup> )	(n° pl <sup>-1</sup> )	(mg pl <sup>-1</sup> )	Massa (g pl <sup>-1</sup> )	N total (mg pl <sup>-1</sup> )
<i>Bradyrhizobium</i>	17,2ab	47,4a	26,6ab	169,2a	3,84a	140,5a
<i>Bradyrhizobium</i> (T) <sup>2</sup>	15,9ab	37,6a	22,9ab	124,9ab	3,41a	132,7a
<i>Brady</i> + <i>Bacillus</i> <sup>3</sup>	14,6ab	37,0a	20,9ab	133,8ab	3,26a	107,7a
<i>Brady</i> .(T)+ <i>Bacillus</i>	15,7ab	33,8a	22,4ab	131,9ab	3,22a	110,5a
<i>Brady</i> +.metabólitos <sup>4</sup>	15,4ab	41,4a	22,0ab	133,8ab	3,22a	107,3a
<i>Brady</i> .(T)+metabólitos	19,0a	44,4a	25,6ab	131,4ab	3,56a	126,4a
<i>Brady</i> +.formulação <sup>5</sup>	19,1a	42,1a	28,7a	143,6ab	3,18a	112,1a
<i>Brady</i> +.ext. alcoólico <sup>6</sup>	14,0ab	30,5a	20,6ab	106,5b	2,43a	72,7a
Não-inoculado	11,9b	28,0a	16,7b	118,6ab	3,21a	117,3a
CV (%)	20,6	24,8	23,6	22,7	28,2	29,1

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>2</sup> *Bradyrhizobium* tolerante (T) aos metabólitos de *Bacillus*.

<sup>3</sup> *Bradyrhizobium* adicionado na concentração de  $5,0 \cdot 10^7$  células semente<sup>-1</sup> e *Bacillus* na concentração de  $1,0 \cdot 10^6$  células semente<sup>-1</sup>.

<sup>4</sup> Metabólitos adicionados na concentração de 40 mL de metabólitos 500 g<sup>-1</sup> de sementes.

<sup>5</sup> Metabólitos do *Bacillus* extraídos segundo McKeen et al. (1986), formulados como pó-molhável (5% dos metabólitos), misturados às sementes na proporção de 0,15 g do princípio ativo para 500 g de sementes.

<sup>6</sup> Extrato alcoólico contendo 0,5% de metabólitos purificados do *Bacillus*, obtidos segundo McKeen et al. (1986), misturado às sementes na proporção de 0,1 g do extrato para 500 g de sementes.

**TABELA 4.** Efeito da co-infecção de sementes de soja com *Bradyrhizobium* tolerante ou não aos metabólitos de *Bacillus*, juntamente com a introdução de *Bacillus* ou seus metabólitos, na porcentagem de ocupação dos nódulos de soja (estádio R2) pelos sorogrupos das estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 5080. Ensaios conduzidos na safra 93/94 em Londrina, em um Latossolo Roxo distrófico com população estabelecida de  $3,6 \cdot 10^4$  células de *Bradyrhizobium* e, em Ponta Grossa, em um Latossolo Vermelho-Escuro álico com  $6,0 \cdot 10^5$  células de *Bradyrhizobium* por g de solo. Médias de seis repetições<sup>1</sup>.

Tratamento	Londrina			Ponta Grossa		
	Sorogrupo		Total	Sorogrupo		Total
	5019	5080		5019	5080	
<i>Bradyrhizobium</i>	11,5b	8,5ab	20,0b	31,0a	8,5d	39,5ab
<i>Bradyrhizobium</i> (T) <sup>2</sup>	12,5b	8,0ab	20,5b	14,0cd	9,0cd	23,0c
<i>Brady</i> + <i>Bacillus</i> <sup>3</sup>	20,0ab	7,0ab	27,0ab	34,0a	10,0cd	44,0a
<i>Brady</i> .(T)+ <i>Bacillus</i>	25,5a	12,0a	37,5a	25,0ab	20,0a	45,0a
<i>Brady</i> +.metabólitos <sup>4</sup>	15,0ab	6,0b	21,0b	31,5a	10,5cd	42,0a
<i>Brady</i> .(T)+metabólitos	15,5ab	10,0ab	25,5ab	32,5a	17,0ab	49,5a
<i>Brady</i> +.formulação <sup>5</sup>	26,5a	10,5ab	37,0a	26,0ab	14,5abc	40,5ab
<i>Brady</i> +.ext. alcoólico <sup>6</sup>	18,5ab	8,5ab	27,0ab	19,0bc	12,0bcd	31,0b
Não-inoculado	15,0ab	6,0b	21,0b	8,0d	8,5d	16,5c
CV (%)	22,4	19,6	19,4	12,2	16,0	18,1

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>2</sup> *Bradyrhizobium* tolerante (T) aos metabólitos de *Bacillus*.

