

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Soja  
Ministério da Agricultura e Pecuária**

## **DOCUMENTOS 453**

# 18<sup>a</sup> Jornada Acadêmica da Embrapa Soja Resumos expandidos

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite  
Larissa Alexandra Cardoso Moraes  
Kelly Catharin*  
Editoras Técnicas

**Embrapa Soja**  
Londrina, PR  
2023

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**  
Rod. Carlos João Strass, s/n  
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta  
CEP 86065-981  
Caixa Postal 4006  
Londrina, PR  
Fone: (43) 3371 6000  
www.embrapa.br/soja  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Soja**

Presidente  
*Adeney de Freitas Bueno*

Secretária-Executiva  
*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Membros  
*Claudine Dinali Santos Seixas, Edson Hirose,  
Ivani de Oliveira Negrão Lopes, José de Barros  
França Neto, Leandro Eugênio Cardamone  
Diniz, Marco Antonio Nogueira, Mônica Juliani  
Zavaglia Pereira e Norman Neumaier*

Supervisão editorial  
*Vanessa Fuzinato Dall'Agnol*

Bibliotecária  
*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Editoração eletrônica e capa  
*Marisa Yuri Horikawa*

**1ª edição**  
PDF digitalizado (2023).

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Soja

---

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (18. : 2023: Londrina, PR).  
Resumos expandidos [da] XVIII Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina  
Maria Villas Bôas de Campos Leite... [et al.] editoras técnicas – Londrina:  
Embrapa Soja, 2023.  
161 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 453).

1. Soja. 2. Pesquisa agrícola. I. Leite, Regina Maria Villas Bôas de Campos. II.  
Moraes, Larissa Alexandra Cardoso. III. Catharin, Kelly. IV. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

# Exopolímeros bacterianos como protetores celulares em inoculantes para soja

BARBOSA, R. L.<sup>1</sup>; HELENE, L. C. F.<sup>2</sup>; RONDINA, A. B. L.<sup>3</sup>; GUIMARÃES, G. S.<sup>2</sup>; HUNGRIA, M.<sup>4</sup>; NOGUEIRA, M. A.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UEL, Departamento de Microbiologia, Londrina, PR; <sup>2</sup>UEL, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia; <sup>3</sup>UEL, Departamento de Biologia Animal e Vegetal; <sup>4</sup>Pesquisador(a), Embrapa Soja.

## Introdução

A produtividade da soja no Brasil está diretamente relacionada à inoculação com *Bradyrhizobium* spp., que disponibiliza a maior parte do nitrogênio (N) demandado pela cultura por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e dispensa o uso de N fertilizante. No entanto, o tratamento de sementes (TS) com agrotóxicos pode reduzir a sobrevivência das bactérias inoculadas, diminuindo a eficiência da FBN e a produtividade (Hungria; Nogueira 2020). A adição de protetores celulares pode reduzir os efeitos nocivos dos agrotóxicos aos inoculantes (Machineski et al., 2018).

Substâncias poliméricas extracelulares (EPS ou exopolímeros) naturalmente sintetizadas por microrganismos como *Agrobacterium* sp. e *Rhizobium* sp. para proteção contra estresses ambientais já têm amplo uso industrial (Freitas et al., 2017) e podem ser usadas como aditivos em formulações de inoculantes (Farias et al., 2022). Contudo, estudos quanto ao uso como protetores celulares em inoculantes líquidos para aumentar a compatibilidade com agrotóxicos ainda são escassos. Este estudo avaliou o efeito protetor de EPS produzidos por *Agrobacterium* sp. e *Rizhobium* sp. em estirpes de *Bradyrhizobium* spp. inoculadas em sementes de soja tratadas com Standak® Top.

