

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DE
FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

SUMAYA MÁRIO NOSOLINE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MAIO - 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

174/2016

Nosoline, Sumaya Mário

Prospecção e caracterização de rizobactérias de feijão caupi cultivado no Estado do Rio de Janeiro / Sumaya Mário Nosoline. – Campos dos Goytacazes, 2016.
xiv, 143 f. : il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Microbiologia do Solo. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Marco Antonio Martins.

Coorientador: Gustavo Ribeiro Xavier.

Coorientador: Vera Lucia Divan Baldani.

Área de concentração: Microbiologia do solo.

Bibliografia: f. 131-143.

1. *Vigna unguiculata* (L.) Walp 2. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS 3. PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Microbiologia Vegetal II. Título

CDD 633.33098153

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DE FEIJÃO-CAUPI CULTIVADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

SUMAYA MÁRIO NOSOLINE

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Orientador: Prof. Marco Antonio Martins
Coorientadores: Gustavo Ribeiro Xavier
Vera Lucia Divan Baldani

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MAIO – 2016

PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS DE FEIJÃO CAUPI CULTIVADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

SUMAYA MÁRIO NOSOLINE

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal”

Aprovada em 05 de maio de 2016

Comissão Examinadora:

Prof^a. Emanuela Forestieri da Gama-Rodrigues (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (Ph.D., Biotecnologia e Biologia Molecular) – UENF

Dr^a. Vera Lucia Divan Baldani (D.Sc., Ciência do Solo) – EMBRAPA-CNPAB

Prof. Marco Antonio Martins (Ph.D., Microbiologia do Solo) – UENF
(Orientador)

"Procuro semear otimismo e plantar sementes de paz e justiça. Digo o que penso, com esperança. Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir."

Cora Coralina

Dedico esta tese a todas as pessoas que me fizeram chegar até aqui, em especial à minha avó Isabel (in memoriam) pelo exemplo e carinho; aos meus pais Mário e Sata pelo apoio e amor; à Elvi Vasconcellos, minha mãe brasileira, por todos esses anos de convivência e por possibilitar os meus estudos; aos meus irmãos Issuf, Mário, Inês, Samir, Isabel e Adenilde pela força, amizade e carinho; e a Joaquim, companheiro de todos os momentos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por estar a me guardar e orientar em todos os momentos, mesmo nos que eu não pude ouvi-lo.

À Elvi Vasconcellos, pela dedicação, apoio, amizade e carinho prestados desde a minha chegada ao Brasil.

Aos meus pais Mário Nosoline e Sata Mamadú Cassamá, que abriram mão da convivência com as filhas para que pudéssemos adquirir estudo e formação de qualidade.

Ao meu esposo Joaquim pela compreensão, apoio incondicional, por partilhar de todos os momentos dessa trajetória e pela torcida.

À minha família guineense, em especial à minha avó Isabel (in memorian), meus irmãos Issuf, Mário, Inês, Samir, Isabel e Adenilde e sobrinhos Kaizer, Marinho, Sumaya, Braima, Samira e Sofia, fontes de inspiração para busca dos meus ideais.

Aos meus Padrinhos Edson, Mônica e Zezinho e aos amigos João e Elizete pelo carinho, e amizade.

À família Bona (Renata, Fernanda, Vera e Ivan), pela acolhida, carinho e amizade.

A Ahmed, Nieta, Rafael e Alzira pelo carinho e amizade.

A todos os meus amigos, em especial à Maria Carolina, Raquel, Lívia, Helen, Amanda, Andréa, Denise e Cida que, apesar da distância, sempre mantiveram amizade, apoio e carinho por mim.

À família F1-19/F2-110, Fabiana, Itaynara, Selma, Idalina, Mara, Dalila, Laura, Pamela, Sue Ellen, Karina e Aline por todos os anos de convivência, pela amizade, carinho, momentos felizes e agradáveis que passamos.

Aos meus orientadores Dr. Marco Antonio Martins, Dr. Gustavo R. Xavier e Dra Vera Lucia Divan Baldani pelo incentivo, sugestões e dedicação. Muito obrigada.

Aos pesquisadores Márcia Reed, Janaina Ribeiro, Luc Rouws e Jerri Zilli, pelas orientações e atenção.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia do solo-LSOL Andréia, Fernando, Késsia, Leticia, Vanessa, Heloísa e Rafael pela convivência, aprendizagem e apoio.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Ecologia Microbiana, em especial a João Luiz, Karine e Alexandre pela colaboração em todos os momentos, à Fernanda, Daniele, Jaqueline e Vinicio por proporcionarem sempre excelentes momentos durante a execução dos trabalhos, pelo apoio e colaboração.

À Lucianne Paes pela colaboração e apoio nas análises de proteína.

À Fernanda Santana de Paulo, amiga mais que especial, companheira de todos os momentos, experimentos, alegrias e sofrimentos. Obrigada por partilhar das minhas conquistas e pelas palavras de apoio.

Aos companheiros do laboratório de gramíneas, em especial à Camila Feder, Silvana, Lúcio e Wilson, muitíssimo obrigada por serem tão solícitos em todos os momentos durante os trabalhos e análises.

Ao agrônomo da Emater-Magé, Edson, por toda a colaboração e seleção das áreas de coleta.

Aos produtores Alcenir, Roberto, João Carlos e Jailson pelas recepções em suas propriedades e por permitirem a coleta das amostras dos solos nas mesmas.

À Mayan Blanc, minha parceira, que trabalhou comigo durante todas as atividades experimentais e me acalmou nos momentos de desespero e ansiedade.

Aos Pós-doutorandos Gabriela, Cleiton e Patrícia pelas orientações e ajudas no desenvolvimento de algumas análises.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, em especial à Thalles, Pollyanna, Gláucia, Gerbeli, Tarciana, e Lígia pelo carinho, momentos de descontração e convivência harmoniosa.

À UENF e ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela capacitação e formação, em especial à professora Emanuela F. da Gama-Rodrigues, Marta Simone Mendonça Freitas e Luciana Aparecida Rodrigues, obrigada pela valiosa contribuição e sugestões no projeto de pesquisa e aos funcionários Patrícia e Fatinha pela colaboração e atenção.

Aos colegas de trabalho do NAL-UFF, em especial ao Renato, Valeria, Tarcisio e Cristina pela compreensão, apoio e incentivo durante esses anos de estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa.

À Embrapa Agrobiologia pelo apoio e infraestrutura recebidos para realização desse trabalho.

Aos funcionários Ernani, Andréia Loviane, Damaris, Claudinho, Marildo, Rosinaldo e Roberto, obrigada por serem tão solícitos e pela colaboração nos trabalhos.

A todos aqueles que direta e indiretamente, contribuíram para a execução do presente trabalho sem cujas colaborações o objetivo não teria sido alcançado.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
2-REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1- A cultura do feijão-caupi.....	4
2.2- Promoção de crescimento Vegetal.....	8
2.3- Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs).....	11
2.4- O gênero <i>Azospirillum</i>	14
2.5- Rizóbio e a Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas.....	18
2.6- Interação entre microrganismos.....	22
3- TRABALHOS.....	25
3-1-Interação entre estirpes de <i>bradyrhizobium</i> sp. e <i>azospirillum</i> sp. na promoção de crescimento vegetal de feijão-caupi.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT	27
1-INTRODUÇÃO.....	29
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1- Condições experimentais.....	30
2.2- Preparo dos inóculos bacterianos.....	31
2.3- Procedimentos experimentais e tratamentos	33
2.4- Irrigação e nutrição das plantas.....	34
2.5- Coletas, Amostragem e Análises do Material Vegetal	34
2.6- Análise estatística.....	35
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4 CONCLUSÕES.....	43
5 REFERÊNCIAS.....	44
3-2- Prospecção e caracterização de bactérias associadas à rizosfera e raiz de feijão-caupi.....	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1-INTRODUÇÃO.....	51
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1- Amostragem e coleta do material.....	53
2.2- Obtenção e isolamento das rizobactérias.....	54

2.2.1- Ensaio em casa de vegetação.....	54
2.2.2- Isolamento de bactérias de raiz e rizosfera de feijão-caupi	55
2.3- Caracterização morfocultural das rizobactérias.....	56
2.4- Caracterização fisiológica das rizobactérias.....	57
2.4.1- Determinação colorimétrica da produção de ácido indol-acético (AIA).....	57
2.4.2- Produção de sideróforos.....	58
2.4.3- Solubilização de fosfato.....	59
2.4.4- Atividade da nitrogenase	60
2.4.5- Reação de Gram.....	60
2.5- Caracterização Molecular das rizobactérias.....	60
2.5.1- Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rDNA	60
2.5.2- Sequenciamento do gene 16S rDNA.....	61
3-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
3.1.- Número Mais Provável (NMP).....	62
3.2- Caracterização morfocultural dos isolados.....	64
3.3- Caracterização Fisiológica.....	67
3.3.1- Determinação colorimétrica da produção de ácido indol-acético (AIA).....	67
3.3.2- Produção de sideróforos.....	70
3.3.3- Atividade de redução de acetileno (ARA).....	73
3.3.4- Solubilização de fosfato.....	74
3.3.5- Caracterização Molecular.....	76
4-CONCLUSÕES.....	80
5-REFERÊNCIAS.....	80
3-3- Prospecção e caracterização de bactérias de nódulos de feijão-caupi..	87
RESUMO	87
ABSTRACT	88
1-INTRODUÇÃO.....	90
2- MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1- Amostragem e coleta do material.....	92
2.2- Obtenção e isolamento das rizobactérias.....	93
2.2.1- Ensaio em casa de vegetação.....	93
2.2.2- Isolamento de bactérias de nódulos de feijão-caupi	94
2.3- Atividade da nitrogenase.....	94
2.4- Caracterização morfocultural dos isolados.....	95
2.5- Caracterização fisiológica dos isolados.....	96
2.5.1- Fontes de carbono.....	96
2.5.2- Concentrações de NaCl.....	96
2.5.3- Incubação em diferentes temperaturas.....	97
2.5.4- Incubação em diferentes pH.....	97
2.6- Caracterização Molecular dos isolados.....	97
2.6.1- Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rDNA.....	97
2.6.2- Sequenciamento do gene 16S rDNA.....	98
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
4.1.- Número Mais Provável em Plantas (NMPP).....	98
4.2- Atividade da nitrogenase (ARA).....	100
4.3- Caracterização morfocultural dos isolados.....	102
4.4- Caracterização Fisiológica dos isolados.....	105
4.4.1- Fontes de carbono.....	105
4.4.2- Concentrações de NaCl.....	107

4.4.3- Incubação em diferentes temperaturas.....	110
4.4.4- Incubação em diferentes pH.....	112
4.5- Caracterização Molecular dos isolados.....	114
5-CONCLUSÕES.....	120
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
4-RESUMO E CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

RESUMO

NOSOLINE, Sumaya Mário. D. Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Maio de 2016; **Prospecção e caracterização de rizobactérias de feijão caupi cultivado no estado do Rio de Janeiro**; Professor Orientador Marco Antonio Martins; Co-orientadores: Gustavo Ribeiro Xavier e Vera Lucia Divan Baldani.

Devido ao alto valor nutricional de seus grãos, o feijão-caupi é uma das leguminosas mais utilizadas no Brasil, e sua inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal, além de potencial biotecnológico para o aumento da produtividade da cultura é uma alternativa para redução dos danos ambientais causados pelo uso dos fertilizantes agrícolas utilizados. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da coinoculação de plantas de feijão-caupi com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e produção de biomassa da cultura e isolar, caracterizar de forma morfo-cultural, fisiológica e genotípica as rizobactérias, principalmente as dos gêneros *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* associadas às plantas feijão-caupi. O trabalho foi dividido em duas etapas: na primeira etapa, um experimento foi realizado em casa de vegetação, em blocos casualizados com dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos consistiram da inoculação da cultivar Mauá com a estirpe SEMIA 6462 de forma individual e co-inoculada com as estirpes de *Azospirillum*. A mistura das cinco estirpes de *Bradyrhizobium* de forma individual e co-inoculadas com as estirpes de *Azospirillum*, testemunha nitrogenada (50 Kg.ha⁻¹) e testemunha absoluta (sem adubação nitrogenada e inoculação). Na segunda

etapa, para prospecção de novas rizobactérias da rizosfera, raiz e nódulos de feijão-caupi, um experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando-se solos rizosféricos de quatro propriedades no estado do Rio de Janeiro, em vasos com 4 tratamentos (2 solos de Cachoeiras de Macacu e 2 de Magé) e 12 repetições com a cultivar Mauá. Após 35 e 45 dias do plantio, amostras de raízes e rizosfera foram coletadas, respectivamente, e utilizadas para a contagem, isolamento e caracterização morfofisiológica, fisiológica e genotípica das rizobactérias. A coinoculação entre a estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 e a estirpe de *Azospirillum* BR 11001 proporcionou maior nodulação, um incremento na massa seca de nódulos e um incremento de 25% na biomassa seca, massa seca da parte aérea na cultivar Mauá. Foram obtidos 32 isolados da rizosfera e raiz de feijão-caupi que apresentaram em sua maioria borda da colônia inteira (81,25%) e coloração branca (71,87%) e produziram de 0,31 a 0,41 µg de AIA por mg ptn⁻¹. Todos os isolados foram capazes de reduzir acetileno e produzir sideróforos, porém apenas 26% apresentaram capacidade de solubilização de fosfato. Destes isolados, 20 pertenciam ao gênero *Azospirillum* spp, 6 ao gênero *Pseudomonas* spp e um isolado, identificado como *Rhizobium*. Foram obtidos 45 isolados de nódulos de feijão-caupi, todos capazes de reduzir acetileno a etileno, com crescimento rápido e em sua maioria com crescimento ácido (89%), colônias com forma circular (80%), borda inteira (80 %) e elevação plana (80%). Na caracterização fisiológica, 90% dos isolados foram capazes de crescer em meio YMA com diferentes fontes de carbono e 53% na concentração de 2% de NaCl, 64% cresceram na temperatura de 42 °C e 53% faixa de pH 4,0. Foram obtidos 19 pertencentes ao gênero *Bacillus*, 7 ao gênero *Rhizobium*, 4 ao *Bradyrhizobium* e 4 *Paenibacillus*. Foi possível observar efeito significativo da coinoculação entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e biomassa de feijão-caupi. As bactérias associadas às raízes e rizosfera feijão-caupi apresentaram mecanismos de promoção de crescimento vegetal relacionados à produção de sideróforos, AIA, solubilização de fosfato e redução de acetileno, sendo a maioria pertencente ao gênero *Azospirillum* spp. Da mesma forma, um número considerável de isolados de nódulos foram capazes de crescer em meio de cultivo com diferentes fontes de carbono, concentrações de NaCl, baixas faixas de pH e altas temperaturas, sendo identificados como pertencente aos gêneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus*. A caracterização morfofisiológica e

genotípica possibilitou um maior conhecimento da população de rizobactérias de feijão-caupi dos solos coletados, sendo os gêneros encontrados, potencialmente conhecidos como promotores de crescimento vegetal.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, bactérias diazotróficas, promoção de crescimento.