<sup>3</sup> *Bradyrhizobium* adicionado na concentração de  $5,0 \cdot 10^7$  células semente<sup>-1</sup> e *Bacillus* na concentração de  $1,0 \cdot 10^6$  células semente<sup>-1</sup>.

<sup>4</sup> Metabólitos adicionados na concentração de 40 mL de metabólitos 500 g<sup>-1</sup> de sementes.

<sup>5</sup> Metabólitos do *Bacillus* extraídos segundo McKeen et al. (1986), formulados como pó-molhável (5% dos metabólitos), misturados às sementes na proporção de 0,15 g do princípio ativo para 500 g de sementes.

<sup>6</sup> Extrato alcoólico contendo 0,5% de metabólitos purificados do *Bacillus*, obtidos segundo McKeen et al. (1986), misturado às sementes na proporção de 0,1 g do extrato para 500 g de sementes.

foram estatisticamente significativos, superando a testemunha não-infectada em 522 e 498 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 5). Em Ponta Grossa, observaram-se ganhos significativos no rendimento de soja, de 450 kg ha<sup>-1</sup>, com a inoculação de *Bradyrhizobium* e metabólitos formulados de *Bacillus*, em relação ao tratamento sem inoculação. A co-inoculação de *Bradyrhizobium* com *Bacillus* também apresentou ganhos consideráveis no rendimento e foi o tratamento com maior teor de N nos grãos, acumulando 29 kg ha<sup>-1</sup> de N a mais do que as plantas infectadas com a população naturalizada (Tabela 5).

Na safra seguinte (94/95), em Londrina, onde os tratamentos foram colocados sobre as mesmas parcelas do ano anterior, não foram constatadas diferenças estatísticas no número de nódulos, no estágio R2 (Tabela 6). Contudo, a porcentagem de ocupação dos nódulos pelas estirpes inoculadas foi

incrementada e, nos tratamentos de co-inoculação de *Bradyrhizobium* com células de *Bacillus* ou com formulado, esse estímulo foi de 326% e 344%, respectivamente, em relação ao tratamento não-infectado (Tabela 6). A população de *Bacillus*, avaliada em V3, variou pouco entre os tratamentos, entre 1,6.10<sup>4</sup> células g<sup>-1</sup> de solo, no tratamento não-infectado com *Bradyrhizobium* ou *Bacillus*, a 1,25.10<sup>5</sup> células g<sup>-1</sup> de solo, nos tratamentos inoculados com células de *Bacillus*.

Na safra 94/95, ao contrário da anterior, não houve períodos de estresse hídrico, resultando em maiores rendimentos de grãos. Também não foram constatadas diferenças estatísticas entre os tratamentos no rendimento e no teor de N total dos grãos, embora tenham sido observados alguns destaques, como os incrementos, em relação ao tratamento não-infectado, obtidos pela reinoculação de bradirrízóbio e com extrato alcoólico (285 kg), de bradirrízóbio +

**TABELA 5. Rendimento e N total nos grãos de soja, cv. BR-16 (Londrina) e BR-37 (Ponta Grossa), infectadas com duas estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019 + SEMIA 5080) e suas variantes naturais tolerantes aos metabólitos de *Bacillus* e co-infectadas com duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 + PRBS-1), ou seus metabólitos. Experimentos conduzidos na safra 93/94 em um Latossolo Roxo distrófico de Londrina, com população estabelecida de 3,6.10<sup>4</sup> células de *Bradyrhizobium* e em um Latossolo Vermelho-Escuro álico de Ponta Grossa com 6,0.10<sup>5</sup> células de *Bradyrhizobium* por g de solo. Médias de seis repetições<sup>1</sup>.**

