

## Capítulo 8

# Fixação biológica de nitrogênio

---

*Mariangela Hungria, Marco Antonio Nogueira*

### Introdução

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura da soja. Para cada 1000 kg de grãos são necessários, aproximadamente, 80 kg de N. Basicamente, as fontes de N disponíveis para as plantas são o N proveniente da mineralização da matéria orgânica do solo, os fertilizantes nitrogenados e a fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A FBN é a principal fonte de N para a cultura da soja. Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* infectam as raízes da planta via pelos radiculares, formando os nódulos. A FBN pode fornecer todo o N que a soja necessita (Hungria et al., 2007; Hungria; Mendes, 2015; Hungria; Nogueira, 2019).

### Qualidade e quantidade dos inoculantes

Os inoculantes turfosos, líquidos ou outras formulações, bem como outras tecnologias de inoculação devem comprovar a eficiência agrônômica, segundo protocolos definidos em instruções normativas vigentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa). Recomenda-se que os resultados sejam previamente apresentados, discutidos

e aprovados na RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). As inovações baseadas na FBN e as boas práticas de inoculação têm garantido à agricultura brasileira atributos de sustentabilidade ímpares no mundo (Hungria; Mendes, 2015; Hungria; Nogueira, 2019).

A legislação brasileira exige uma concentração mínima de  $1 \times 10^9$  células viáveis de *Bradyrhizobium* spp. por grama ou mL do inoculante para a soja; além disso, não devem ser encontrados contaminantes na diluição  $10^{-5}$ . A pesquisa recomenda que a dose de inoculante a ser aplicada nas sementes deva fornecer, no mínimo, 1,2 milhões de células viáveis por semente de soja. Além disso, o volume de inoculante líquido aplicado não deve ser inferior a 100 mL, sem qualquer diluição em água, por 50 kg de semente, para garantir distribuição homogênea nas sementes. A base de cálculo para o número de bactérias por semente é a concentração registrada no Mapa que consta na embalagem do inoculante.

### Cuidados ao adquirir inoculantes

- adquirir inoculante devidamente registrado no Mapa. O número de registro deverá estar impresso na embalagem;
- não adquirir e não usar inoculante com prazo de validade vencido;
- certificar-se de que o inoculante estava armazenado em condições satisfatórias de temperatura (não superior a 30 °C) e arejamento;
- transportar e conservar o inoculante em lugar fresco e bem arejado;
- certificar-se de que o inoculante contenha as estirpes autorizadas pelo Mapa, podendo ser uma ou mais delas. Essas estirpes são: *Bradyrhizobium* spp. SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080;
- em caso de dúvida sobre a qualidade do inoculante, procurar um fiscal do Mapa;
- o processo de fabricação de inoculantes de qualidade exige alto conhecimento tecnológico e controle de qualidade rígido, garantindo a concentração, a pureza e a identidade das estirpes. Portanto, para obter nodulação eficiente e evitar a introdução de patógenos e bactérias não eficientes, não utilizar inoculantes de produção caseira ou *on farm* cuja qualidade de cada lote não seja microbiologicamente comprovada por laboratório qualificado para esse fim.