ABSTRACT

NOSOLINE, Sumaya Mário. D. Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; May 2016; **Prospection and characterization of cowpea rhizobacteria cultivated in the Rio de Janeiro state**; Advisor: Marco Antonio Martins; Co-Advisor: Gustavo Ribeiro Xavier e Vera Lucia Divan Baldani.

Due to the high nutritional value of the beans, cowpea is a legume most widely used in Brazil, and its inoculation with bacteria promoting plant growth, and biotechnological potential for increasing crop yield is an alternative to reducing damage the environment caused by the use of agricultural fertilizers used. This study aimed to evaluate the effect of co-inoculation of cowpea plants with bacteria of the Bradyrhizobium and Azospirillum genres in nodulation and biomass production of culture and to isolate, characterize by morphocultural form, physiological and genotypic rhizobacteria, particularly of Azospirillum and Bradyrhizobium genus associated with the cowpea plants. The work was divided into two stages, the first stage an experiment was conducted in a greenhouse, the treatments were arranged in a randomized block design with ten treatments and three replications. Five strains of Bradyrhizobium (SEMIA 6462, SEMIA 6464, SEMIA 6461, SEMIA 6463 and BR 3299) and two strains of Azospirillum brasilense (BR BR 11001 and 11005) were used. The treatments consisted of inoculation cultivar Mauá with SEMIA 6462 strain an individual shape and co-inoculated with strains of Azospirillum; the mixture of five strains of

Bradyrhizobium individually and co-inoculated with strains of Azospirillum; Nitrogen control (50 Kg.ha⁻¹) and absolute control (without fertilization nitrogen and inoculation). In the second stage, to search for new rhizobacteria, associated with the cowpea roots and nodules, soils from the rhizosphere of cowpea of four different sites in the state of Rio de Janeiro were used in an experiment in vases with 4 treatments (2 soils from Cachoeiras de Macacu and 2 from Magé) and 12 repetitions conducted in greenhouse conditions, using Cowpea bean (Mauá). After 35 and 45 days of planting, roots and rhizosphere samples were collected and used for the isolation, quantification and morphocultural, physiological and genotypic characterization of diazotrophic bacteria. The co-inoculation of strains Bradyrhizobium SEMIA 6462 and Azospirillum BR 11001 provided greater nodulation, an increase in dry matter of nodules and an increase of 25% in mass shoot in cultivar Mauá. It has been obtained 32 isolates from the rhizosphere and cowpea root that had mostly colonies with whole borders (81.25%) and white color (71.87%) and produced from 0.31 to 0.41 ug indole compounds⁻¹. mg protein⁻¹. All isolates were able to reduce acetylene and produce siderophores, but only 26% had phosphate solubilization capability. Of the obtained isolates, 20 belonged to the genus Azospirillum spp, 6 to the Pseudomonas genus and one isolate identified as Rhizobium. It has been obtained 45 isolated from cowpea nodules, all were able to reduce acetylene to ethylene, with rapid growth and mostly acid growth (89%), colonies with circular shape (80%), whole edge (80%) and flat elevation (80%). In physiological characterization, 90% of the isolates were able to grow in YMA medium with different sources of carbon and 53% at a concentration of 2% NaCl, 64% grew in temperuta 42 ° C and 53% range pH 4.0. Of the obtained isolates, 19 belonged to the genus *Bacillus*, 7 to the *Rhizobium*, 4 to the *Bradyrhizobium*. and 4 to the *Paenibacillus*. It was observed significant effect of co-inoculation of the strains and Azospirillum on nodulation and biomass of cowpea. Bacteria associated with the cowpea roots and rhizosphere showed plant growth promoting mechanisms related to the production of siderophores, AIA, phosphate solubilization and acetylene reduction, most of them belonging to the genus Azospirillum spp. A considerable number of individual nodules were able to grow in culture media with different carbon sources NaCl concentrations, low pH ranges and high temperatures, being identified as belonged to the genus *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Paenibacillus* . The Morphophysiological and

genotypic characterization has enabled a better understanding of the population of rhizobacteria cowpea the collected soil, and the genres found potentially known as plant growth promoters.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, diazotrophic bacteria, growth promotion.

1-INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), leguminosa originária do continente africano, é amplamente utilizado em várias regiões brasileiras devido ao alto valor alimentar dos seus grãos, sendo considerado fonte de proteína vegetal, ferro, zinco, carboidratos, vitaminas e aminoácidos, constituindo-se em um importante componente da dieta alimentar das populações de menor poder aquisitivo (Freire Filho, 1988; Grangeiro et al., 2005; Filgueiras et al., 2009) e uma espécie de grande valor estratégico para as regiões produtoras (Freire Filho et al., 2011).

É amplamente cultivado em todas as regiões brasileiras, sendo que no estado do Rio de Janeiro a cultura do feijão-caupi vem crescendo, principalmente, em áreas rurais relativamente próximas aos grandes centros urbanos, onde se concentram populações de origem nordestina, o que representa uma considerável demanda pelo consumo do produto (Guedes, 2008).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de feijão-caupi, com uma produtividade média nacional variando em torno de 300 a 5600 kg ha⁻¹ (Conab, 2016). Esses valores, porém, são considerados abaixo da capacidade produtiva da cultura (Freire Filho et al. 2005; Freire filho et al., 2011), sendo decorrente, principalmente pelo baixo aporte tecnológico da maioria dos produtores, problemas no preparo e manejo da fertilidade do solo, controle fitopatológico da cultura, dentre outros (Filgueiras et al., 2009).

Uma das alternativas utilizadas para o aumento da produtividade do feijão-caupi é a inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* sp eficientes no processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Nesta simbiose, a cultura é

suprida com nitrogênio (N), nutriente que frequentemente limita a produção, podendo dispensar fontes minerais, além de possibilitar atingir níveis altos de produção de grãos (Rumjanek et al., 2005; Zilli et al., 2009).

A utilização de estirpes de *Bradyrhizobium* também possui potencial biotecnológico para minimizar o custo da produção, através da redução do uso de fertilizantes nitrogenados, trazendo benefícios para o meio ambiente, como também propiciar aumentos na fertilidade e na matéria orgânica do solo (Gualter, 2010), com a possibilidade da adubação verde com a cultura.

Além das estirpes do grupo rizóbio, outras bactérias podem trazer grandes benefícios às leguminosas. Conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), estas bactérias, que crescem próximo às raízes e são estimuladas pelos exsudatos radiculares, têm a capacidade de promover o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos quando inoculadas nas sementes ou no solo, exercendo um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das plantas (Cattelan, 1999; Dobbelaere et al, 2003).

As RPCPs podem apresentar mecanismos de ação direta e indireta sobre as plantas. A ação direta no crescimento vegetal pelas rizobactérias ocorre tanto através de substâncias sintetizadas pelas mesmas, quanto pela facilitação da absorção de certos nutrientes do ambiente pela planta. Por outro lado, a ação indireta ocorre quando estas diminuem ou previnem os efeitos deletérios de um ou mais microrganismos fitopatogênicos (Cattelan e Hartel, 2000; Nelson, 2004; Ahmad et al., 2008).

Dentre as RPCPs se destaca o gênero *Azospirillum*, cuja habilidade e capacidade de biossíntese de fitohormônios, têm sido relatadas em diversos estudos (Baldani e Baldani, 2005; Hungria, 2011; Yadegari et al., 2010). Nestes, foram constatados, dentre outros mecanismos, o crescimento radicular e a solubilização de fosfatos minerais, aumentando a eficiência na utilização desses fertilizantes, bem como o rendimento das culturas, reduzindo custos com insumos e processos contrários à sustentabilidade ambiental (Bergamaschi, 2006; Moreira et al., 2010).

Diversos estudos têm relatado resultados promissores com a coinoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* com bactérias do grupo *Rhizobium* em leguminosas como a soja (Hungria et al., 2013) e o feijão comum (Remans et al., 2007; Remans et al., 2008a), com ganhos na nodulação,

produção de biomassa da parte aérea e da raiz e, conseqüentemente, na produtividade das culturas. São, porém, escassos os trabalhos sobre a coinoculação com *Azospirillum* spp. em feijão-caupi.

O isolamento e a seleção de novas estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio e RPCPs em feijão-caupi é importante para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos como substituto parcial ou total da adubação com nitrogênio mineral. Em adição ao seu isolamento e seleção para FBN, outras capacidades bioquímicas destas estirpes são também de interesse, tais como a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos insolúveis (Marra et al.,2012), produção de compostos indólicos e sideróforos.

Neste contexto, as hipóteses testadas neste estudo foram: (i) a coinoculação de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* pode favorecer o crescimento de plantas de feijão-caupi; (ii) plantas de feijão-caupi cultivadas em solos de regiões produtoras do estado do Rio de Janeiro se associam com bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Bradyrhizobium*; (iii) bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*, isoladas de rizosfera e raiz de feijão-caupi, apresentam mecanismos promotores de crescimento vegetal.

Para testar as hipóteses levantadas, o objetivo geral da tese foi de estudar, de forma morfo-cultural, fisiológica e molecular, bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* associadas à rizosfera e raiz de feijão-caupi cultivado no estado do Rio de Janeiro. Sendo os objetivos específicos: (i) avaliar a interação entre estirpes de *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* no desenvolvimento de feijão-caupi; (ii) isolar e caracterizar bactérias do gênero *Azospirillum*, presentes na rizosfera de feijão-caupi cultivado em solos de regiões produtoras de feijão-caupi no Estado do Rio de Janeiro; (iii) isolar e caracterizar bactérias do gênero *Bradyrhizobium* de nódulo de feijão caupi, cultivado em solos de regiões produtoras de feijão-caupi no Estado do Rio de Janeiro; (iv) identificar as rizobactérias de feijão-caupi por meio do sequenciamento parcial do 16S rDNA;

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1- A cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), leguminosa originária do continente africano, mais precisamente na Nigéria, foi introduzido na América Latina no século XVI pelos colonizadores espanhóis e portugueses. No Brasil, a introdução provavelmente se deu no estado da Bahia e a partir deste, o feijão-caupi foi levado pelos colonizadores para outras áreas da região Nordeste e para as outras regiões do país (Freire Filho, 1988).

No Brasil, o feijão-caupi é também conhecido como feijão-macáassar ou macassa e feijão-de-corda na região Nordeste; feijão-da-colônia, feijão-da-praia e feijão-de-estrada na região Norte; feijão-miúdo na região Sul; feijão-catador e feijão-gurutuba em algumas regiões da Bahia e norte de Minas Gerais, e feijão-fradinho nos estados da Bahia e do Rio de Janeiro (Freire Filho et al., 2005; Embrapa Meio-Norte, 2015).

Por apresentar elevada capacidade de simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, o feijão-caupi, adapta-se a uma ampla faixa de clima e solo, nas mais diversas condições de cultivo (Ehlers e Hall, 1997). Além disso, essa adaptação também se dá em virtude das suas características de rusticidade e precocidade (Dantas et al., 2002) e por possuir alta tolerância ao estresse hídrico, térmico e salino (Martins et al. 1997), o que o permite ser cultivado nas diferentes condições climáticas do Brasil.

Leguminosa cujos grãos possuem alto valor alimentar, é uma das espécies de feijão com maior teor de proteínas, possuindo também carboidratos, vitaminas, aminoácidos e minerais essenciais ao organismo humano, além de

grande quantidade de fibras dietéticas. Revela-se como alternativa promissora para a produção de proteína a baixo custo e em menos de 80 dias de cultivo (Grangeiro et al., 2005; Filgueiras et al., 2009; Sinimbu, 2011).

É muito utilizado nas regiões Norte e Nordeste, onde representa uma cultura de subsistência, por ser a principal fonte de proteína vegetal, além de se constituir em uma das principais alternativas sociais e econômicas para as populações rurais, como fixadora de mão de obra (Freire Filho et al., 2005; Zilli et al., 2006).

O uso do feijão-caupi para produção de grãos tem aumentado nos últimos anos devido ao consumo na forma de grãos secos, vagens ou grãos verdes como hortaliça em várias regiões do país, tornando-se excelente alternativa de comercialização para os agricultores (Nascimento et al., 2004). Além da importância alimentar humana, o caupi também pode ser utilizado como forragem verde, feno, ensilagem, farinha para alimentação animal e, ainda, na adubação verde e proteção do solo (Andrade Júnior, 2000).

Considerado uma opção de fonte de matéria orgânica, com suas raízes bem ramificadas e profundas, o feijão-caupi produz elevada quantidade de biomassa, contribuindo com um aporte de nitrogênio de até 90 kg N ha^{-1} , o que associado à simbiose com bactérias diazotróficas e a eficiência no processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN), o que permite ser introduzido em solos com baixos teores de matéria orgânica (Castro et al., 2004; Zilli et al., 2008).

A variação na produtividade média do feijão-caupi observada nas regiões produtoras, além do sistema de manejo e das tecnologias utilizadas, é também influenciada pela elevada variabilidade genética da planta, classificada desde ciclo superprecoce a tardio, sendo a maturidade fisiológica dos grãos alcançada até 60 e a partir de 91 dias após a semeadura, respectivamente (Freire Filho et al., 2005).