Tratamento	Londrina		Ponta Grossa	
	Rendimento (kg ha <sup>-1</sup> )	N total (kg ha <sup>-1</sup> )	Rendimento (kg ha <sup>-1</sup> )	N total (kg ha <sup>-1</sup> )
<i>Bradyrhizobium</i>	2.298ab	138,3bcd	2.352ab	149,8ab
<i>Bradyrhizobium</i> (T) <sup>2</sup>	2.468ab	131,4cd	2.281ab	146,9ab
<i>Brady</i> + <i>Bacillus</i> <sup>3</sup>	2.146ab	125,3d	2.409ab	156,6a
<i>Brady</i> .(T)+ <i>Bacillus</i>	2.183ab	134,3cd	2.221ab	137,0ab
<i>Brady</i> +.metabólitos <sup>4</sup>	2.366ab	143,1abc	2.054b	127,6ab
<i>Brady</i> .(T)+metabólitos	2.568a	155,1a	2.244ab	136,2ab
<i>Brady</i> +.formulação <sup>5</sup>	2.544a	150,6ab	2.494a	147,6ab
<i>Brady</i> +.ext. alcoólico <sup>6</sup>	2.484ab	151,3ab	1.991b	120,6b
Não-inoculado	2.046b	132,9cd	2.044b	127,3ab
CV (%)	8,0	5,9	14,6	15,7

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>2</sup> *Bradyrhizobium* tolerante (T) aos metabólitos de *Bacillus*.

<sup>3</sup> *Bradyrhizobium* adicionado na concentração de 5,0.10<sup>7</sup> células semente<sup>-1</sup> e *Bacillus* na concentração de 1,0.10<sup>6</sup> células semente<sup>-1</sup>.

<sup>4</sup> Metabólitos adicionados na concentração de 40 mL de metabólitos 500 g<sup>-1</sup> de sementes.

<sup>5</sup> Metabólitos do *Bacillus* extraídos segundo McKeen et al. (1986), formulados como pó-molhável (5% dos metabólitos), misturados às sementes na proporção de 0,15 g do princípio ativo para 500 g de sementes.

<sup>6</sup> Extrato alcoólico contendo 0,5% de metabólitos purificados do *Bacillus*, obtidos segundo McKeen et al. (1986), misturado às sementes na proporção de 0,1 g do extrato para 500 g de sementes.

**TABELA 6.** Número de nódulos (R2), porcentagem de ocupação desses nódulos pelas estirpes inoculadas (R2) e rendimento e N total dos grãos de soja, cultivar BR-37, infectada com duas estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 5019 + SEMIA 5080), ou suas variantes naturais tolerantes aos metabólitos de *Bacillus* e co-infectada com duas estirpes de *Bacillus* (AP-3 + PRBS-1), ou seus metabólitos. Experimento conduzido em Londrina, na safra 94/95, sob as mesmas parcelas da safra anterior, em um Latossolo Roxo distrófico com população, de  $5,0 \cdot 10^4$  células de *Bradyrhizobium* e  $1,5 \cdot 10^4$  células de *Bacillus* por g de solo. Médias de seis repetições<sup>1</sup>.

Tratamento	Nodulação (n <sup>o</sup> pl <sup>-1</sup> )	Ocupação dos nódulos (%)			Rendimento (kg ha <sup>-1</sup> )	N total (kg ha <sup>-1</sup> )
		5019	5080	5019+5080		
<i>Bradyrhizobium</i>	25,8a	6,9bc	6,4abc	13,3bc	3562a	214,4a
<i>Bradyrhizobium</i> (T) <sup>2</sup>	23,7a	14,9abc	7,6ab	22,5ab	3796a	242,6a
<i>Brady.</i> + <i>Bacillus</i> <sup>3</sup>	25,0a	22,6a	8,1a	30,7a	3554a	207,6a
<i>Brady.</i> (T)+ <i>Bacillus</i>	27,0a	7,9abc	10,8a	18,7abc	3766a	231,6a
<i>Brady.</i> +metabólitos <sup>4</sup>	21,9a	11,7abc	3,6abc	15,3abc	3758a	227,4a
<i>Brady.</i> (T)+metabólitos	24,8a	6,6abc	4,3abc	10,9bc	3845a	232,2a
<i>Brady.</i> +formulação <sup>5</sup>	26,7a	23,3a	8,7a	32,0a	3890a	230,1a
<i>Brady.</i> +ext. alcoólico <sup>6</sup>	23,0a	17,0ab	1,3c	18,3abc	3911a	238,2a
Não-inoculado	22,0a	5,5c	1,6bc	7,2c	3626a	235,3a
CV (%)	16,7	29,5	26,5	27,4	8,0	6,0

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey (P<0,05).