## Material e Métodos

### Seleção de isolados produtores de EPS

Avaliações fenotípicas (Castellane et al., 2014) e quantificação da produção de EPS pelo método Fenol-Sulfúrico (Dubois et al., 1956) em diferentes tempos de crescimento foram realizadas em 15 isolados dos gêneros

*Rhizobium* sp., *Burkholderia* sp., *Mesorhizobium* sp., *Gluconacetobacter* sp. e *Agrobacterium* sp. As estirpes CNPSO 1627 de *Rhizobium* sp. e CNPSO 4041 de *Agrobacterium* sp. foram consideradas promissoras para futuros testes pela abundante produção de EPS. Para eliminar as células dos isolados produtores e avaliar apenas o efeito dos EPS produzidos em parte dos tratamentos, o cultivo foi autoclavado. Esse processo não alterou a concentração de EPS, indicando termoestabilidade.

### **Compatibilidade entre os isolados produtores de EPS e estirpes comerciais de *Bradyrhizobium* spp.**

A compatibilidade das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 5019 e SEMIA 597) foi testada com os isolados produtores de EPS com base no método cross-streak (Williston et al., 1947). As colônias apresentaram crescimento normal na presença dos EPS e dos isolados produtores, indicando compatibilidade. As estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 foram escolhidas para as análises seguintes, por serem as mais empregadas comercialmente em inoculantes para soja.

### **Efeito protetor dos EPS sobre *Bradyrhizobium* spp. *in vitro***

As estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 foram combinadas com cultivos in natura ou autoclavados de cada estirpe produtora de EPS. As combinações foram inoculadas em sementes de soja tratadas com Standak®Top (Piraclostrobina, 25 g L<sup>-1</sup>; Tiofanato Metílico, 225 g L<sup>-1</sup>; Fipronil, 250 g L<sup>-1</sup>, na dose de 2 mL kg<sup>-1</sup> de sementes), mantendo-se controles sem agrotóxico e sem EPS, e com agrotóxico e sem EPS, totalizando seis tratamentos para cada estirpe de *Bradyrhizobium* spp. (Tabela 1). A recuperação de células de *Bradyrhizobium* spp. foi realizada em diferentes tempos de armazenamento das sementes tratadas com base na Instrução Normativa n° 30 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2010) em meio acrescido de ciclohexamida e tetraciclina. Os resultados foram expressos em log UFC semente<sup>-1</sup> e plotados graficamente.

**Tabela 1.** Tratamentos aplicados no ensaio in vitro para avaliação do efeito protetor dos EPS produzidos pelos isolados CNPSo 1627 (Rhi) e CNPSo 4041 (Agro), in natura (nat) ou autoclavados (aut), sobre a sobrevivência de *Bradyrhizobium* spp., SEMIA 5079 e SEMIA 5080, inoculadas em sementes de soja tratadas com Standak® Top.

Identificação do tratamento <sup>a</sup>	Tratamento de sementes (TS) (Standak® Top 2 mL kg <sup>-1</sup> )	EPS (2 mL kg <sup>-1</sup> )
-TS	Ausente	Ausente
+TS	Presente	Ausente
+TS EPS Rhi nat	Presente	CNPSo 1627 In natura
+TS EPS Rhi aut	Presente	CNPSo 1627 autoclavado
+TS EPS Agro nat	Presente	CNPSo 4041 In natura
+TS EPS Agro aut	Presente	CNPSo 4041 autoclavado

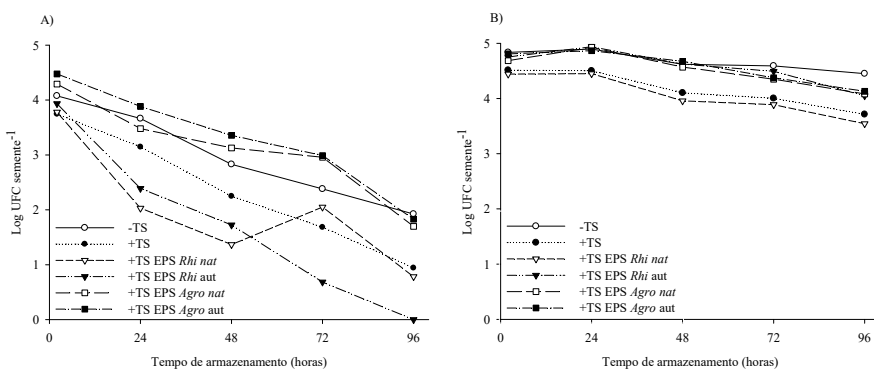
<sup>a</sup> -TS, sementes sem tratamento químico e sem EPS; +TS, sementes com tratamento químico e sem EPS; +TS EPS *Rhi* nat, sementes com tratamento químico e com EPS *in natura* de *Rhizobium* sp.; +TS EPS *Rhi* aut, sementes com tratamento químico e com EPS autoclavado de *Rhizobium* sp.; +TS EPS *Agro* nat, sementes tratadas com químico e com EPS *in natura* de *Agrobacterium* sp.; +TS EPS *Agro* aut, sementes tratadas com químico e com EPS autoclavado de *Agrobacterium* sp.