Na região Nordeste do Brasil, o cultivo de feijão-caupi quase sempre está associado ao sistema de produção de subsistência, em sequeiro e consórcio, com cultivos de milho e mandioca, obtendo-se uma produtividade média variando de 317 a 700 kg ha^{-1} , com aproximadamente 1,9 milhões de hectares plantados. Na região Norte, estima-se uma área plantada de 151,05 mil hectares e a produtividade média atinge 1000 kg ha^{-1} . Na região Sudeste, geralmente, o feijão-caupi é semeado em sucessão a culturas tradicionais e mais exigentes, como as

do quiabeiro e do milho, buscando aproveitar o efeito residual das adubações e podendo atingir de 300 a 1400 kg ha⁻¹ de vagens verdes, em consórcio ou solteiro, respectivamente. Entretanto, na região Centro-Oeste, especialmente no estado de Mato Grosso, a cultura está conquistando espaço e passou a ser cultivado em larga escala a partir de 2006 por médios e grandes empresários, que praticam uma lavoura altamente tecnificada sendo cultivado em grandes áreas, onde as produtividades podem ultrapassar 1.000 kg ha⁻¹ (Pinho et al., 2005; Guedes, 2008; Damasceno-Silva, 2009; Filgueiras et al., 2009; Ceccon e Matoso, 2010; Freire Filho et al., 2011).

Com a expansão do feijão-caupi para a região dos cerrados, das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, ele foi incorporado aos arranjos produtivos como safrinha após as culturas da soja e do arroz, e, em alguns locais, como cultura principal. Na região dos cerrados, principalmente quando é cultivado em forma de safrinha, o feijão-caupi tem um custo muito competitivo, fator que tem feito aumentar o interesse dos produtores pela cultura. A oferta de um produto padronizado, de alta qualidade, em quantidade e com regularidade, vem despertando o interesse de agroindústrias de outras regiões e está contribuindo para a abertura de novos mercados para a cultura (Freire Filho et al., 2011).

Apesar desse novo cenário do cultivo de feijão-caupi, a média das lavouras no Brasil está abaixo do potencial produtivo da cultura, sendo esta uma realidade comum entre todos os principais produtores da cultura mundialmente. Nesse contexto, torna-se importante a caracterização dos fatores que limitam a obtenção de elevados rendimentos de grãos do feijão-caupi nas condições de produção do Brasil e inferir sobre os mecanismos que os produtores podem lançar mão para aumentar a produtividade e, conseqüentemente, a produção das áreas de cultivo.

Dentre os fatores que afetam a produtividade do feijão-caupi, acarretando o baixo rendimento observado nas lavouras brasileiras, podem ser citados: o manejo inadequado da adubação e do preparo do solo, a salinidade de alguns solos brasileiros, as cultivares utilizadas, o espaçamento e densidade utilizados nas lavouras, o baixo uso da inoculação com bactérias diazotróficas, o déficit e o excesso hídrico e os costumes e tradições de alguns produtores.

A inoculação com bactérias diazotróficas é um fator que pode afetar positivamente a produtividade do feijão-caupi, quando bem manejada. Há duas

décadas, o processo de FBN era pouco explorado no cultivo do feijão-caupi no país, podendo-se citar como principais razões: o baixo aporte tecnológico dos principais produtores, a falta de respostas positivas dos inoculantes disponíveis no mercado e a baixa especificidade de nodulação apresentada pela cultura (Lacerda et al., 2004; Rumjanek et al., 2005; Moreira, 2005; Zilli et al., 2008; Zilli et al., 2009b).

Quatro estirpes de *Bradyrhizobium* são recomendadas atualmente pelo MAPA (MAPA, 2006) para inoculação do feijão-caupi: SEMIA 6461 (UFLA 3-84), SEMIA 6462 (BR 3267), SEMIA 6463 (INPA 03-11B) e SEMIA 6464 (BR 3262), isoladas de solos de Rondônia, semiárido Pernambucano, Amazonas e Rio de Janeiro, respectivamente (Zilli et al., 2009b).

Pesquisas têm demonstrado incrementos significativos na produtividade de cultivares de feijão-caupi inoculadas com as estirpes já recomendadas para a cultura e a estirpe BR 3299, em processo de recomendação. Gualter et al. (2011) observaram, na região da Pré-Amazônia Maranhense, que as estirpes SEMIA 6464, SEMIA 6463 e BR 3299 promoveram incrementos de 171, 354 e 500%, respectivamente, na produtividade de grãos de caupi, em comparação ao controle absoluto. Soares et al. (2006) constataram que a inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6461 e SEMIA 6463, em Perdões-MG, promoveu rendimentos de grãos semelhantes aos da testemunha nitrogenada, que recebeu uma adubação mineral de 70 kg ha⁻¹ de N-uréia. Já os resultados obtidos por Zilli et al. (2009a) em Roraima indicam que as estirpes recomendadas e a BR 3299, proporcionaram rendimento de grãos da cultura do feijão-caupi semelhantemente à dose de 80 kg ha⁻¹ de N dividido em duas aplicações.

De acordo com Franco et al. (2002), esse efeito positivo da inoculação do feijão-caupi, em diferentes regiões edafoclimáticas, mostra-se viável para o aumento da produção de grãos da cultura e capaz de substituir a adubação nitrogenada.

Apesar de os incrementos observados nas pesquisas, no Brasil o uso de inoculantes nas lavouras de feijão-caupi está na faixa de 100 mil.ha⁻¹, sendo considerado baixo em comparação com as culturas de soja (18 milhões.ha⁻¹) e feijão-comum (200 mil.ha⁻¹). De acordo com a Turfal (2008), a produção de inoculantes é distribuída em 95, 4 e 1% para soja, feijão-comum e feijão-caupi, respectivamente. Esses dados nos mostra a necessidade de aumento dessa

prática no manejo nas lavouras de feijão-caupi, em vista dos benefícios que poderá trazer não só no aumento da produtividade da cultura, mas também na redução dos gastos com os fertilizantes nitrogenados e, conseqüentemente, uma diminuição da contaminação ambiental ocasionado pelos mesmos.

2.2- Promoção de crescimento Vegetal

A agricultura convencional por muitos anos associou o desenvolvimento e a produtividade vegetal ao uso de insumos químicos. No entanto, o uso indiscriminado destes trouxe como consequência a contaminação ambiental e a degradação dos solos. Surgiu-se então a preocupação com os recursos naturais e a necessidade de uma agricultura que associe atributos biotecnológicos aos recursos da ciência moderna e que proporcione um maior equilíbrio sócioeconômico.

Alguns grupos de microrganismos do solo possuem potencial biotecnológico para uso na agricultura, por apresentarem a capacidade de estimular o crescimento das plantas e são conhecidos como rizobactérias promotoras do crescimento (RPCPs), (Kloepper e Schroth, 1978). Para o uso desse potencial biotecnológico, entretanto, é de extrema importância o conhecimento do genótipo da planta e do microrganismo envolvido na interação (Cattelan e Hartel, 2000).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) e/ou produção de fito hormônios reguladores de crescimento, mineralização e solubilização de nutrientes como o fósforo são exemplos de mecanismos diretos de promoção de crescimento (Cattelan e Hartel, 2000; Ahmad et al., 2008). E o antagonismo contra patógenos, através da produção de antibióticos e sideróforos ou resistência a drogas, exemplos de mecanismos indiretos (Cattelan e Hartel, 2000; Peixoto Neto et al., 2002; Zahir et al., 2003).

A FBN atua na promoção de crescimento vegetal por ser um processo onde o nitrogênio, nutriente que frequentemente limita a produção, pode ser suprido total ou parcialmente, favorecendo o desenvolvimento das plantas cultivadas (Hungria e Vargas, 2000). Nesta, os bacteroides obtêm fontes de carbono sintetizados pela planta na fotossíntese, e por sua vez, fixam o N₂

atmosférico, transformando-o em amônia que será utilizada pelas plantas e incorporada em compostos orgânicos (Franco e Döbereiner, 1994).

A produção de fitohormônios por microrganismos do solo, quando associados às plantas é uma outra forma de promoção de crescimento vegetal. Dentre os fitohormônios produzidos, podem ser destacados a auxina, as citocininas, a giberilina, o etileno e o ácido abscísico. Esses fitohormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas, influenciando os processos fisiológicos em baixas concentrações (Peixoto Neto et al., 2002; Dobbelaere et al. 2003).

Dentre esses reguladores de crescimento de plantas, a auxina é o mais estudado, devido à importância desse composto sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais como um todo, mas especialmente sobre o sistema radicular (Mockaitis e Estelle, 2008). O ácido indol-acético (AIA) é a principal auxina encontrada nos tecidos vegetais (Patten e Glick, 1996). Ele atua na alongação das células vegetais, principalmente no estímulo ao surgimento de raízes laterais e de pelos radiculares e que atuarão no aumento da absorção de nutrientes e da aquisição de água pela planta, favorecendo o crescimento vegetal (Cleland, 2010). Nas leguminosas, o AIA pode contribuir na transferência de sinais entre as plantas e a bactéria no estágio inicial de formação dos nódulos, e participa também na regulação de alguns genes envolvidos nessa etapa (Spaepen et al., 2009).

Em solos tropicais, onde a maior parte do fósforo mineral aplicado no solo é perdida devido a sua facilidade de formação de complexos com o ferro e o alumínio, não ficando disponíveis para o uso das plantas (Hao et al, 2002; Taíz e Zieger, 2009). Em função da baixa eficiência e do longo tempo de uso, os fertilizantes fosfatados de alta solubilidade tem sido associado à degradação ambiental. Uma possibilidade para a melhoria da eficiência desses produtos envolve a utilização de fontes de P de baixa solubilidade associadas à inoculação de bactérias que solubilizam fósforo (He e Zhu, 1998). As bactérias solubilizadoras de fosfato realizam este feito através da produção de ácidos orgânicos que quelam os cátions ligados ao fosfato liberando o P complexado com o cálcio por redução no pH e, em complexos com ferro e alumínio, por complexação dos cátions e por dissolução como resultado da troca aniônica do

fosfato pelo ânion do ácido (Khan et al., 2009; Adesemoye e Kloepper, 2009; Dias, 2011).

Além dos mecanismos de promoção de crescimento citados acima, existem outros de promoção de crescimento vegetal mais específicos, identificados em condições de estresse abióticos, excesso ou falta de água e minerais, presença de salinidade, metais pesados e contaminantes orgânicos. Nestas condições, ocorre a limitação do crescimento vegetal, levando a formação de espécies ativas de oxigênio, que comprometem a integridade das membranas celulares e levam à redução na taxa de fotossíntese líquida, encurtamento do ciclo vegetativo, dentre outros (Dias, 2011). Dentre esses mecanismos podem ser citados a ação da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase e a biossíntese de exopolissacarídeos (EOS). A ACC desaminase regula e diminui os níveis de etileno. Em condições de estresse, a ação dessa enzima na RPCP é substituída pela ação da ACC sintase, que atua na produção do etileno que é capaz de inibir o alongamento das raízes, nodulação e transporte de auxinas, além de induzir hipertrofias, senescência e abscisão de órgãos (Saleem et al., 2007; Yang et al., 2009). Os Exopolissacarídeos produzidos por algumas rizobactérias podem reduzir a perda evaporativa de água mantendo as células hidratadas, garantindo condições metabólicas adequadas durante períodos de estresse por seca e salinidade (Ashraf et al., 2004; Chang et al. 2007).

Algumas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) também controlam organismos fitopatogênicos provenientes do solo ou de sementes, especialmente fungos, através da produção de sideróforos, mecanismo indireto de promoção de crescimento vegetal que favorece o estabelecimento das populações de RPCPs nas raízes (Cattelan, 1999). Sideróforos são importantes para a competição pelos nichos rizosféricos, assumem uma dupla função na competição, complexando o Fe^{3+} disponível na rizosfera, diminuindo a sua disponibilidade e inibindo o desenvolvimento de microrganismos sensíveis à supressão ou atuarem como antibióticos, sendo, inclusive, relacionados à supressividade de solos a fungos fitopatogênicos (Neilands e Leong, 1986; Lemanceau et al., 2007).

Neste contexto, o uso dos microrganismos do solo na promoção de crescimento vegetal, além de potencial biotecnológico para o aumento da produtividade, vem como alternativa para redução dos danos ambientais

causados pelo uso dos fertilizantes agrícolas (fosfatos insolúveis e nitrogênio produzido artificialmente, além de ferro) e também no controle de fitopatógenos. Sendo, portanto, o estudo e a seleção de novas rizobactérias de suma importância para a agricultura do país.

2.3- Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs)

Na era da produção agrícola sustentável, as interações planta micróbio na rizosfera desempenham um papel crucial na transformação, mobilização, e solubilização de uma gama de nutrientes como também na absorção de nutrientes essenciais para melhor expressão do potencial genético das plantas (Hayat et al., 2010)

Bactérias que crescem próximo às raízes e que são estimuladas pelos exsudatos radiculares são conhecidas como rizobactérias. São assim denominadas por crescerem na rizosfera, zona de influência das raízes que vai desde sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm. Algumas dessas rizobactérias têm a capacidade de promover o crescimento vegetal através de diferentes mecanismos quando inoculadas nas sementes ou no solo, exercendo um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das plantas sendo, por isso, conhecidas como Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). (Cattelan, 1999; Moreira e Siqueira, 2006).

Os benefícios da colonização radicular das RPCPs são definidos por três características intrínsecas: (i) a capacidade de colonizar a raiz; (ii) a sobrevivência e multiplicação em microhabitats associados com a superfície da raiz, em concorrência com outras microbiotas, pelo menos durante o tempo necessário para expressar as atividades de promoção/fitohormônios; e (iii) a promoção do crescimento da planta (Barea et al., 2005).

O grupo das RPCPs é bastante heterogêneo, representando uma ampla variedade de bactérias de solo. De acordo com os efeitos sobre o crescimento vegetal, elas podem ser benéficas, deletérias ou neutras (Dobbelaere et al., 2003; Pereira et al., 2008). As RPCPs benéficas podem melhorar a extensão ou a qualidade do crescimento das plantas diretamente e ou indiretamente (Ahmad et al., 2008). Segundo Gray e Smith (2005), aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes são ocupadas por células microbianas dessas RPCPs.

As rizobactérias podem ser classificadas em quatro principais grupos: Diazotróficos promotoras de crescimento vegetal, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp, e Rhizobia (Dobbelaere et al.,2003; Barriuso et al., 2008). As bactérias diazotróficas são consideradas promotoras de crescimento vegetal pela sua habilidade em converter nitrogênio atmosférico em amônia, que pode ser utilizada pela planta (Dobbelaere et al., 2003).