<sup>2</sup> *Bradyrhizobium* tolerante (T) aos metabólitos de *Bacillus*.

<sup>3</sup> *Bradyrhizobium* adicionado na concentração de  $5,0 \cdot 10^7$  células semente<sup>-1</sup> e *Bacillus* na concentração de  $1,0 \cdot 10^6$  células semente<sup>-1</sup>.

<sup>4</sup> Metabólitos adicionados na concentração de 40 mL de metabólitos 500 g<sup>-1</sup> de sementes.

<sup>5</sup> Metabólitos do *Bacillus* extraídos segundo McKeen et al. (1986), formulados como pó-molhável (5% dos metabólitos), misturados às sementes na proporção de 0,15 g do princípio ativo para 500 g de sementes.

<sup>6</sup> Extrato alcoólico contendo 0,5% de metabólitos purificados do *Bacillus*, obtidos segundo McKeen et al. (1986), misturado às sementes na proporção de 0,1 g do extrato para 500 g de sementes.

formulação (264 kg) ou de bradirrizóbio (T) + metabólitos (219 kg) (Tabela 6).

Em relação ao rendimento de trigo utilizado na sucessão da soja após os três experimentos, não foi constatado efeito residual, estatisticamente significativo, de nenhum dos tratamentos. Deve-se salientar, porém, que, em Londrina, nas parcelas onde a soja havia recebido inóculo de *Bradyrhizobium* e *Bacillus*, os rendimentos do trigo plantado sobre essas mesmas parcelas foram superiores ( $2.040 \text{ kg ha}^{-1}$ , em 1994 e  $2.054 \text{ kg ha}^{-1}$ , em 1995) ao trigo plantado nas parcelas que haviam sido infectadas exclusivamente com *Bradyrhizobium* (respectivamente  $1.891$  e  $1.797 \text{ kg ha}^{-1}$ ).

A co-inoculação de rizóbio com outras bactérias, como *Bacillus*, *Azospirillum* e *Agrobacterium* pode influenciar a simbiose com as leguminosas de várias maneiras, sendo destacadas a influência no aumen-

to de competitividade do rizóbio inoculado (Triplett, 1990), o aumento da nodulação (Li & Alexander, 1988) e redução de doenças nas raízes (Turner & Backman, 1991). O potencial antagônico de *B. subtilis* a fungos fitopatogênicos de diversas culturas também é bastante conhecido, encontrando-se variabilidade, entre estirpes de *Bacillus*, em relação à ação fitopatogênica (Dunleavy, 1955; Pusey & Wilson, 1984; Bettiol & Kimati, 1990; Turner & Backman, 1991; Halverson et al., 1993; Krebs et al., 1993; Luz, 1994). Assim, a co-inoculação de rizóbio com *Bacillus* pode diminuir o ataque de patógenos de raízes e incrementar a nodulação, desde que os metabólitos do *Bacillus* não sejam tóxicos ao rizóbio. De fato, em uma etapa anterior deste trabalho, foram identificadas algumas estirpes de *B. subtilis* capazes de inibir, *in vitro*, os principais fungos patogênicos das sementes de soja (Araújo et al., 1995). Os metabólitos des-



sas estirpes incrementaram, também, a taxa de emergência das sementes, resultando em uma porcentagem de germinação equivalente à da aplicação de um fungicida à base de Thiabendazol, na dose de 20 g 100 kg<sup>-1</sup> de sementes (Araújo et al., 1995). Os efeitos benéficos da co-inoculação de rizóbio com *Bacillus* podem resultar, ainda, da síntese de fitormônios, como ácido indolacético e ácido abscísico (Araújo, 1995), que estimulariam o crescimento radicular, aumentando os sítios para a nodulação.