## Cuidados na inoculação

- fazer a inoculação à sombra e manter as sementes inoculadas protegidas do sol e do calor excessivo. Evitar o aquecimento, em demasia, do depósito de sementes na semeadora, pois altas temperaturas reduzem a sobrevivência das bactérias nas sementes;
- fazer a semeadura logo após a inoculação, especialmente se a semente for tratada com outros produtos, por exemplo, agrotóxicos, micronutrientes, reguladores de crescimento, etc. Caso não seja possível semear em até 24 h após a inoculação, repetir o procedimento. Para inoculantes acompanhados ou possuidores de protetores celulares específicos, com registro no Mapa para tal finalidade, que garantam a viabilidade da bactéria nas sementes, seguir a orientação do fabricante;
- para melhor aderência dos inoculantes turfosos, recomenda-se umedecer as sementes com 300 mL/50 kg sementes de solução açucarada a 10% (100 g de açúcar e completar para um litro de água) e, então, aplicar o inoculante, misturando até que haja uma distribuição uniforme nas sementes;
- é imprescindível que a distribuição do inoculante turfoso ou líquido seja uniforme em todas as sementes, para garantir o benefício da FBN em todas as plantas. Não inocular diretamente na caixa da semeadora, pois isso não propicia homogeneidade;
- nunca misturar o inoculante com os produtos químicos usados no tratamento de sementes (o “sopão”). Caso seja necessário o uso desses produtos, primeiro tratar as sementes com os químicos e deixar secar para, em uma segunda operação, inocular as sementes com o inoculante no máximo até 24 h antes da semeadura;
- o volume total de líquidos aportados às sementes, considerando inoculantes e outros produtos utilizados no tratamento das mesmas, não deve ultrapassar 300 mL/50 kg para não comprometer a viabilidade das sementes. No caso de sementes de alta qualidade fisiológica (germinação e, principalmente, vigor), há relatos de utilização de até 550 mL/50 kg, sem prejuízo. Mais detalhes sobre o volume máximo de calda podem ser obtidos no capítulo 13 “Tecnologia de sementes”.

## Métodos de inoculação

Os fornecedores devem oferecer inoculantes de boa qualidade e informações técnicas adicionais sobre a inoculação que permitam a melhor

distribuição e maior sobrevivência da bactéria nas sementes, para maximizar a FBN.

Os agricultores devem seguir, rigorosamente, as orientações técnicas indicadas para cada produto e o método de inoculação.

### **Inoculação nas sementes**

Inoculante turfoso - umedecer as sementes com solução açucarada a 10% ou outra substância adesiva, misturando bem. Adicionar o inoculante, homogeneizar e deixar secar à sombra. A distribuição da mistura açucarada/adesiva e do inoculante nas sementes deve ser feita, preferencialmente, em máquinas próprias, tambor giratório ou betoneira.

Inoculante líquido - aplicar o inoculante nas sementes, homogeneizar e deixar secar à sombra.

### **Inoculação no sulco de semeadura**

O método tradicional de inoculação pode ser substituído pela aplicação do inoculante via sulco de semeadura, em solos com ou sem população de *Bradyrhizobium* estabelecida (Campo et al., 2010; Zilli et al., 2010). Caso esse procedimento seja adotado, a dose aplicada de inoculante deve ser equivalente a, no mínimo, 2,5 milhões de células por semente. Em áreas que não são inoculadas há vários anos, particularmente em solos arenosos, ou em áreas novas, deve ser usada, no mínimo, o dobro da dose recomendada. Em geral, o volume de calda usado na inoculação no sulco não deve ser inferior a 50 L/ha, para permitir a boa distribuição das bactérias no solo, salvo em caso de equipamento que garanta a distribuição homogênea com menor volume. A utilização desse método tem a vantagem de reduzir os efeitos tóxicos de produtos químicos utilizados no tratamento de sementes sobre a bactéria (Hungria et al., 2007; Campo et al., 2010).

### **Inoculação por pulverização na semeadura**

Alguns agricultores têm optado pela inoculação por pulverização sobre o solo, logo após a semeadura, com o intuito de evitar o contato das bactérias com agrotóxicos. Contudo, resultados de pesquisa mostram que

essa opção é muito menos eficaz do que a inoculação das sementes, ou no sulco (Zilli et al., 2008; Hungria et al., 2015a). Além disso, a eficácia pode ser ainda menor se a aplicação for feita em condições de baixa umidade do solo e do ar e de alta radiação solar, pois as bactérias são sensíveis à dessecação e aos raios ultravioleta. Caso seja imprescindível fazer esse tipo de aplicação, para corrigir algum erro de inoculação no momento da semeadura, fazer a aplicação no final da tarde, com solo úmido e com alto volume de calda (200 L/ha) direcionada ao solo ou, se possível, irrigar após a aplicação, para garantir que os rizóbios cheguem até os segmentos novos das raízes, suscetíveis à formação de nódulos.