Diversos microrganismos vêm sendo relatados como promotores de crescimento em plantas, que incluem os gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*, os quais são exclusivamente microrganismos não simbióticos (Somers e Vanderleyden, 2004). Os microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados agentes de biocontrole de doenças de plantas, o que demonstra o seu grande potencial para utilização na agricultura (Teixeira et al., 2007).

O crescimento vegetal é aumentado porque as RPCPs solubilizam fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo e produzem ou alteram a concentração de hormônios vegetais como o ácido indol acético (AIA), ácido giberélico, citocininas e etileno ou fixam nitrogênio associativamente. Elas também controlam organismos fitopatogênicos provenientes do solo ou de sementes através da produção de sideróforos, quitinases e antibióticos. Além disso, também podem apresentar efeito sinérgico com a FBN, no caso das leguminosas (Cattelan, 1999).

O aumento substancial da área radicular (comprimento das raízes e o número dos pelos radiculares), através da produção de hormônios ou reguladores de crescimento vegetais, promove uma maior eficiência na retirada de água, macro e micronutriente pelas plantas. Além disso, o efeito antagônico apresentado pelas RPCPs sobre muitos microrganismos patogênicos caracteriza-se como um eficiente controle biológico na natureza (Cattelan, 1999). Em geral, o sistema radicular das plantas inoculadas com RPCPs é bem desenvolvido, o que favorece o crescimento da parte aérea. Por outro lado, a maior abundância de raízes pode estimular as populações de rizobactérias favorecendo o estabelecimento de diversos grupos bacterianos benéficos, como as bactérias diazotróficas (Somers e Vanderleyden, 2004).

Estudos têm demonstrado efeitos positivos da inoculação de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em diversas espécies vegetais. Mello (2001), num estudo sobre o efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas, observou aumentos de 163,6%, 107,7% e 87,0%, respectivamente, para matéria seca da parte aérea, matéria seca das raízes e área foliar 30 dias após a bacterização.

Sala et al. (2005) verificaram que a inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas promoveu o crescimento e o acúmulo de N em plantas de trigo, através do aumento no comprimento de raízes significativamente maior em relação à testemunha, o que eles atribuíram ser devido a produção de fitormônios por essas bactérias. De forma semelhante, Roesch et al. (2005) observaram que as bactérias reinoculadas nas plantas de trigo promoveram o aumento no comprimento radicular das mesmas inferindo, portanto, que o aumento no comprimento das raízes observado pode ter ocorrido em consequência da produção de auxina pelos isolados testados.

Sottero et al.(2006), avaliando 64 isolados de rizobactérias do grupo fluorescente de *Pseudomonas* spp., observaram alto potencial de promoção de crescimento das plantas de alface de alguns isolados, através do aumento da massa de matéria seca da raiz e de número de folhas, apresentando além disso, colonização radicular na região do colo das plântulas e antagonismo contra *Fusarium* sp.

Freitas e Vildoso (2004), avaliando isolados bacterianos de *Pseudomonas fluorescentes*, *Bacillus* e outras bactérias rizosféricas em portaenxertos utilizados em tangerineira 'Cleópatra' (*Citrus reshni*), limoeiro 'Cravo' (*Citrus limonia*) e limoeiro 'Volcameriano' (*Citrus volkameriana*), concluíram que os mesmos podem agir como promotores do crescimento de plantas cítricas, através do incremento na matéria seca.

Dias (2011), testando uma coleção de 189 isolados bacterianos, provenientes de sistema orgânico de produção de hortaliças, para a seleção de estirpes promotoras do crescimento de couve, obteve grande maioria com perfil bioquímico idêntico a *Pseudomonas* (grupo fluorescente). Os experimentos de laboratório indicaram que, *in vitro*, 100% dos isolados formaram biofilme, 71% sintetizaram sideróforos, 31% produziram acil-lactonas homoserinas (AHLs), 95% produziram AIA e 74% solubilizaram P. No entanto, os bioensaios na casa de

vegetação evidenciaram que apenas 11% dos isolados bacterianos induziam respostas significativas de promoção do crescimento da couve.

Silva et al. (2007), avaliando o efeito de estirpes de *Paenibacillus* e *Bacillus* na simbiose do feijão-caupi com *Bradyrhizobium* sp., constataram que as RPCPs promoveram maior crescimento da raiz e aumentaram a nodulação nas plantas coinoculadas, evidenciado pela correlação positiva com o nitrogênio acumulado específico, concluindo então, que RPCPs que estimulam a nodulação podem promover uma melhor fixação de N₂ durante a simbiose do *Bradyrhizobium*-caupi.

Neste sentido, torna-se cada vez mais pertinente o conhecimento do modo de ação das RPCPs, das condições que as alteram e, especificamente, as que as favorecem. Esse conjunto de informações poderá ajudar no estabelecimento da melhor forma de utilização das RPCPs, seja pela inoculação de isolados comprovadamente benéficos, ou pelo manejo das condições do meio para favorecer sua atuação (Freitas e Vildoso, 2004).

Considerando todos os fatores conhecidos que estão envolvidos na atividade das RPCPs, é comum se encontrar uma variabilidade de respostas à inoculação com estirpes promissoras. Esse é um tópico que precisa ser melhor investigado visando o desenvolvimento de tecnologias que aproveitem as características vantajosas encontradas nesses recursos biológicos que podem contribuir para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (Dias, 2011).

2.4- O gênero *Azospirillum*

Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procaríotos que possuem um complexo enzimático, denominado nitrogenase, consegue converter ou reduzir enzimaticamente o N₂ atmosférico em amônia (NH₄), uma forma que pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação do nitrogênio à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (Freire, 1992; Marin et al., 1999).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), os diazotróficos compreendem ampla gama de microrganismos procaríotos, incluindo representantes de arqueobactérias, cianobactérias, bactérias gram-positivas e gram-negativas que apresentam grande diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética, o que lhes

garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste, nos mais diferentes habitats terrestres. De acordo com Evans e Burris (1992), as bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser caracterizadas em três grupos, levando-se em conta a finalidade de uso do N fixado e o tipo de simbiose que desenvolvem com os vegetais: a) diazotróficos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; b) diazotróficos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e c) os diazotróficos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Segundo Olivares et al. (1997), os diazotróficos associativos por colonizarem o interior das plantas podem ter uma vantagem em relação aos diazotróficos de vida livre em relação à utilização de substratos, uma vez que as fontes de carbono estarão mais prontamente disponíveis, haverá uma diminuição na competição com as demais bactérias da rizosfera. E considerando a alta sensibilidade da enzima nitrogenase ao oxigênio, a colonização no interior dos tecidos possibilita o controle das concentrações de oxigênio. Contudo, de acordo com Hungria (2011), ao contrário das bactérias simbióticas, bactérias associativas excretam somente uma parte do nitrogênio fixado diretamente para a planta associada. Posteriormente, a mineralização das bactérias pode contribuir com aportes adicionais de nitrogênio para as plantas, contudo, é importante salientar que o processo de fixação biológica por essas bactérias consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas.

O grupo de diazotróficos associativos é bem diverso e de acordo com Baldani et al. (1997), este ainda pode ser dividido em endofíticos facultativos, que podem colonizar tanto a rizosfera como o interior das raízes, e os endofíticos obrigatórios, que colonizam o interior das raízes. Entre os diazotróficos endofíticos obrigatórios estão os gêneros *Acetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Já como grupo predominante nos diazotrofos endofíticos pode ser citado o gênero *Azospirillum* (Marin et al., 1999).

A pesquisa sobre fixadores de N₂ associativos no Brasil só foi intensificada a partir da descoberta de novas espécies de *Azospirillum* por Döbereiner e Day (1975), que coincidiu com a chamada “crise do petróleo”,

despertando o interesse por alternativas biológicas aos fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura. De acordo com Döbereiner e Baldani (1982), essa descoberta também aumentou o interesse na associação dos diazotróficos com gramíneas.

As espécies do gênero de *Azospirillum* foram isoladas somente após o desenvolvimento do meio semissólido, isento de N, que também foi relevante para o isolamento de outras bactérias diazotróficas com caráter microaerofílico. Os endofíticos facultativos apresentam o crescimento dependente de fixação de N₂, que ocorre em regiões do meio de cultura onde a taxa de difusão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias. Nesse crescimento é formada uma película delgada, em forma de véu, abaixo da superfície do meio de cultura, onde a concentração de oxigênio permite a fixação de nitrogênio para iniciar seu crescimento. Essa película posteriormente vai se movimentando até a superfície à medida que as bactérias vão utilizando o oxigênio do meio de cultura, graças ao fenômeno de aerotaxia, formando um ambiente microaerófilo através do equilíbrio entre as taxas de difusão do oxigênio e de respiração das bactérias (Döbereiner et al., 1995).

Como principais características das bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* se destacam os movimentos em espiral e os grânulos intracelulares de poli-hidroxibutirato. Além disso, são Gram negativas e medem de 0,8 a 1 µm de diâmetro e 2 a 4 µm de comprimento (Döbereiner et al., 1995). Elas apresentam uma distribuição ecológica ampla, e estirpes têm sido encontradas em associação com monocotiledôneas como milho (Hungria et al., 2010), cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2002), arroz (Rodrigues et al., 2008) e trigo (Baldani et al., 1983; Díaz-Zorita e Fernández-Canigia, 2009) e com dicotiledôneas como a soja (Hungria et al., 2013) e o feijão comum (Remans et al. 2008b), garantindo aumento de 5 a 30% na produção.

Desde a sua definição por Tarrand et al. em 1978, novas descobertas foram feitas, e atualmente o gênero *Azospirillum* possui quatorze espécies identificadas: *A. brasilense*; *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largomobile* e *A. dobereineriae*. *A. oryzae*; *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zae*, *A. rugosum*, *A. picis*, e *A. Thiophilum* (Hungria, 2011). Essas descobertas acompanharam a evolução da taxonomia de bactérias que tem sido fortemente influenciada pelo surgimento de novas técnicas.

Pesquisas têm identificado a habilidade dessas espécies para a biossíntese de fitohormônios (ácido indol-acético, ácido giberélico, etileno e citocininas) o que lhes confere a capacidade de promoção de crescimento vegetal, através da alteração morfológica na raiz, além de solubilização de fosfatos minerais, aumentando a eficiência na utilização desses como adubos, bem como o rendimento das culturas, reduzindo custos com insumos e processos contrários à sustentabilidade ambiental (Broek e Vanderleyden, 1995; Hassan et al., 1998; Bergamaschi, 2006; Moreira et al., 2010).

Perin et al. (2003), avaliando a capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz, observaram que as bactérias inoculadas promoveram aumento de massa radicular de milho quando comparada à testemunha não inoculada aos 6 dias após a inoculação, com aumentos variando entre 195 e 252%. E as estirpes, isolados ou em mistura, promoveram crescimento da parte aérea, com destaque maior para o inóculo misto.

Gitti et al. (2012), num estudo para avaliação do desenvolvimento, componentes de produção e produtividade de grãos de feijões na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum brasiliense* (estirpe AbV5 e AbV6), concluíram que na ausência do fornecimento de nitrogênio em cobertura a inoculação de sementes com *Azospirillum brasiliense* proporcionou maior teor de nitrogênio foliar. Porém, a inoculação não influenciou significativamente o desenvolvimento de plantas, componentes de produção e produtividade de grãos dos feijões avaliados. Sendo os maiores valores nessas características avaliadas obtidas com o fornecimento de 60 kg de nitrogênio em cobertura.

Mello (2012), avaliando a contribuição da inoculação de *Azospirillum* sp. no rendimento de grãos e componentes do rendimento das culturas de milho e trigo, em associação com doses de nitrogênio em cobertura, observou que a inoculação das estirpes de *Azospirillum brasiliense* em sementes não influenciam no rendimento de grãos e nos componentes do rendimento de milho. Porém, para o trigo houve efeito da interação da inoculação e doses de N na variável clorofila (safra 2011), peso do hectolitro (safra 2010 e 2011) e rendimento de grãos de trigo na safra 2010.

Desta forma, o uso de bactérias do gênero *Azospirillum* presentes na rizosfera e tecidos das plantas possui potencial biotecnológico para a agricultura.

Porém, as variações nas respostas de inoculação indicam a necessidade da continuação dos estudos relacionados ao uso das mesmas. Nesse mesmo contexto, a inoculação combinada entre estirpes de *Azospirillum* e de rizóbios é uma alternativa para a maximização do processo de fixação de N e elucidar o papel dessas interações.

2.5- Rizóbio e a Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas

O Nitrogênio (N) é um nutriente necessário para a síntese celular de enzimas, proteínas, clorofila, DNA e RNA, sendo importante no crescimento das plantas e produção de alimentos (Hayat et al., 2010). Porém, apesar de abundante na atmosfera terrestre, constituindo aproximadamente 78% desta, o N não se encontra numa forma assimilável pelas plantas, sendo então necessário seu fornecimento através da fixação industrial (processo de Haber-Bosch, 1913), pela fixação biológica (Hellriegel e Wilfarth, 1888) ou mediante descargas elétricas na atmosfera (eletroquímica) e reações fotoquímicas (Taiz e Zeiger, 2004).

Essas formas de fixação de nitrogênio apresentam, porém, elevado custo energético. O processo de fixação industrial de N é realizada sob condições de elevadas temperaturas (cerca de 200° C) e pressão (cerca de 200 atm) e necessita da presença de um metal catalizador (geralmente o Fe), para a combinação do N₂ com o H formando amônia (NH₃), o que faz com que o fertilizante nitrogenado tenha um preço elevado. Na fixação atmosférica através de relâmpagos, há a conversão do vapor de água e O₂ em radicais hidroxilas livres, altamente reativos, em átomos de H livre e em átomos de oxigênio livre, que atacam o N₂ para formar o ácido nítrico (HNO₃) que se precipita sobre a terra juntamente com a chuva (Taiz e Zeiger, 2004; Cordeiro, 2004). Já a fixação biológica, é um processo altamente endergônico que demanda fontes de elétrons, prótons e de ATPs produzidos pelos vegetais via fotossíntese, são utilizados por procariotos denominados diazotróficos para quebrar a tripla ligação do N₂ e convertê-lo em amônio (NH₄⁺) e utilizá-lo como fonte de proteína (Sprent e Raven, 1985; Vessey et al., 2004; Moreira e Siqueira, 2006).