### Efeito protetor dos EPS sobre *Bradyrhizobium* spp. em casa de vegetação

Sementes de soja cv. BRS 543 tratadas com Standak®Top (2 mL kg<sup>-1</sup>) foram inoculadas separadamente com cada estirpe, SEMIA 5080 ou SEMIA 5079, combinadas com cultivos in natura ou autoclavados das estirpes produtoras de EPS como no ensaio in vitro, mantendo-se dois controles: sementes desinfetadas com álcool etílico (70%) e hipoclorito de sódio (0,4-0,6%) e não inoculadas (controle absoluto); e sementes com agrotóxico não inoculadas, totalizando 14 tratamentos, em seis repetições. A semeadura foi realizada em vasos de Leonard contendo substrato estéril (areia: carvão moído, 2:1 v/v) e solução nutritiva estéril sem nitrogênio (Broughton; Dilworth, 1971). O experimento foi conduzido até 30 dias após a emergência das plântulas (DAE) e avaliado quanto à massa da parte aérea, raízes e nódulos secos, número de nódulos e teor de N na parte aérea (Willis et al., 1996). O acúmulo de N na parte aérea foi calculado com base na concentração na parte aérea seca. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Duncan a  $p \leq 0,05$  pelo software STATISTICA v.12.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## Resultados e Discussão

Em condição de laboratório, para ambas as estirpes (SEMIA 5080 e SEMIA 5079), houve redução na recuperação de células com o aumento do tempo de armazenamento. Contudo, o EPS *in natura* ou autoclavado da estirpe CNPSo 4041 manteve, em níveis aceitáveis, a sobrevivência da estirpe SEMIA 5080 na presença do agrotóxico até 24 h de armazenamento. Para a estirpe SEMIA 5079 os EPS da estirpe CNPSo 4041 e o EPS autoclavado da estirpe CNPSo 1627 promoveram maior sobrevivência até 48 h. O teste evidenciou a maior sensibilidade ao armazenamento da estirpe SEMIA 5080 em relação à SEMIA 5079, independente dos tratamentos de sementes (Figura 1). Farias et al. (2022) observaram maior viabilidade celular de *Bradyrhizobium* spp. (estirpes SEMIA 5019, SEMIA 5079, SEMIA 6461 e SEMIA 6463) em inoculantes líquidos formulados com EPS de *Paraburkholderia* sp. (UFLA 04-269) e *R. tropici* (CIAT 899) por até 90 dias de armazenamento, Esses resultados são pioneiros quanto ao uso dos EPS em inoculantes e seu potencial como protetores em condições estressantes às células de rizóbios expostas a produtos químicos, de modo a aumentar a viabilidade celular das bactérias inoculadas.



**Figura 1.** Número de células (log UFC semente<sup>-1</sup>) das estirpes SEMIA 5080 (A) e SEMIA 5079 (B) recuperadas de sementes de soja tratadas com agrotóxico na presença de EPS, *in natura* ou autoclavados, dos isolados CNPSo 1627 e CNPSo 4041 em diferentes tempos de armazenamento das sementes.

-TS, sementes sem agrotóxico; +TS, sementes com agrotóxico; +TS EPS *Rhi nat*, sementes com agrotóxico e adição de EPS *in natura* de *Rhizobium* sp. (CNPSo 1627); +TS EPS *Rhi aut*, sementes com agrotóxico e adição de EPS autoclavado de *Rhizobium* sp. (CNPSo 1627); +TS EPS *Agro nat*, sementes com agrotóxico e adição de EPS *in natura* de *Agrobacterium* sp. (CNPSo 4041); +TS EPS *Agro aut*, sementes com agrotóxico e adição de EPS autoclavado de *Agrobacterium* sp. (CNPSo 4041).