Inicialmente, neste trabalho, verificou-se que, de um modo geral, todos os tratamentos com *Bradyrhizobium* aumentaram a nodulação, a ocupação dos nódulos e o rendimento em relação ao tratamento não-infectado. Esses dados confirmam, portanto, resultados de experimentos recentes, que evidenciaram os benefícios da reinoculação (Hungria et al., 1994, 1997; Nishi & Hungria, 1996). Pouco se conhece, porém, sobre o comportamento da co-inoculação de *Bradyrhizobium japonicum*/*B. elkanii* e *Bacillus* no campo, particularmente em solos com população estabelecida dessas espécies de bactérias. Neste estudo, a co-inoculação de *Bradyrhizobium* tolerante com células lavadas de *B. subtilis* resultou em incrementos, em relação à reinoculação apenas de *Bradyrhizobium*, na porcentagem de ocupação dos nódulos, na safra 93/94, de 88% (Londrina) e 14% (Ponta Grossa) e, em 94/95, em Londrina, um incremento de 131% foi constatado com o *Bradyrhizobium* não-tolerante. A adição de metabólitos aumentou significativamente a nodulação e, principalmente, a ocupação dos nódulos em Ponta Grossa (V3) (93/94), resultando em um incremento de 200% nesse parâmetro, em relação ao tratamento não-infectado. A complementação com formulados aumentou o número e a massa nodular, em Londrina e Ponta Grossa (93/94) e a porcentagem de ocupação dos nódulos, nos três ensaios. A resposta a diversos tratamentos co-infectados, em termos de número e massa nodular, constatada na safra 93/94, e não-detectada na safra seguinte pode resultar do fato de que, no primeiro ano de experimentação, houve um período prolongado de seca na semeadura, o que sugere que a co-inoculação pode favorecer a nodulação sob condições de estresse, conforme sugerido por Turner & Backman (1991). Isso

pode estar relacionado à produção de fitormônios por *Bacillus*, estimulando o crescimento das raízes e aumentando a capacidade de captação de água pela planta. Mecanismo semelhante foi comprovado em diversos ensaios de inoculação de gramíneas com bactérias do gênero *Azospirillum* (Hartmann & Zimmer, 1994).

Na safra 93/94, em Londrina e Ponta Grossa, o maior rendimento de grãos foi obtido pela co-inoculação de *Bradyrhizobium* + formulados, resultando em ganhos estatisticamente significativos, em relação ao tratamento não-infectado e expressivos mas não-significativos, em relação à inoculação de *Bradyrhizobium*. A co-inoculação da variante com metabólitos também incrementou, significativamente, o rendimento em Londrina, em relação ao controle não-infectado. Esses resultados confirmam os efeitos benéficos, na nodulação e no rendimento, obtidos pela co-inoculação de *Bradyrhizobium* com *Bacillus* em soja, relatados por outros autores (Li & Alexander, 1988; Halverson & Handelsman, 1991).

Em relação à melhor concentração de células de *Bacillus* para a co-inoculação, foi observado que a concentração de 1.10<sup>6</sup> células lavadas semente<sup>-1</sup>, que proporcionou uma população em torno de 3,0.10<sup>5</sup> células na rizosfera, pode não ter sido suficiente para proporcionar o maior estímulo à nodulação. Provavelmente isso pode ser atribuído a uma população insuficiente de *Bacillus* ou à ausência de maiores concentrações de metabólitos, produzidos pelo *Bacillus*, na fase inicial da cultura. A elevação da concentração do inóculo com *Bacillus*, via semente, porém, seria problemática, devido à necessidade da inoculação, também, do rizóbio em concentrações de cerca de 1,0.10<sup>5</sup> células semente<sup>-1</sup>, podendo ocorrer perda de adesão das células à superfície das sementes. Essa limitação, porém, poderia ser eliminada pelo uso de metabólitos ou formulados de *Bacillus*. A recomendação de metabólitos ou formulados poderá, ainda, diminuir o emprego de fungicidas para sementes de soja, que hoje é generalizado (Embrapa, 1996) e cujos efeitos sobre as estirpes de bradirrízóbio podem ser bastante drásticos (Cattelan et al., 1995), prejudicando a nodulação. Por outro lado, o emprego de *Bacillus*, ou seus metabólitos, poderá contribuir, ainda, com fitormônios e sinais moleculares,

incrementando o crescimento das raízes, a nodulação e as taxas de fixação do N<sub>2</sub> e reduzindo a suscetibilidade a estresses hídricos.

### CONCLUSÃO

A co-inoculação, em sementes de soja, de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii* e de células de *Bacillus subtilis* ou seus metabólitos brutos ou formulados, proporciona incrementos na nodulação, na ocupação dos nódulos pelas estirpes de *Bradyrhizobium* e no rendimento da soja.

### AGRADECIMENTOS

1. À Lígia M. de O. Chueire, Rinaldo B. Conceição, Leny M. Miura, José Z. Moraes e Rubson N. O. Sibaldelle, pelo auxílio durante a condução dos experimentos.

### REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.63-94.
- ANDREEVA, I.N.; MANDKHAN, K.; RED'KINA, T.V.; MISHUSTIN, E.N.; IZMAILOV, S.F. Effect of *Azospirillum brasilense* on formation and nitrogen-fixing activity of bean and soybean nodules. **Soviet Plant Physiology**, New York, v.38, p.897-904, 1991.
- ARAÚJO, F.F. **Efeito de *Bacillus* e seus metabólitos na competitividade e nodulação da soja (*Glycine max* [L.] Merrill) por *Bradyrhizobium***. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1995. 117p. Tese de Mestrado.
- ARAÚJO, F.F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M.; LIMA, J. de. Caracterização do potencial antifúngico de *Bacillus* spp. isolados de solos do Paraná. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Eds.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: Iapar/Embrapa-CNPSO, 1995. p.450-455.
- BETTIOL, W.; KIMATI, H. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de brusone do arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.25, n.8, p.1165-1174, 1990.
- BOTTOMLEY, P.J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.293-348.
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkens, 1975. 1268p.
- CAETANO-ANOLLÉS, G.; BAUER, W.D. Enhanced nodule initiation on alfafa by wild-type *Rhizobium meliloti* co-inoculated with *nod* gene mutants and other bacteria. **Planta**, Berlin, v.174, p.385-395, 1988.
- CATTELAN, A.J.; SPOLADORI, C.L.; HENNING, A.A. Efeito do tratamento de sementes de soja com fungicidas recomendados sobre a fixação do nitrogênio atmosférico e a sobrevivência do *Bradyrhizobium japonicum* em casa de vegetação. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Eds.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: Iapar/Embrapa-CNPSO, 1995. p.398-402.
- DUNLEAVY, J. Control of damping-off sugar beet by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.45, p.252-258, 1955.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, PR). **Recomendações técnicas para a cultura da soja no Paraná, 1996/97**. Londrina: Embrapa-Soja, 1996. 187p. (Embrapa-Soja. Documentos, 97).
- FEIJE, F.; ANGER, V. Spot tests in inorganic analyses. **Analytical Chemistry Acta**, Netherlands, v.149, p.363-367, 1972.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
- HALVERSON, L.J.; CLAYTON, M.K.; HANDELSMAN, J. Population biology of *Bacillus cereus* UW85 in the rhizosphere of field-grown soybean. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.25, p.485-493, 1993.
- HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.2767-2770, 1991.

- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed.). *Azospirillum/plant associations*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.15-39.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J. **A inoculação da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1997. 20p. (Embrapa-CNPSo. Circular técnica, 17).
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio na soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.). **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. p.9-89.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriological**, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- KREBS, B.; JUNGE, H.; OCKHARDT, A.; HODING, B.; HEUBNER, D.; ERBEN, U. *Bacillus subtilis*: an effective biocontrol agent. **Pesticide Science**, Barking, v.37, p.427-429, 1993.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*, Jordan, 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkani* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.211-219, 1988.
- LUZ, W.C. Efeito da microbiolização de sementes no rendimento e controle da podridão comum nas raízes e de patógenos das sementes de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p.144-148, 1994.
- McKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.76, p.136-139, 1986.
- MYTTON, L.R.; SKØT, L. Breeding for improved symbiotic nitrogen fixation. In: HAYWARD, M.D.; BOSEMARK, N.O.; ROMAGOSA, I. (Eds.). **Plant breeding: principles and prospects**. London: Chapman & Hall, 1993. p.451-472.
- NISHI, C.Y.M.; HUNGRIA, M. Efeito da reinoculação da soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em um solo com população estabelecida de *Bradyrhizobium* com as estirpes SEMIA 566, 586, 587, 5019, 5079 e 5080. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.5, p.359-368, 1996.
- OMAR, S.A.; ABD-ALLA, M.H. Enhancement of faba bean nodulation, nitrogen fixation and growth by different microorganisms. **Biologia Plantarum**, Prague, v.36, p.295-300, 1994.
- PLAZINSKI, J.; ROLFE, B.G. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repens*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.120, p.181-187, 1985.
- PUSEY, P.L.; WILSON, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.68, p.753-756, 1984.
- SINGH, C.S.; RAO, N.S.S. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.53, p.387-392, 1979.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook of rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.
- STREETER, J.G. Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.513-522, 1994.
- TRIPLETT, E.W. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.3, p.199-206, 1990.
- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.347-352, 1991.