Para o aumento da produtividade das culturas de interesse econômico, na agricultura convencional, é marcante o intenso uso dos fertilizantes nitrogenados. E devido a alta mobilidade do N no solo, associada à erosão e lixiviação, menos

de 50% do N mineral aplicado é absorvido pelas plantas (Duque et al., 1985), caracterizando um suprimento insatisfatório para estas, além de contaminação do lençol freático e favorecimento do aquecimento global pela queima de derivados de petróleo (Hardy, 1993).

Desta forma, a FBN é um processo chave e crítico do manejo sustentável dos solos tropicais, onde o nitrogênio, nutriente que frequentemente limita a produção, pode ser suprido total ou parcialmente, favorecendo o desenvolvimento das plantas cultivadas (Franco e Döbereiner, 1994; Hungria e Vargas, 2000). A FBN é considerada, após a fotossíntese, a mais importante atividade desenvolvida nos sistemas biológicos (Unkovich et al., 2008).

De acordo com Döbereiner (1984), a FBN juntamente com a fotossíntese, representam os processos básicos, responsáveis pela manutenção da vida na terra, porque são eles que reciclam o nitrogênio e o carbono da atmosfera para a terra. Peoples e Craswell (1992) relatam que em média, a contribuição relativa de sistemas fixadores de nitrogênio simbióticos, associativos e de vida livre, é da ordem de 70% simbióticos e 30% não simbióticos.

Dentre as simbioses de diazotróficos com plantas, as de bactérias que nodulam leguminosas, “rizóbios”, se destacam por sua importância ecológica, que está relacionada à sua ampla distribuição geográfica, como também econômica, já que ocorre uma maior eficiência do processo de FBN decorrente de uma parceria vegetal mais evoluída entre a planta e o microrganismo (Moreira, 2008).

De acordo com Zhang et al. (2007), as espécies hospedeiras são um dos fatores mais importantes para efeito da distribuição da população indígena de rizóbios. A presença da leguminosa proporciona condições ecológicas específicas para selecionar estirpes com alta capacidade de adaptação para a planta hospedeira, de forma que adquiram alta competitividade e se estabeleçam com sucesso.

O grupo do rizóbio é constituído por bactérias pertencentes à ordem Rhizobiales e filo α -proteobactérias. São gram-negativas, aeróbicas obrigatórias e não esporulantes. Caracterizam-se pela formação de estruturas hipertróficas, nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos. (Zakhia e Lajudie, 2001; Sawada et al., 2003). Essas bactérias podem ser isoladas em vários meios de cultivo, devido à capacidade de utilizar várias fontes de carboidratos, produzindo polissacarídeos extracelulares (Moreira e Siqueira, 2006). A

classificação dos microrganismos dessa ordem vem sendo modificada, com o surgimento de novos gêneros e descrição das espécies com base nas características morfoculturais, fisiológicas e genotípicas (Wang et al., 2001). O grupo compreende dez gêneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Shinella*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Mesorhizobium* e *Phyllobacterium*, distribuídos em cinco famílias: Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Brucellaceae e Phyllobacteriaceae (Gualter, 2010).

Para a formação dos nódulos, estrutura que caracteriza o grupo rizóbio, na simbiose com leguminosas, o rizóbio se estabelece ao nível do córtex da raiz ou nos sítios de nodulação do caule e os flavonoides produzidos pela planta induzem a transcrição dos genes *nod* bacteriano, desencadeando uma série de processos que levam à formação de nódulos e à fixação biológica. Os bacteroides obtêm fontes de carbono sintetizados pela planta na fotossíntese, e por sua vez, fixam o N₂ atmosférico, transformando-o em amônia que será utilizada pelas plantas e incorporada em compostos orgânicos (Tsien et al., 1983; Freire, 1992; Moat et al., 2002; Cordeiro, 2004).

De acordo com Freiberg et al. (1997), em leguminosas, o estabelecimento da nodulação envolve diferentes mecanismos, como o reconhecimento molecular entre a planta e rizóbio, a formação do cordão de infecção e invasão dos rizóbios, a formação dos nódulos, a conversão de bactérias em bacterióides e o estabelecimento da fixação biológica de nitrogênio. Segundo Lima (2009), dentre essas etapas, o reconhecimento molecular entre rizóbios e plantas hospedeiras é um passo crítico para determinar a faixa hospedeira de rizóbios.

Nessa simbiose, realmente mutualística, a genética e fisiologia de planta e bactéria são integrados de tal maneira que os dois aparentam funcionar quase como um único microrganismo e para que seja bem sucedida é necessário a capacidade do microsimbionte infectar e colonizar os órgãos da planta hospedeira e esta fornecer a ele nutrientes e energia que serão utilizados na transferência do N fixado, além da capacidade de ambos regularem o fluxo de O₂ (Vessey et al., 2005).

Porém, a FBN não é um processo realizado constantemente pelos organismos fixadores, ocorrendo apenas quando for insuficiente a concentração

de nitrogênio fixado, pois o gasto energético é alto, e quando a concentração de O_2 for baixa, pois este pode inativar a enzima nitrogenase (Hoffmann, 2007).

Por ser o processo de fixação estritamente anaeróbico, os diazotróficos aeróbicos desenvolveram vários mecanismos para proteger a nitrogenase da interferência do oxigênio, dentre eles: barreira à difusão, consumo do oxigênio excedente, produção de polissacarídeos extracelulares, produção de leg-hemoglobina e nódulos em leguminosas (Cordeiro, 2004; Moreira e Siqueira, 2006), vesículas em não leguminosas e heterocistos nas cianobactérias (Yates et al., 1997).

Vários fatores podem interferir na simbiose Rizóbio x Leguminosas, classificados em químicos, biológicos e físicos, e que irão limitar o estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento desta (Moreira e Siqueira, 2006). Entre estes, podem ser citados o baixo pH (Giller e Wilson, 1993), temperaturas altas (Day et al., 1978; Lie, 1981), umidade do solo (Sprent, 1971), elevados níveis de nitrogênio (Hungria, 1994), competição com as bactérias nativas do solo (Medeiros et al., 2009) e inibição por antibióticos produzidos por outros microrganismos do solo (Pereira et al., 1999).

Segundo Moreira e Siqueira (2006), estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) nativas e ineficientes podem competir com as eficientes, introduzidas através da inoculação, por sítios de infecção na planta hospedeira, uma vez que numa mesma planta podem ocorrer nódulos formados por diferentes estirpes e até mesmo por diferentes espécies. Por outro lado, de acordo com Medeiros et al. (2009), a diversidade de rizóbios nativos é de suma importância, sendo uma fonte de recursos genéticos para prospecção e seleções de isolados adaptados às diversas condições apesar de a competitividade de sítios de nodulação, interferir na ocupação nodular das estirpes inoculadas.

Além da competição com as bactérias nativas do solo, o excesso de nitrogênio mineral também reduz, drasticamente, a nodulação das leguminosas, pois esta ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta. Na presença de N-mineral, tais demandas são reduzidas, não havendo, portanto, estímulo à nodulação (Moreira e Siqueira, 2006). De acordo com Hungria (1994) sob alta disponibilidade de N mineral no solo, há diminuição da exsudação dos flavonoides, o que leva à diminuição da nodulação.

De acordo com Hungria e Vargas (2000) nos trópicos, o pH, a alta temperatura e a umidade são as principais causas de insuficiência na nodulação, afetando todas as fases da simbiose e podem limitar o crescimento e a sobrevivência de rizóbios no solo. Eles também podem contribuir para alterações indesejáveis nos rizóbios, incluindo deleções plasmidiais, rearranjos genômicos e diversidade reduzida. A acidez afeta várias etapas no desenvolvimento da simbiose, incluindo a troca de sinais moleculares entre as leguminosas e microssimbiontes.

O processo de fixação biológica constitui a principal via de incorporação de nitrogênio ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera, principalmente, pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo. E a ação de microrganismos fixadores de nitrogênio e denitrificadores garante um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera (Marin et al., 1999), o que torna a FBN um processo chave no fornecimento de nitrogênio às plantas cultivadas, sendo importante a prospecção de bactérias que proporcionem maior eficiência nesse processo, além de estudos de especificidade genética entre estas e suas hospedeiras.

2.6- Interação entre microrganismos

O solo representa um ambiente heterogêneo que permite o desenvolvimento de grande número de microrganismos (Balota, et al., 1997). Estes microrganismos estão presentes tanto no solo como na rizosfera, não em colônias puras, mas sim, na forma de uma comunidade complexa, onde uma grande variedade de interações é desenvolvida (Dantas et al., 2009).

A comunidade microbiana é representada por populações diversificadas e numerosas em estado de equilíbrio dinâmico, refletindo o ambiente físico, químico, biológico e suas relações (Moreira e Siqueira, 2002). Essa diversidade, segundo Stamford et al. (2005), está relacionada a espécies, funções, interações, habitat, fisiologia e nutrição, entre outros aspectos.

Essas populações, microcobiota do solo, encontram-se em contínua interações entre espécies, ocorrendo condições de sinergismo, de antagonismo, de mutualismo, na maioria das vezes com parasitismo e outras vezes de saprofitismo. As condições de antagonismo geralmente ocorrem devido à competição por espaços, sítios de infecção e nutrientes do solo, por amensalismo,

através da produção de metabólitos ou microbiostáticos ou por parasitismo e predação de ambas as espécies. O sinergismo, é um efeito favorecedor da associação entre dois ou mais espécies realizando atividades metabólicas relevantes para o desenvolvimento de ambos (Stamford et al., 2005).

O sinergismo entre a microbiota do solo, principalmente envolvendo as RPCPs, pode favorecer o crescimento das plantas através de mecanismos de promoção de crescimento e controle de patógenos (Polli et al., 2012). Esse efeito tem sido objeto de vários estudos, envolvendo espécies de interesse e com potencial biotecnológico.

Nestes estudos, têm-se evidenciado que a coinoculação ou combinação de diferentes microrganismos que interagem sinergicamente melhora alguns aspectos benéficos da fisiologia de ambos, aos quais produzem um efeito sinérgico, aumentando assim, a eficiência da inoculação, além de promover maior desenvolvimento e produtividade dos vegetais a eles associados em comparação à inoculação individual de cada um (Holguin & Bashan, 1996; Bashan, 1998). Um exemplo é o favorecimento de condições mais adequadas para fixação de nitrogênio, através do fornecimento de nutrientes, remoção de produtos inibitórios e estímulo das atividades físicas ou bioquímicas (Bashan, 1998; Ferlini, 2006).

Ferlini (2006), num ensaio de coinoculação com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense* em soja, constatou que, de um modo geral, ocorre a potencialização da nodulação e maior crescimento radicular, em resposta a interação positiva entre as estirpes. Ele atribuiu o efeito benéfico da coinoculação à capacidade de rizobactérias do gênero *Azospirillum* de produzir fito-hormônios como auxina, por exemplo, que estimulam um maior desenvolvimento do sistema radicular, possibilitando a exploração de um volume mais amplo de solo e, conseqüentemente, maior obtenção de nutrientes.

Avaliando o efeito da inoculação de dois novos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas (*Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera*) e da interação destas bactérias com FMAs (*Glomus* sp. e *Acaulospora* sp) na cultura do trigo, Sala et al. (2007), observaram que as plantas associadas à *Glomus*, na presença dos isolados bacterianos, apresentaram maior crescimento, acúmulo e aproveitamento dos nutrientes do que as plantas colonizadas por *Acaulospora* sp., entretanto, não superaram os tratamentos em que as bactérias e os fungos foram inoculados isoladamente. Os mesmos concluíram, que apesar de não ter

havido efeito benéfico da coinoculação entre o FMA e a bactéria diazotrófica sobre a maioria dos parâmetros avaliados, as novas bactérias propiciaram o dobro de crescimento, acúmulo e aproveitamento do N e P nas plantas de trigo.

Silva et al. (2006), avaliando a potencialidade da colonização conjunta de *Paenibacillus* e *Bradyrhizobium* em feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) por diferentes métodos de inoculação, observaram que as estirpes de rizóbios apresentaram comportamento instável nos diferentes métodos de inoculação e que a eficiência simbiótica da colonização conjunta do sistema radicular por *Paenibacillus* e as estirpes de *Bradyrhizobium* nos diferentes métodos de inoculação apresentou-se variável.

Essas variações nas respostas obtidas nas coinoculações entre microrganismos reforçam a importância de pesquisa e ensaios que possam auxiliar na elucidação de mecanismos e as interações entre os microrganismos, vislumbrando-se a produção de inoculantes mistos, tendo em vista que eles apresentam-se como uma alternativa para maior sucesso da tecnologia de inoculação.