Em casa de vegetação, nas plantas dos tratamentos inoculados com a SEMIA 5080 (Tabela 2), não houve efeito sobre a nodulação ou massa de raízes secas, independente da presença do químico no TS e da adição dos EPS. Diferentemente desses resultados, em um estudo da sobrevivência de *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) em inoculante turfoso inoculado em sementes de soja tratadas com diferentes fungicidas, Costa et al. (2013) observaram diminuição da nodulação, que variou entre os tratamentos com diferentes produtos formulados com os mesmos princípios ativos, indicando que a toxicidade do agrotóxico pode também estar relacionada à presença de outros aditivos nas formulações.

Todos os tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 5080, independente da presença do agrotóxico e da adição de EPS, apresentaram níveis superiores de massa da parte aérea seca, quando comparados ao tratamento sem inoculação, reforçando a importância da utilização de estirpes fixadoras de nitrogênio. A inoculação da estirpe SEMIA 5080 com EPS in natura da estirpe CNPSo 1627 se destacou quanto ao teor de N nas plantas, contudo, não houve diferença significativa para o N acumulado na parte aérea das plantas inoculadas, independente dos EPS.

Nas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 5079 (Tabela 2), o maior número de nódulos foi observado no tratamento inoculado e sem químico no TS, indicando que a presença do agrotóxico, mesmo com a adição dos EPS como protetores celulares diminuiu a nodulação. Porém, não houve diferenças significativas entre os tratamentos quanto à massa de nódulos. A adição dos EPS autoclavado da estirpe CNPSo 1627 e in natura da estirpe CNPSo 4041 estimulou o desenvolvimento de raízes em relação àquelas dos tratamentos controles com agrotóxico, inoculados e não inoculados. As plantas da combinação SEMIA 5079 e EPS in natura de CNPSo 4041 também se destacaram quanto à massa de parte aérea seca. Quanto ao teor de N e N acumulado na parte aérea, não houve diferenças significativas entre os tratamentos inoculados, independente da presença de EPS.

**Tabela 2.** Parâmetros simbióticos e de crescimento de soja cultivada em casa de vegetação, cujas sementes foram tratadas ou não com agrotóxico e inoculadas com diferentes combinações das estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 5079 e EPS, *in natura* ou autoclavados, dos isolados CNPSo 1627 (*Rhi*) ou CNPSo 4041 (*Agro*).

Tratamentos <sup>a</sup>	Nodulação		Biomassa		N na parte aérea	
	NN <sup>b</sup> (nº pl <sup>-1</sup> )	MNS (mg pl <sup>-1</sup> )	MRS (g pl <sup>-1</sup> )	MPAS (g pl <sup>-1</sup> )	Teor de N (g kg <sup>-1</sup> )	N acumulado (mg pl <sup>-1</sup> )
-----SEMIA 5080-----						
+TS (NI)	-	-	0,56	0,91 b	9,85 c	8,91 b
-TS (I)	49,2	230	0,61	1,80 a	37,8 ab	66,3 a
+TS (I)	42,8	215	0,61	1,60 a	38,5 ab	59,2 a
+TS EPS <i>Rhi</i> nat	58,1	247	0,61	1,91 a	41,3 a	77,2 a
+TS EPS <i>Rhi</i> aut	48,6	175	0,49	1,45 ab	34,6 b	52,1 a
+TS EPS <i>Agro</i> nat	46,5	200	0,56	1,61 a	38,1 ab	62,0 a
+TS EPS <i>Agro</i> aut	38,5	187	0,68	1,58 a	36,5 ab	59,6 a
Value-p	0,12	0,55	0,20	0,04	<0,01	<0,01
CV (%)	28,5	34,6	20,3	36,1	32,2	56,1
-----SEMIA 5079-----						
+TS (NI)	-	-	0,56 d	0,91 c	9,85 b	8,91 b
-TS (I)	60 a	208	0,83 ab	1,59 ab	31,9 a	52,5 a
+TS (I)	43 ab	147	0,59 cd	1,26 bc	37,5 a	48,6 a
+TS EPS <i>Rhi</i> nat	26 b	190	0,78 abc	1,58 ab	33,6 a	52,0 a
+TS EPS <i>Rhi</i> aut	45 ab	212	0,89 a	1,63 ab	33,8 a	57,3 a
+TS EPS <i>Agro</i> nat	40 b	225	0,89 a	1,87 a	35,9 a	67,2 a
+TS EPS <i>Agro</i> aut	36 b	173	0,66 bcd	1,46 ab	39,4 a	59,2 a
Value-p	0,01	0,12	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
CV (%)	45,1	28,1	27	29,7	36,2	49,8