### **Sementes pré-inoculadas**

Tem sido comum a comercialização de sementes de soja pré-inoculadas (inoculação antecipada) com *Bradyrhizobium*. Sementes pré-inoculadas são comercializadas já com a adição do inoculante juntamente com outros produtos empregados no tratamento de sementes. O inoculante para essa finalidade possui protetores celulares ou outro veículo que proporcione maior sobrevivência da bactéria comparada ao inoculante tradicional. O período máximo entre a inoculação até a semeadura deve ser respeitado conforme recomendação do fabricante para garantir a quantidade mínima necessária de bactérias viáveis nas sementes. A pesquisa recomenda que essa quantidade deva ser de, pelo menos, 80 mil a 100 mil células viáveis por semente no momento da semeadura. É importante observar se o inoculante possui registro no Mapa para pré-inoculação, para quantos dias de armazenamento e a compatibilidade com os produtos químicos utilizados no tratamento de sementes. Ainda assim, recomenda-se que as sementes sejam analisadas em laboratório antes da semeadura para avaliar a sobrevivência das bactérias inoculadas nessa condição, pois, consistentemente, tem sido observada redução drástica de células vivas de *Bradyrhizobium* em sementes pré-inoculadas.

### **Aplicação de agrotóxicos às sementes junto com o inoculante**

Dentre os agrotóxicos, os mais estudados até o presente momento são os fungicidas e inseticidas, e a maioria das combinações indicadas para

o tratamento de sementes reduz a nodulação e a FBN (Hungria et al., 2007; Campo et al., 2009b).

A maior frequência de efeitos negativos do tratamento de sementes com agrotóxicos na FBN ocorre em solos de primeiro ano de cultivo com soja, ou solos não cultivados com soja há alguns anos, ou solos arenosos, que apresentam baixa população de *Bradyrhizobium* spp. Também há vários resultados indicando prejuízos à FBN por micronutrientes e outros produtos adicionados às sementes.

Para garantir melhores resultados com a inoculação e o estabelecimento da população das estirpes selecionadas pela pesquisa e utilizadas nos inoculantes, o agricultor deve evitar o tratamento de sementes com agrotóxicos, desde que: as sementes possuam altas qualidade fisiológica e sanitária, estejam livres de fitopatógenos importantes (pragas quarantenárias A2 ou pragas não quarantenárias regulamentadas), definidos e controlados pelo Certificado Fitossanitário de Origem (CFO) ou Certificado Fitossanitário de Origem Consolidado (CFOC), conforme legislação (Instrução Normativa nº 6 de 13 de março de 2000, publicada no D.O.U. no dia 05 de abril de 2000); o solo apresente boa disponibilidade hídrica e temperatura adequada para rápidas germinação e emergência.

## **Aplicação de micronutrientes**

O Co e o Mo são indispensáveis à eficiência da FBN para a maioria dos solos onde a soja vem sendo cultivada no Brasil. As indicações técnicas atuais desses micronutrientes são para aplicação de 2 g/ha a 3 g/ha de Co e 12 g/ha a 25 g de Mo/ha (Sfredo; Oliveira, 2010). A aplicação dever ser feita, preferencialmente, em pulverização foliar, nos estádios de desenvolvimento V3-V5, para evitar o contato com as bactérias nas sementes. A dose para aplicação foliar é a mesma recomendada para o uso em sementes.

## **Sementes enriquecidas em Mo**

Embora não dispense a aplicação do Co e Mo, nas sementes ou via pulverização foliar antes da floração, a utilização de sementes enriquecidas em Mo melhora a eficiência da FBN, aumentando os rendimentos da soja e o teor de proteína nos grãos (Campo et al., 2009a).

Como enriquecer as sementes com Mo: Fazer duas aplicações de 200 g/ha de Mo, de fonte solúvel em água, entre os estádios R3 e R5.4, com intervalo de, no mínimo, 10 dias.