3-TRABALHOS

3.1- INTERAÇÃO ENTRE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* sp. E *Azospirillum* sp. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

Devido ao alto valor nutricional de seus grãos, o feijão-caupi é uma das leguminosas mais utilizadas no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da coinoculação entre estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e produção de biomassa vegetal de feijão-caupi, em condições de casa de vegetação. Os tratamentos foram dispostos em um delineamento de blocos casualizados com dez tratamentos e três repetições. Foram utilizadas cinco estirpes de *Bradyrhizobium* (SEMIA 6462, SEMIA 6464, SEMIA 6461, SEMIA 6463 e BR 3299) e duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (BR 11001 e BR 11005). Os tratamentos consistiram da inoculação da cultivar Mauá com a estirpe SEMIA 6462 de forma individual e coinoculada com as estirpes de *Azospirillum*; a mistura das cinco estirpes de *Bradyrhizobium* de forma individual e coinoculadas com as estirpes de *Azospirillum*; testemunha nitrogenada (50 Kg.ha⁻¹) e testemunha absoluta (sem adubação nitrogenada e inoculação). As variáveis

de número de nódulos frescos (NN), massa de nódulos secos (MNS), massa de raiz seca (MRS), comprimento da raiz principal (CRP), volume total de raiz (VTR), massa da parte aérea seca (MPAS) e acúmulo de N na parte aérea (QTNA) foram avaliadas aos 45 dias após a emergência (DAE). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. A inoculação mista entre a estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 e *Azospirillum* BR 11005 foi a que proporcionou maior número de nódulos na cultivar Mauá. A média de MSN variou de 18 a 141 mg planta⁻¹ e observou-se incrementos de 4 e 11% com a coinoculação da estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 com as estirpes de *Azospirillum* BR 11005 e BR 11001, respectivamente, em comparação a inoculação individual da estirpe. A coinoculação entre as estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11001 e de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 também proporcionou um incremento de 25% na MSPA em relação à inoculação individual com a estirpe de *Bradyrhizobium*. A coinoculação da estirpe BR 11005 com a estirpe SEMIA 6462 e mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* favoreceu incrementos no teor de N acumulado na parte aérea da cultivar Mauá de 14 e 45% em relação ao tratamento nitrogenado e de 45 e 85% em relação à inoculação individual com a estirpe BR 11005. A inoculação combinada da estirpe SEMIA 6462 com as estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11005 e BR 11001 favoreceu incrementos de 3 e 14%, respectivamente, na MSR da cultivar Mauá em relação à inoculação individual com a estirpe. Em relação ao VTR de feijão-caupi, não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Porém, obteve-se um incremento de 12,5% no VTR com a coinoculação da estirpe SEMIA 6462 tanto com *A. brasilense* BR 11001 quanto BR 11005. Também não se observou efeito significativo entre os tratamentos para CRP de feijão-caupi. Foi possível observar efeito significativo da coinoculação entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e biomassa de feijão-caupi.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, co-inoculação, FBN, rizobactérias

INTERACTION BETWEEN STRAINS OF *Bradyrhizobium* sp. AND *Azospirillum* sp. ON PLANT GROWTH PROMOTING IN COWPEA

ABSTRACT

Due to the high nutritional value of the beans, cowpea is the most used legumes in Brazil, mainly in the North and Northeast regions. This study aimed to evaluate the effect of co-inoculation between strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* genres in nodulation and biomass plant production of cowpea, under greenhouse conditions. The treatments were arranged in a randomized block design with ten treatments and three replications. Five strains of *Bradyrhizobium* (SEMIA 6462, SEMIA 6464, SEMIA 6461, SEMIA 6463 and BR 3299) and two strains of *Azospirillum brasilense* (BR BR 11001 and 11005) were used. The treatments consisted of inoculation cultivar Mauá with SEMIA 6462 strain individually and co-inoculated with strains of *Azospirillum*; the mixture of five strains of *Bradyrhizobium* individually and co-inoculated with strains of *Azospirillum*; Nitrogen control (50 Kg.ha⁻¹) and absolute control (without fertilization nitrogen and inoculation). The variables number of fresh nodes (NN), mass dry nodules (MNS), root dry mass (MRS), length of the main root (CRP), total volume root (VTR), mass shoot dry (SDW) and accumulation N in the shoot (QTNA) were evaluated at 45 days after emergence (DAE). Data were submitted to analysis of variance and the means compared by Scott-Knott test at 5% probability. A mixed inoculum of the strain *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 and *Azospirillum* BR 11005 was the one that provided higher number of nodules in cultivar Mauá. The average MSN ranged from 18 to 141 mg plant⁻¹ and was observed increments of 4 and 11% with the co-inoculation strain *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 with strains of *Azospirillum* BR BR 11005 and 11001, respectively, compared with individual inoculation strain.

The co-inoculation of strains *Azospirillum brasilense* BR 11001 and *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 also provided an increase of 25% in MSPA regarding individual inoculation with *Bradyrhizobium*. The co-Inoculation of BR 11005 strain with SEMIA 6462 strain and strain mixture of *Bradyrhizobium* favored increases in cumulative N content in shoot of cultivar Maua 14 and 45% relative to the nitrogen treatment and of 45 and 85% relation to individual inoculation with BR 11005. strain Inoculation of combined strain SEMIA 6462 with strains of *Azospirillum brasilense* and BR 11005 BR 11001 favored increments of 3 and 14%, respectively, in MSR cultivar Mauá in relation to individual inoculation with the strain. Regarding VTR of cowpea, there was no significant effect ($p>0.05$) between treatments. However, it was obtained an increase of 12.5% in the VTR with co-inoculation of the strain SEMIA 6462 both with *A. brasilense* BR BR 11001 as 11005. There was also not significant effect between treatments for cowpea CRP. A significant effect of co-inoculation of strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* on nodulation and biomass of cowpea was observed.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, co-inoculation, BNF, rhizobacteria

1-INTRODUÇÃO

Devido ao alto valor nutricional de seus grãos, constituído de proteínas, carboidratos, vitaminas, aminoácidos, minerais e fibras, o feijão-caupi é uma das leguminosas mais utilizadas no Brasil, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do país (Filgueiras et al., 2009). Além de a importância alimentar, o feijão-caupi também se caracteriza como potencial adubo verde (Guedes, 2008). A sua versatilidade de adaptação às diversas condições de solo e clima também vem favorecendo o seu cultivo em outras regiões do país.

A produtividade de feijão-caupi vem sendo aumentada com a inoculação com estirpes eficientes do grupo rizóbio, através do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (Zilli et al., 2008; Silva Júnior et al., 2014), contribuindo também para a diminuição dos custos de produção (Soares, 2006). Zilli et al. (2009a) relataram que a inoculação com a estirpe de *Bradyrhizobium* BR 3262 favoreceu incrementos de cerca de 30% na quantidade de grãos produzida em relação às testemunhas não inoculadas, proporcionando rendimentos de grãos superiores a 2.000 kg ha⁻¹. Essa produtividade, porém, ainda é considerada abaixo do potencial da cultura.

Uma das alternativas para o aumento da produtividade de feijão-caupi é a combinação entre as estirpes do gênero *Bradyrhizobium* e rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP), estratégia que já vem sendo adotada em algumas leguminosas de importância agrícola (Vessey, 2003; Remans et al., 2008a; Hungria et al., 2013). Esse sinergismo pode favorecer o crescimento das plantas através de mecanismos de promoção de crescimento e controle de patógenos realizados pelas rizobactérias (Polli et al., 2012).

Trabalhos têm relatado incrementos na nodulação e produção de biomassa de feijão-caupi com a inoculação mista de *Bradyrhizobium* e estirpes de *Paenibacillus* (Silva et al., 2007) e *Bacillus* (Araújo et al., 2009; Lima et al., 2011). São, porém, escassos os trabalhos envolvendo a inoculação de feijão-caupi com as rizobactérias do gênero *Azospirillum* que são reconhecidas como promotoras de crescimento vegetal pela habilidade de biossíntese de fitohormônios que contribuirão para o aumento do rendimento das culturas (Bergamaschi, 2006; Moreira et al., 2010).

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi de avaliar o efeito da coinoculação de plantas de feijão-caupi com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e produção de biomassa (parte aérea e raiz) na cultura.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Condições experimentais

O experimento foi desenvolvido em casas-de-vegetação da Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária - Embrapa Agrobiologia (CNPAB), (22° 46' S e 43° 41' O e a 33 m de altitude) no período de maio a julho de 2014.

Na inoculação das plantas de feijão-caupi foram utilizadas cinco estirpes de *Bradyrhizobium*, sendo quatro recomendadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA-2006): SEMIA 6462, SEMIA 6464, SEMIA 6461, SEMIA 6463 e uma estirpe candidata à recomendação, BR3299. As estirpes de *Azospirillum* utilizadas na inoculação foram *A. brasilense* BR 11001 e *A. brasilense* BR 11005. Todas as estirpes foram obtidas a partir do banco de germoplasma da Embrapa Agrobiologia, sendo algumas de suas características apresentadas nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Identificação e características das estirpes de rizóbio.

Estirpe	Característica cultural					Local de Origem e Referência
	TC ⁽¹⁾	D ⁽²⁾	pH ⁽³⁾	COR ⁽⁴⁾	PC ⁽⁵⁾	
SEMIA 6464	5	1	Alcalino	Branca	7	SIPA, Seropédica-RJ (Zilli et al., 1999).
SEMIA 6462	5	1-2	Ácido	Branca	5	Semi-Árido Nordestino (Martins et al., 1997).
SEMIA 6463	7	1	Alcalino	Branca	7	Amazônia, Manaus-AM (MOREIRA, 2005).
SEMIA 6461	6	1-2	Alcalino	Branca	7	Amazônia, Jí-Paraná-RO (LACERDA et al., 2004).
BR 3299	3	<0,5	Alcalino	Amarela	3	Zona da Mata, Aracaju-SE (MARTINS, 1996).

⁽¹⁾Tempo em dias de crescimento de colônias isoladas. ⁽²⁾ Diâmetro da colônia (mm). ⁽³⁾ pH do meio após cultivo. ⁽⁴⁾ Coloração das colônias. ⁽⁵⁾ Pico de crescimento em dias. (Fonte: Adaptado de GUALTER, 2010).

Tabela 2: Identificação e características das estirpes de *Azospirillum*.

Estirpe	Característica cultural				Isolamento e local de origem
	TC ⁽¹⁾	pH ⁽²⁾	CL ⁽³⁾	AT ⁽⁴⁾	
BR 11005	2-3	Alcalino	Branca	20 µg.ml ⁻¹ de spectinomicina	Raízes desenfestadas de Trigo, cultivado na região Sul do Brasil (Passo Fundo), tratadas com Cloramina-T (5 min).
BR 11001	2-3	Alcalino	Branca	15 µg.ml ⁻¹ de ácido nalidíxico e 200µ g.ml ⁻¹ de spectinomicina	Rizosfera de plantas de <i>Digitaria</i> , cultivada em campo no Rio de Janeiro.

⁽¹⁾ Tempo em dias de crescimento de colônias isoladas. ⁽²⁾ Alteração do pH meio de cultivo. ⁽³⁾ Coloração das colônias. ⁽⁴⁾ Resistência a antibiótico (Fonte: Adaptado de Baldani et al., 1986).

2.2- Preparo dos inóculos bacterianos

As estirpes de *Bradyrhizobium* foram crescidas, individualmente, em meio de cultura YM (Yeast Manitol) líquido (Vincent, 1970), com o indicador Azul de Bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH: 5 ml) e pH 6,8 (Fred e Waksman, 1928) e incubadas a 28 °C sob agitação constante de 150 rpm, respeitando-se o tempo de crescimento de cada uma. Em seguida, alíquotas de 10µl nas diluições entre 10⁻³ a 10⁻¹⁰ foram transferidas em quatro repetições, para placas de Petri contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar), composto de: manitol -10g; K₂HPO₄- sol.10%:1mL;

KH_2PO_4 -sol. 10%: 4 mL; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -sol.10%:2mL; NaCl-sol.10%: 1mL; Extrato de levedura: 0,4g; vermelho congo (0,25%); pH ajustado na faixa de 6,8 a 7,0; adicionar Agar: 15g/L. Após o surgimento das colônias, foi feita a contagem das colônias, estimando o volume do inoculante necessário para a obtenção de uma concentração da ordem 10^9 unidades formadoras de colônias por ml (UFC mL^{-1}). De posse desta informação, as estirpes foram inoculadas novamente em meio YM líquido, sem o indicador, sob agitação constante de 150 rpm a 28 °C, de um a seis dias de acordo com o tempo de crescimento de cada uma das estirpes para posterior uso na inoculação das plantas de feijão-caupi.

As estirpes de *Azospirillum* foram repicadas, separadamente, para vidros de penicilina contendo o meio NFb semi-sólido, composto por ácido málico-5g; K_2HPO_4 - sol.10%: 5mL; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - sol.10%: 2mL; NaCl-sol.10%:1mL; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - sol.1%: 2mL; Azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH: 5 mL): 2mL; FeEDTA- sol. 1,64%:4mL; Sol. de micronutrientes para meio de cultura: 2mL; Vitamina para meio de cultura: 1mL; KOH: 4,5g; com o pH ajustado para 6,5 e 1,6g.L⁻¹ de agar. As culturas foram incubadas a 30° C até observação de crescimento bacteriano pela formação de película aerotóxica típica, próxima à superfície no meio, de acordo com Döbereiner et al. (1999). Após esta etapa, parte da película foi transferida para placas de petri contendo o meio Ágar-batata, composto por batata cozida: 200 g; ácido málico: 2,5 g; açúcar cristal: 2,5 g; solução de micronutrientes: 2 ml; solução de vitaminas: 1 ml; azul de bromotimol (0,5% em 0,2N de KOH: 5 mL): 2 gotas; pH ajustado na faixa de 6,8 a 7,0 e Agar: 15g/L). As placas foram incubadas a 30° C até aparecimento de colônias e posterior preparo do inoculo (Baldani e Döbereiner, 1980). O inoculo foi preparado de acordo com Roesch et al. (2005), em que colônias puras de cada estirpe foram transferidas para o meio de cultura batata líquido, com agitação de 150 rpm, por 24h a 30°C. Após a incubação, foi determinada o número de células viáveis pelo método da diluição seriada em placas contendo meio batata sólido, para preparação de um inóculo com a concentração bacteriana de 10^9 UFC mL^{-1} .

2.3- Procedimentos experimentais e tratamentos

O experimento foi conduzido em delineamento de blocos completos ao acaso com os seguintes tratamentos:

- I- Mistura de cinco estirpes de *Bradyrhizobium*
- II- *Azospirillum brasilense* BR 11001 + mistura de 5 estirpes de *Bradyrhizobium*
- III- *Azospirillum brasilense* BR 11001 + SEMIA 6462
- IV- *Azospirillum brasilense* BR 11001
- V- SEMIA 6462
- VI- *Azospirillum brasilense* BR 11005 + mistura de cinco estirpes de *Bradyrhizobium*
- VII- *Azospirillum brasilense* BR 11005 + SEMIA 6462
- VIII- *Azospirillum brasilense* BR 11005
- IX Testemunha nitrogenada (50 Kg.ha⁻¹)
- X- Testemunha absoluta (sem adubação nitrogenada e inoculação)

Foram utilizados quatro repetições por tratamento. As parcelas experimentais foram vasos de Leonard modificados, com volume de 1 litro, tendo como substrato areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v:v) e autoclavados (Vincent, 1970).

O tratamento mistura de cinco estirpes de *Bradyrhizobium* foi definido em estudo preliminar por Silva Junior et al., (2010) em casa de vegetação, adotando-se a combinação que proporcionou maiores teores de massa da parte aérea e teor de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi .

Por ocasião do plantio, as sementes de feijão-caupi, Mauá, cultivar comercialmente utilizada nas regiões de coleta dos solos, foram imersas em álcool etílico 95% por 30 segundos para facilitar o contato do tegumento com a solução desinfetante, em seguida estas foram desinfetadas com Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30% p.a.) por três minutos e lavadas 10 vezes seguidas em água destilada estéril (Alcantara, 2011).