Os dados representam a média de seis repetições. Médias seguidas por letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a  $p \leq 0,05$ .

<sup>a</sup> +TS (NI), sementes com tratamento químico não inoculadas; -TS (I), sementes sem tratamento químico inoculadas; +TS (I), sementes com tratamento químico inoculadas; +TS EPS *Rhi* nat, sementes com tratamento químico, inoculadas e com EPS *in natura* de *Rhizobium* sp.; +TS EPS *Rhi* aut, sementes com tratamento químico, inoculadas e com EPS autoclavado de *Rhizobium* sp.; +TS EPS *Agro* nat, sementes com tratamento químico, inoculadas e com EPS *in natura* de *Agrobacterium* sp.; +TS EPS *Agro* aut, sementes com tratamento químico, inoculadas e com EPS autoclavado de *Agrobacterium* sp.

<sup>b</sup>NN Número de nódulos; MNS Massa de nódulos secos; MRS Massa de raízes secas; MPAS Massa de parte aérea seca.



## Conclusão

Os EPS de *Rhizobium* sp. e *Agrobacterium* sp. aumentaram a viabilidade celular de *Bradyrhizobium* spp. inoculados em sementes de soja pré-tratadas com agrotóxico e beneficiaram atributos relativos à FBN e ao desenvolvimento das plantas de soja em ensaios *in vitro* e em casa de vegetação. O estudo é pioneiro na avaliação de EPS para aumentar a compatibilidade de químicos com inoculantes no tratamento de sementes de soja.

## Referências

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 12 de novembro de 2010. Estabelecer os métodos oficiais para análise de inoculantes. **Diário Oficial da União**, 17 nov. 2010. seção 1, p. 4-10.
- BROUGHTON, W. J.; DILWORTH, M. J.; Control of Leghemoglobin in snake beans. **Biochemical Journal**, v. 125, n. 4, p. 1075-1080, 1971.
- CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. de M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191-197, 2014.
- COSTA, M. R.; CAVALHEIRO, J. C. T.; GOULART, A. C. D.; MERCANTE, F. M. Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em Sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação e a produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 3, p. 186-192, 2013.
- DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemical**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- FARIAS, T. P.; SOARES, B. L.; D'ÊÇA, C. S. B.; MOREIRA, F. M. S. Polymeric formulations of liquid inoculants with rhizobia exopolysaccharides increase the survival and symbiotic efficiency of elite *Bradyrhizobium* strains. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 177, p. 1-9, 2022.
- FREITAS, F. TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674-1683, 2017.
- MACHINESKI, G. S.; SCARAMAL, A. S.; MATOS, M. A. de; MACHINESKI, O.; COLOZZI FILHO, A. Efficiency of pre-inoculation of soybeans with *Bradyrhizobium* up to 60 days before sowing. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 24, p. 1233-1242, 2018.
- WILLIS, R. B.; MONTGOMERY, M. E.; ALLEN, P. R. Improved method for manual, colorimetric determination of total kjeldahl nitrogen using salicylate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1804-1807, 1996.
- WILLISTON, E. H.; ZIA-WALRATH, P.; YOUMANS, G. P. Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against virulent human type tubercle bacilli. **Journal of Bacteriology**, v. 54, n. 5, p. 563-568, 1947.