Caso o agricultor opte por utilizar sementes enriquecidas em Mo (teor superior a 10 mg/kg), não há necessidade de aplicar Mo nas sementes, apenas foliar. Nesse caso, a dose de Mo pode ser de 10 g/ha, aplicada nos estádios V5 até R1.

### **Inoculação em áreas já cultivadas com soja**

A compilação de mais de 200 experimentos conduzidos por instituições de pesquisa nas diversas regiões produtoras do Brasil é conclusiva em apontar ganhos médios de 8% ao ano no rendimento de grãos com a inoculação anual, também denominada de reinoculação, em áreas já cultivadas com soja. Por isso, recomenda-se a inoculação em todas as safras, como uma prática de baixo custo, altamente benéfica à cultura da soja (Hungria et al., 2007; Mercante et al., 2011; Hungria; Mendes, 2015).

### **Inoculação em áreas de primeiro cultivo com soja**

Como a soja não é nativa do Brasil e a bactéria, que fixa o nitrogênio atmosférico em simbiose com a cultura não existe naturalmente nos solos brasileiros, é indispensável que se faça a inoculação da soja nessas condições, para que a planta possa obter o N que necessita. Em áreas de primeiro cultivo a dose de inoculante deve ser, no mínimo, duas vezes a recomendada para áreas já cultivadas. A utilização de agrotóxicos, micronutrientes e outros produtos aplicados às sementes deve ser feita de forma compatível com a inoculação, mas pode ser altamente prejudicial em solos de primeiro cultivo, especialmente em solos arenosos. Quanto maior o número de células viáveis nas sementes, melhores serão a nodulação e o rendimento de grãos. Nessas áreas de primeiro cultivo, o tratamento de sementes com outros produtos que não o inoculante deve ser evitado e, quando isso não for possível, deve-se optar pela inoculação no sulco, conforme especificado no item "Inoculação no sulco de semeadura". Inoculantes turfosos, em geral, fornecem maior proteção às bactérias, em especial em áreas de primeiro cultivo.

## Coinoculação com outras bactérias

Outros microrganismos vêm sendo estudados para o uso com a cultura da soja e podem resultar em ganhos de rendimento. Um primeiro registro foi concedido ao uso de *Azospirillum brasilense*, uma bactéria promotora do crescimento de plantas, para ser inoculada juntamente com *Bradyrhizobium*. Ganhos expressivos de rendimento de grãos da soja (em média 16%) foram obtidos pela coinoculação de *Bradyrhizobium* com *Azospirillum* (Hungria et al., 2013, 2015b; Nogueira et al., 2018). Também se tem observado que a coinoculação resulta em precocidade de nodulação (Chibeba et al., 2015). Contudo, o agricultor deve usar somente inoculantes à base de *Azospirillum* que tenham registro no Mapa para uso na cultura da soja, porque a concentração de células para essa finalidade deve ter a eficiência agrônômica comprovada. Ao contrário de *Bradyrhizobium*, que em geral “quanto mais, melhor”, no caso de *Azospirillum*, um potente produtor do fitormônio ácido indol acético, a dose deve ser exatamente a recomendada, caso contrário poderá até haver inibição do crescimento da soja.

## Inoculação emergencial em caso de falta de nodulação

Em condições de campo, entre 5 e 8 dias após a emergência, já é possível observar a formação dos primeiros nódulos e, no estágio V1-V2, uma média de 4 a 8 nódulos por planta com 1 mm a 2 mm devem ser visualizados, considerando pontos representativos da lavoura. Caso o número médio de nódulos por planta seja inferior a 10 até o estágio V3-V4, a aplicação complementar de inoculante via pulverização, na dose equivalente a 6 milhões de células por planta (equivalente a 5 a 7 doses de inoculante por hectare, conforme a concentração do produto) e com no mínimo 200 L/ha de calda, pode recuperar parcialmente a nodulação. A aplicação do inoculante deve ser isenta de mistura com outros produtos, com jato dirigido para o solo, com solo úmido e ao final da tarde. Nesse caso, a recuperação da nodulação será apenas parcial, pois somente o contato da bactéria com as sementes no momento da semeadura permite a máxima contribuição da FBN.