Foram plantadas três sementes em cada vaso e aos cinco dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por

vaso. Também foi efetuada a inoculação das plantas com as estirpes, de acordo com os tratamentos, sendo aplicado 1 mL de inoculante para cada planta. As plantas inoculadas foram cobertas com uma camada de três cm de areia esterilizada para prevenir possíveis contaminações.

2.4- Irrigação e nutrição das plantas

Foi utilizada uma solução nutritiva de Norris modificada, isenta de nitrogênio (Norris e T'mannetje, 1964), fornecida às plantas, semanalmente, colocando-se 0,25 L da solução por vaso. Sendo também adicionada água destilada esterilizada, sempre que necessário. No tratamento nitrogenado, foi adicionado $100 \text{ mg vaso}^{-1} \text{ semana}^{-1}$ de N, na forma de NH_4NO_3 , juntamente com a solução nutritiva.

2.5- Coletas, Amostragem e Análises do Material Vegetal

As plantas de feijão-caupi foram coletadas aos 45 DAE, estágio de florescimento, para análise do material vegetal. A parte aérea foi separada das raízes em corte no ponto de inserção cotiledonar, próximo à base do caule, e os nódulos foram destacados das raízes e contados. Em seguida, nódulos, raízes e parte aérea foram colocados em sacos de papel e conduzidos para secagem em estufa com circulação forçada de ar à 60-70 °C até atingir peso constante ($\pm 72\text{h}$).

Para avaliação dos tratamentos, foram determinadas as seguintes variáveis:

-Número de Nódulos frescos (NN) – determinado pela contagem dos nódulos após estes serem destacados da raiz;

-Massa de nódulos secos (MNS) – determinada pela pesagem dos nódulos após a secagem dos mesmos em estufa de circulação forçada de ar a 60-70 °C durante 72 h;

-Massa de raiz seca (MRS) – determinada pela pesagem das raízes após secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60-70 °C durante 72 h;

-Comprimento da raiz principal (CRP) – determinado pela medição da raiz principal, com o auxílio de uma régua graduada em centímetros;

-Volume de raiz (VR) – determinado com auxílio de uma proveta graduada de 50 mL contendo um volume conhecido de água, sendo a resposta

obtida a partir da diferença direta do volume de raízes, pela equivalência de unidades ($1 \text{ mL} = 1 \text{ mm}^3$), segundo metodologia descrita por Basso (Basso, 1999);

-Massa da parte aérea seca (MPAS) – a parte aérea (caule e folhas) fresca das plantas após separação da raiz foi colocada para secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60-70 °C durante 72 h até atingir peso seco constante, quando foi pesada para determinação da massa seca;

-Acúmulo de N na parte aérea (QTNA) – a MPAS após pesagem foi moída em moinho tipo Wiley (peneiras de 2,0 mm) e o seu teor de N total analisado pelo método Kjeldahl, de acordo com a metodologia descrita pela Embrapa (1997). A QTNA foi calculada multiplicando-se a MPAS pelo seu teor de nitrogênio.

2.6- Análise estatística

A normalidade e homogeneidade das variâncias dos erros foram determinadas pelos testes de Lilliefors e de Cochran e Bartley, respectivamente, pelo *software* SAEG (Sistemas para análises estatísticas, 2005). Os dados avaliados para os diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade com o programa SISVAR (Ferreira, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes de *Bradyrhizobium sp.* induziram um maior número de nódulos na cultivar de feijão-caupi utilizada, em comparação aos tratamentos não inoculados (tabela 1). Esse favorecimento na nodulação do feijão-caupi quando inoculado com estirpes eficientes de *Bradyrhizobium sp.* vem sendo observado em diversos trabalhos e tem sido associado ao aumento da produtividade na cultura (Silva et al., 2006a; Silva Júnior et al., 2014). Alcantara (2011), avaliando a interação entre cultivares de feijão-caupi e estirpes de *Bradyrhizobium*, também observou que as mesmas proporcionaram boa nodulação nas plantas, não

somente quando inoculadas individualmente, mas também quando em inoculação mista, apresentando a cultivar Mauá melhor nodulação na fase entre o desenvolvimento vegetativo (30 DAE) e o início da floração (52 DAE).

O número de nódulos obtido nos tratamentos não inoculados indica uma possível contaminação do substrato utilizado (areia e vermiculita) ou ineficiência no processo de autoclavação dos vasos. No momento da coleta, percebeu-se a presença de nódulos muito grandes, geralmente não característicos de feijão-caupi, nesses tratamentos.

O teste de média mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos inoculados e a testemunha nitrogenada (50 kg ha^{-1} de N), apresentando, este último, a menor nodulação. Essa baixa nodulação evidencia o papel inibidor do N-mineral sobre a nodulação das leguminosas, que ocorre em resposta às demandas nutricionais da planta. Na presença de N-mineral, tais demandas são reduzidas, não havendo, portanto, estímulo à nodulação (Moreira e Siqueira, 2006). De acordo com Hungria (1994), sob alta disponibilidade de N-mineral no solo, há diminuição da exsudação radicular dos flavonóides, o que leva à diminuição da nodulação.

Tabela 1: Número de nódulos (NN) e Massa de nódulos secos (MNS) de feijão-caupi (Cv Mauá) aos 45 DAE, sob diferentes fontes de N (combinações de inoculação e testemunhas). Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. .

Tratamentos	Número de nódulos	Massa de nódulos secos (mg.planta⁻¹)
BR 11001+mistura de estirpes	156 a	123,00 a
BR 11001 + SEMIA 6462	172 a	138,00 a
BR 11001	14 b	71,75 b
SEMIA 6462	184 a	124,25 a
BR 11005+ mistura de estirpes	128 a	141,25 a
BR 11005+ SEMIA 6462	219 a	129,80 a
BR 11005	47 b	118,00 a
Testemunha nitrogenado	2 b	18,00 b
Testemunha absoluta	19 b	61,00 b
Mistura de estirpes	194 a	128,75 a

As estirpes de *Azospirillum* utilizadas, quando inoculadas individualmente, proporcionaram um menor número de nódulos em feijão-caupi. Esse resultado está de acordo com Taiz e Zeiger (2009), que relatam que estirpes de *Azospirillum* podem contribuir para melhor desenvolvimento de nódulos

radiculares quando em associação a estirpes de rizóbios devido a mudança nas taxas de auxina e citocinina nas células do córtex radicular.

A inoculação mista entre a estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 e *Azospirillum* BR 11005 foi a que proporcionou maior número de nódulos na cultivar Mauá. Além disso, esse tratamento apresentou um incremento de 16% na nodulação na cultivar em comparação à inoculação individual com a estirpe SEMIA 646. Veronezi et al. (2012), também demonstraram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* conjuntamente com a estirpe de rizóbio CPAO 19.5 L3, propiciou uma maior nodulação de plantas de feijoeiro. De forma semelhante, Araújo et al.(2009), constataram aumento na nodulação do feijão-caupi com a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis*, sugerindo uma influência do *Bacillus subtilis* na promoção de nodulação, uma vez que esse se caracteriza como RPCP.

Neste estudo, os dados obtidos para massa de nódulos secos apontam uma correlação desta com o número de nódulos. Porém, os nódulos grandes, considerados contaminação, favoreceram maior massa, principalmente, na inoculação com a estirpe de *Azospirillum brasilense* BR 11005 (tabela 1).

A média de massa de nódulos variou de 18 a 141 mg planta⁻¹. A massa de nódulos é uma variável intimamente relacionada com a fixação de nitrogênio e tem sido recomendada para programas de melhoramento que objetivam o aumento da fixação de N₂. De acordo com Ankomah et al. (1996), as correlações entre essa variável e a quantidade de N fixado, permitem uma redução substancial no tempo, nos materiais desses programas e nos custos. Segundo Döbereiner (1966), a correlação positiva entre a MNS e a quantidade de N acumulada em leguminosas, sugere que quanto maior a massa seca, maior fixação de N, e maior eficiência simbiótica.

Observou-se um incremento na massa seca de nódulos de 4 e 11% na coinoculação da estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 com as estirpes de *Azospirillum* BR 11005 e BR 11001, respectivamente, em comparação a inoculação individual da estirpe. E um incremento de 10% na inoculação entre a mistura das cinco estirpes *Bradyrhizobium* e a estirpe BR 11005 de *Azospirillum*. Hungria et al. (2013), num estudo de coinoculação de soja e feijão comum com estirpes de *rhizobium* e *Azospirillum*, também observaram incremento na nodulação e massa de nódulos com a inoculação mista dessas bactérias, o que

de acordo com os autores, foi devido a estimulação da produção de pelos radiculares em consequência da atividade de *Azospirillum*, uma vez que nodulação nas leguminosas é iniciada a partir dos pelos radiculares.

Remans et al. (2008b), observaram que o aumento na taxa de FBN induzida pela coinoculação de *Rhizobium*–*Azospirillum*, em feijão comum, é consequência do aumento na nodulação precoce e do crescimento da planta em comparação com a inoculação individual com *Rhizobium* e com as testemunhas absolutas.

O número e a massa dos nódulos são indicadores usuais da capacidade de nodulação da planta. Além disso, a massa de nódulos secos é uma variável empregada para avaliação da eficiência simbiótica de bactérias que nodulam leguminosas, fazendo parte do protocolo para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil (Mapa, 2011).

Com relação à biomassa seca, a coinoculação entre as estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11001 e de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 proporcionou um incremento de 25% na massa seca da parte aérea (MSPA), em relação à inoculação individual de feijão-caupi com a estirpe de *Bradyrhizobium* (tabela 2). Lima et al. (2011), também observaram que a coinoculação entre *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus* e *Bradyrhizobium* favoreceu maior MSPA em feijão-caupi, porém a MSPA foi igual à produzida pelo tratamento inoculado apenas com *Bradyrhizobium* (SEMIA 6462), ao contrário do observado no presente estudo.

Tabela 2: Massa seca da parte aérea (MSPA) e Nitrogênio acumulado na parte aérea (QTNA) de feijão-caupi (Cv Mauá) aos 45 DAE, sob diferentes fontes de N (combinações de inoculação e testemunhas). Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. .

Tratamentos	Massa seca da parte aérea (g.planta ⁻¹)	Nitrogênio acumulado na parte aérea (g.planta ⁻¹)
BR 11001+mistura de estirpes	2,17 a	61,55 a
BR 11001 + SEMIA 6462	2,64 a	54,89 a
BR 11001	0, 87 b	19,12 b
SEMIA 6462	2,11 a	51,90 a
BR 11005+ mistura de estirpes	2,30 a	72,76 a
BR 11005+ SEMIA 6462	1,98 a	57,12 a
BR 11005	1,43 b	39,38 b
Testemunha nitrogenado	2,18 a	49,93 a
Testemunha absoluta	0,83 b	19,28 b
Mistura de estirpes	2,53 a	71,02 a

A MSPA produzida é uma variável de grande importância nos estudos com as cultivares de feijão-caupi, uma vez que essa leguminosa também se apresenta como promissora para adubação verde. E para Pimratch et al. (2004), é considerada a característica mais confiável para seleção de cultivares com maior potencial simbiótico em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio.

A inoculação individual da estirpe BR 11001 e a testemunha absoluta proporcionaram menor biomassa seca em feijão-caupi, nas condições testadas. Em contrapartida, a inoculação com as estirpes de *Bradyrhizobium*, de forma individual ou mista, possibilitou MSPA semelhante à obtida com a aplicação de N-mineral. Araújo et al.(2009), avaliando a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis* também constataram valores de MSPA de feijão-caupi e Leucena semelhante aos obtidos no tratamento nitrogenado. Esses resultados indicam que as simbioses envolvendo RPCP proveram N às plantas em quantidades similares às da adubação, não ficando estas carentes em N para seu desenvolvimento, mostrando-se essa biotecnologia promissora para diminuição ou substituição da aplicação do nitrogênio mineral na cultura.

Os tratamentos inoculados com as estirpes de *Bradyrhizobium*, de forma individual ou mista com as estirpes de *Azospirillum*, tiveram efeito significativo no acúmulo de N na parte aérea (QTNA) em relação à testemunha absoluta, apresentando essa variável correlação com a MSPA (tabela 2).

A coinoculação da estirpe de *Azospirillum brasilense* BR 11005 com a estirpe SEMIA 6462 e mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* favoreceu incrementos no teor de N acumulado na parte aérea da cultivar Mauá de 14 e 45% em relação ao tratamento nitrogenado e de 45 e 85% em relação à inoculação individual com a estirpe BR 11005. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al. (2006) em que a estirpe NFB-700 de *Bradyrhizobium* sp, quando coinoculada com *Paenibacillus*, apresentou um incremento no acúmulo de nitrogênio em feijão caupi, de até 22,6% em comparação à inoculação individual da estirpe.

Esse incremento de N na parte aérea observada pode resultar em um aumento na produção de grãos, uma vez que o N, nutriente estritamente ligada à fase de enchimento de grãos, estará disponível e em quantidade para a cultura (Hungria et al. ,2013). Além disso, a quantidade de N acumulada na biomassa seca é muito importante na avaliação do desempenho das cultivares de feijão-caupi na adubação verde, uma vez que o nitrogênio oriundo da decomposição da matéria orgânica será utilizado no desenvolvimento da cultura sucessora. De acordo com Guedes (2008), o feijão-caupi é utilizado na adubação verde por possuir alta capacidade de cobertura do solo, produzir considerável quantidade de biomassa com elevado teor de nitrogênio, devido à simbiose com bactérias do grupo rizóbio.

No que se refere à massa seca de raiz (MSR), observou-se efeito significativo ($p < 0,05$) com a inoculação das estirpes de *Bradyrhizobium* em relação à testemunha absoluta (tabela 3). As mesmas proporcionaram incremento da MSR em feijão-caupi tanto quando inoculadas individualmente quanto em coinoculação.

Tabela 3: Massa seca de raiz (MSR), volume total de raiz (VTR) e comprimento da raiz principal (CRP) de feijão-caupi (Cv Mauá) aos 45 DAE, sob diferentes fontes de N (combinações de inoculação e testemunhas). Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. .