## Nitrogênio mineral

Resultados obtidos em todas as regiões onde a soja é cultivada no Brasil, em mais de 200 ensaios conduzidos pela pesquisa, mostram que a aplicação de fertilizante nitrogenado reduz a nodulação e não incrementa a produtividade da soja. A aplicação é igualmente ineficaz, para aplicações feitas na semeadura ou em cobertura, em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, em sistemas de semeadura direta ou convencional, em cultivares de ciclo curto ou longo, de tipo de crescimento determinado ou indeterminado, transgênica ou não transgênica. Essa conclusão se sustenta em várias doses de fertilizante nitrogenado e em aplicações feitas na semeadura, ou posteriormente, a lanço ou pulverização, durante o florescimento até o início do enchimento de grãos, bem como no pleno enchimento de grãos (Hungria et al., 2006, 2007; Hungria; Mendes, 2015; Kaschuk et al., 2016 ; Hungria; Nogueira, 2019).

É comum o uso de fertilizantes que tragam algum conteúdo de N, como é o caso de formulações contendo fosfato monoamônio (MAP) como fonte de P. Em geral, o uso das formulações mais comuns resulta em um aporte bruto de cerca de 20 kg/ha de N, correspondente a um aporte líquido de 10 kg/ha de N, considerando que a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados é raramente superior a 50%. Esse aporte líquido equivaleria a apenas 3,6% dos 280 kg/ha de N necessários para produzir 3500 kg/ha (aproximadamente 80 kg de N para cada 1000 kg de grãos, sem considerar a eficiência de utilização do fertilizante de 50%). Embora insuficiente para o suprimento das plantas durante todo o ciclo, essa quantidade de N pode resultar em inibição da nodulação. Desse modo, o uso de fontes que carreguem N pode ser feito somente se elas forem mais econômicas que as fontes sem N e não devem ultrapassar 20 kg/ha de aporte de N, para não trazer prejuízos à nodulação.

## Referências

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. *Field Crops Research*, v. 110, n. 3, p. 219-224, 2009a.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 154-163, 2009b.

CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. In-furrow inoculation of soybeans as alternative for fungicides and micronutrients seed treatment and inoculation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1103-1112, 2010.

CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; BRITO, O. R.; ARAUJO, R. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 1641-1649, 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80 p. (Embrapa Soja. Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, J. Z.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 2006.

HUNGRIA, M.; MENDES, I. C. Nitrogen fixation with soybean: the perfect symbiosis? In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation**. v.2. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015. p. 1009-1023

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Tecnologias de inoculação da cultura da soja: Mitos, verdades e desafios. In: Boletim de Pesquisa 2019/2020. Rondonópolis: Fundação MT, 2019. p. 50-62. (Fundação MT. Boletim, 19).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Alternative methods and time for soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 2015a.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 2013.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811-817, 2015b.

KASCHUK, G.; NOGUEIRA, M. A.; DE LUCA, M. J.; HUNGRIA, M. Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. **Field Crops Research**, v. 195, p. 21-27, 2016.

MERCANTE, F. M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I. C.; REIS JUNIOR, F. B. **Estratégias para aumentar a eficiência de inoculantes microbianos na cultura da soja**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 4 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Comunicado Técnico, 169).

NOGUEIRA, M. A.; PRANDO, A. M.; OLIVEIRA, A. B.; LIMA, D.; CONTE, O.; HARGER, N.; OLIVEIRA, F. T.; HUNGRIA, M. **Ações de transferência de tecnologia em inoculação/coinoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na cultura da soja na safra 2017/18 no estado do Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 15 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 143).

SFREDO, G. J.; OLIVEIRA, M. C. N. de. **Soja: molibdênio e cobalto**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 322).

ZILLI, J. E.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; ROUWS, R. C.; HUNGRIA, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1875-1881, 2010.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. Inoculação da soja com *Bradyrhizobium* através de pulverização em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 4, p. 541-544, 2008.