Tratamentos	Massa seca de raiz (g.planta ⁻¹)	Volume total de raiz (mL)	Comprimento da raiz principal (cm)
BR 11001+mistura de estirpes	0,77 a	10,00 a	26,00 a
BR 11001 + SEMIA 6462	0,89 a	11,25 a	27,77 a
BR 11001	0,36 b	6,25 a	18,40 a
SEMIA 6462	0,78 a	10,00 a	25,75 a
BR 11005+ mistura de estirpes	0,74 a	10,00 a	27,55 a
BR 11005+ SEMIA 6462	0,81 a	11,25 a	25,45 a
BR 11005	0,48 b	8,75 a	27,70 a
Testemunha nitrogenado	0,93 a	10,00 a	26,80 a
Testemunha absoluta	0,37 b	6,25 a	26,67 a
Mistura de estirpes	0,78 a	11,25 a	24,72 a

Os tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 6462 e a mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* foram superiores em 110% quanto ao rendimento de MSR (0,785 g planta⁻¹) em relação ao tratamento controle absoluto (0,372 g planta⁻¹). Esses valores, porém, estão abaixo dos observados por Silva et al. (2007) em feijão-caupi para a mesma variável.

O tratamento com nitrogênio mineral foi o que proporcionou maiores valores de MSR em feijão-caupi, porém não se observou diferença significativa ($p>0,05$) entre este tratamento e os inoculados com as estirpes de *Bradyrhizobium* para essa variável.

A inoculação combinada da estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 com as estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11005 e BR 11001 favoreceu incrementos de 3 e 14%, respectivamente, na MSR da cultivar Mauá em relação à inoculação individual com a estirpe. Resultados semelhantes foram evidenciados por Araújo et al.(2009), em que a coinoculação de estirpes de rizóbio e *Bacillus subtilis* aumentou a MSR do feijão-caupi e da leucena, sugerindo um efeito positivo do *Bacillus* sobre o crescimento radicular da cultura. Em contrapartida, Silva et al.(2007), observaram que as coinoculações entre estirpes de *Bradyrhizobium* e RPCP dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* apresentaram um efeito inibidor geral de 25% nos rendimentos de MSR. Porém, essa inibição do crescimento radicular não apresentou impacto na fixação simbiótica do N₂ no feijão-caupi.

Em relação ao volume total de raiz (VTR) de feijão-caupi, não foi observado efeito significativo ($p > 0,05$) entre os tratamentos (tabela 3). Porém, obteve-se um incremento de 12,5% no VTR com a coinoculação da estirpe SEMIA 6462 tanto com *A. brasilense* BR 11001 quanto BR 11005. Remans et al. (2008a) observaram uma resposta diferencial, com a coinoculação da estirpe *A. brasilense* BR 11005 em relação a raízes de genótipos de feijoeiro. Esse incremento foi observado em diversas variáveis da planta, incluindo o peso seco de raiz, o número de nódulos e o número de raízes basais formadas durante a germinação, todas relacionadas com a produção de compostos indólicos (AIA) desta estirpe.

Segundo Bashan e Bashan (2005), a inoculação mista de *Azospirillum* com *Rhizobium* aumenta a estimulação e a função dos nódulos, número total e peso dos nódulos, diferenciação das células epidérmicas nos pêlos radiculares, área da superfície radicular e, conseqüentemente, produtividade de grãos.

A coinoculação entre estirpes de RPCP representa uma tática simples, barata e inovadora para agricultura. No Brasil cerca de 70% dos fertilizantes nitrogenados são importados, sendo os custos da aplicação N mineral muito elevado. Já os inoculantes microbianos são muito baratos e considerando apenas a cultura da soja, as estimativas de economia são de cerca de US \$ 7.000 milhões ano⁻¹ com a FBN. Além disso, a utilização de 100 kg de fertilizante nitrogenado corresponde a cerca de 950 kg de CO₂ equivalente, o que torna o uso de bactérias diazotróficas e microorganismo promotores de crescimento vegetal na agricultura ser economicamente e ambientalmente viável (Hungria et al.,2013).

Também não se observou efeito significativo ($p > 0,05$) entre os tratamentos para comprimento da raiz principal (CRP) de feijão-caupi (tabela 3). Isso pode ter ocorrido devido a uma possível limitação do crescimento radicular pelos vasos de Leonard. Diferente dos resultados obtidos para o CRP no presente estudo, Silva et al.(2007) comprovaram a natureza promotora de crescimento de raiz no caupi por *Bacillus* sp em coinoculação com *Rhizobium*. Os autores confirmaram que a ausência de patógenos e de limitação de nutriente (a exceção do N) contribuem para inferir o mecanismo de ação direta dessas RPCP.

Yadegari e Rahmani (2010) observaram que a aplicação de RPCP (*Pseudomonas* spp. e *Azospirillum*) juntamente com *Rhizobium* melhorou o

crescimento e produção de sementes de feijão comum inoculadas. Da mesma forma que em feijão comum, a inoculação de feijão-caupi com estirpes desses mesmos gêneros pode ser uma alternativa para aumentos na produtividade na cultura, além de redução do uso de fertilizantes nitrogenados.

De acordo com Bashan e Bashan (2005), as inoculações mistas têm uma maior taxa de sucesso. Uma vez que nas plantas coinoculadas, a nutrição é mais equilibrada e adsorção de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes minerais é significativamente melhorada, podendo-se obter uma melhor produtividade.

Ainda não está claro como funcionam os mecanismos de promoção de crescimento na planta, se os benefícios da inoculação em leguminosas com ambos rizóbios e *Azospirillum* são apenas devido ao aumento e a nodulação e a fixação de nitrogênio. Contudo, o gênero *Azospirillum* pertence ao grupo amplo de RPCPs, que podem atuar por mecanismos diferentes, produzir uma variedade de hormônios vegetais, o que resulta em estímulo para o crescimento das plantas (Hungria et al.,2013).

4 CONCLUSÕES

Foi possível observar efeito significativo da coinoculação entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e biomassa de feijão-caupi. Em termos gerais, a coinoculação entre a estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 e as estirpes de *Azospirillum* BR 11005 e BR 11001 proporcionou maior nodulação na cultivar Mauá e também um incremento na massa seca de nódulos. Foi observado também que as estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11001 e de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462, quando coinoculadas, proporcionaram um incremento de 25% na biomassa seca massa seca da parte aérea na cultivar Mauá. O principal incremento verificado, no presente estudo, foi no acúmulo de N na parte aérea da cultivar Mauá em que a coinoculação da estirpe de *Azospirillum brasilense* BR 11005 com a estirpe SEMIA 6462 e mistura de estirpes de *Bradyrhizobium* favoreceu teores de N, 14 e 45% em relação ao tratamento nitrogenado e de 45 e 85% em relação à inoculação individual com a estirpe BR 11005. De forma semelhante também se observou incrementos na massa seca

de raiz da cultivar Mauá com a coinoculação da estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 com as estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11005 e BR 11001. Porém, a coinoculação não influenciou no comprimento da raiz principal da cultivar Mauá.

5 REFERÊNCIAS

- Alcantara, R. M. C. M. (2011) Fixação biológica de nitrogênio em genótipos ancestrais de feijão-caupi. Tese (Doutorado em Ciência do solo)-Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, 146p.
- Ankomah, A. B.; Zapata, F.; Hardarson, G.; Danso, S. K. A. (1996). Yield, nodulation, and N₂ fixation by cowpea cultivars at different phosphorus levels. *Biology and Fertility of Soils*, 22:10-15.
- Araújo, A.S.F.; Carneiro, R.F.V.; Bezerra, A.A.C.; Araújo, F.F.(2009) Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: Efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. *Ciência Rural*, on line. <http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a414cr2014.pdf>. em 06/04/2016.
- Baldani, V.L.D.; Döbereiner J. (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 12:433-439.
- Baldani, V.L.D.; Alvarez, M.A. de B.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, 90:35-46.
- Bashan, Y.; Bashan, L. E. (2005) Plant Growth-Promoting. In: Hillel, D. (Editor-in-Chief). *Encyclopedia of soils in the environment*. Oxford, U.K.: Elsevier, p. 103-115.
- Bergamaschi, C. (2006) *Ocorrência de bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Rio Grande do Sul- Porto Alegre, RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, p. 83.
- Dobereiner, J. (1966) Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature*, 210:850-852.
- Döbereiner, J.; Andrade, V. de O.; Baldani, V.L.D. (1999) *Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia*. Seropédica- RJ, Embrapa Agrobiologia. 38p. (Documentos 110).

- Ferreira, D. F. (2003) *Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR)*. Versão 4.3. Lavras: UFLA.
- Figueiras, G. C.; Santos, M. A. S dos; Homma, A. K. O; Rebello, F. K.; Cravo, M. S. (2009) Aspectos socioeconômicos. In: Zilli, J.E.; Vilarinho, A.A.; Alves, J.M.A. (Eds.). *A cultura do feijão-caupi na Amazônia brasileira*. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, p.23-58.
- Fred, E. B.; Waksman, S. *Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology*. New York: McGraww Hill, 1928. 145p.
- Gualter, R. M. R. (2010) *Efeito da Inoculação com Diferentes Estirpes de Rizóbio na Nodulação, Fixação Biológica de Nitrogênio e na Produtividade em Feijão-Caupi* Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Seropédica-RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRRJ, p.85.
- Guedes, R. E. (2008) *Bases para o Cultivo Orgânico de Feijão-Caupi [Vigna unguiculata L. (Walp.)] no Estado do Rio de Janeiro*. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Seropédica-RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRRJ, p. 93.
- Hungria, M. (1994) Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. *Revista brasileira ciência do Solo*, 18:339-364.
- Hungria, M. Nogueira, M. A.Araujo, R. S.(2013) Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils*. 49:791-801.
- Lacerda, A. M.; Moreira, F. M. S. Andrade, M. J. B; Soares, A. L. L. (2004) Yield and nodulation of cowpea inoculated with selected strains. *Revista Ceres*, 51:67-82.
- Lima AST, Barreto MCS, Araújo JM, Seldin L, Burity HA, Figueiredo MVB (2011) Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. *Rev Bras Ci Solo* 35:713–721
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2006) Instrução normativa DAS art. 2º. do decreto no. 5741 de 30 de março de 2006. *Caatinga*, 19:25-33.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (2011) Protocolo oficial para avaliação da viabilidade e eficiência agrônômica de cepas, inoculantes e tecnologias relacionados ao processo de fixação biológica do nitrogênio em leguminosas ANEXO à IN SDA 13, de 25/03/2011.
- Martins, L.M.V.; Neves, M.C.P.,; Rumjanek, N.G. (1997) Characteristics of cowpea rhizobia isolates from the northeast region of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 5:1005-1010.
- Martins, L.M.V. (1996) Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio de caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do

- Brasil. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Ciência do Solo), Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, 213p
- Moreira, F. M. S. (2005) Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais. *Boletim de Extensão da UFLA*, 12p. Disponível em: <[http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim_de_extensao)>. Acesso em 26 de abril de 2013.
- Moreira, F. M. S.; Siqueira, J. O. (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras, MG, Editora UFLA. 729p.
- Moreira, F. M. S.; Silva, K.; Nóbrega, R. S. A.; Carvalho, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1:74-99.
- Norris, D. O.; T'mannetje, L. (1964) .The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. In relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forestry Journal*, 29:214-235.
- Pimratch, S. (2004) Heritability and correlation for nitrogen fixation and agronomic traits of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Songklanakarinn Journal Science Technology*, 26:305-315.
- Polli, A.; Neves, A. F.; Galo, F. R.; Gazarini, J.; Rhoden, S. A.; Pamphile, J. A. (2012) .Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, 7:82-89
- Remans R, Beebe S, Blair M, Manrique G, Tovar E, Rao I, Croonenborghs A, Torres-Gutierrez R, El-Howeity M, Michiels J, Vanderleyden J (2008a) Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 302:149–161 DOI 10.1007/s11104-007-9462-7a.
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes JL, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L, Vanderleyden J. (2008b) Effect of *Rhizobium-Azospirillum* coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil.*; 312:25-37.
- Roesch, L. F.; Camargo, F. O.; Selbach, P. A.; Sá, E. S. (2005) Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural*, 35:1201-1204.
- Silva, V.N. et al. (2006). Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36:95-99.

- Silva, V. N.; Silva, L. E. S. F.; Martínez, C. R.; Seldin, L.; Burity, H. A.; Figueiredo, M.V. B. (2007) Estirpes de *Paenibacillus* promotoras de nodulação específica na simbiose *Bradyrhizobium-caupi*. *Acta Scientiarum Agronomy*, 29:331-338.
- Sistema para análises estatísticas-SAEG: versão 9.0. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, 2005. CD ROM.
- Silva, V. N.; Silva, L. E. S. F.; Figueiredo, M. V. B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) . *Acta Sci. Agron.* v. 28, n. 3, p. 407-412, 2006.
- Silva, V. N.; Silva, L. E. S. F. Figueiredo, M. V. B. (2006a) Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Acta Scientiarum Agronomy*, 28:407-412.
- Silva Júnior, E. B.; Silva, K.; Oliveira, S. S.; Oliveira, P. J.; Boddey, R. M.; Zilli, J. É.;Xavier, G. R. (2014). Nodulação e produção de feijão-caupi em resposta à inoculação com diferentes densidades rizobianas. *Pesq. agropec. bras.*49:804-812.
- Silva Júnior, E. B.; Alencar, C. A.; Fernandes Júnior, P. I.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R. (2010) *Avaliação do consórcio de estirpes para inoculação em feijão-caupi*. XXIX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. Guarapari – ES.
- Soares, A. L. L.; Pereira, J.P.A.; Ferreira, P. A .A ; Vale, H. M .M ; Lima, A. J.; Andrade, M. J. B.; Moreira, F. M. S. (2006) Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I-caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30:795-802.
- Taíz, L.; Zieger, E. (2009) Nutrição Mineral In:Taíz, L.; Zieger, E *Fisiologia vegetal*. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 4º ed., Porto Alegre: Artemed, p. 95-116.
- Veronezi, S.; Costa, M. R.; Silva, A. T.; Mercante, F. M.(2012) Co-inoculação de rizóbio e *Azospirillum brasilense* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cadernos de Agroecologia*, Vol 7, No. 2.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.*, Dordrecht, 255:571-586.
- Vincent, J. M. (1970) *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scientific.164p.
- Zilli, J.E.; Ferreira, E.P.B.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. (1999) Efficiency of fast-growing rhizobia capable of nodulating cowpea. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 71:553-560.
- Zilli, J. E.; Xavier, G. R.; Rumjanek, N. G.(2008) *BR 3262: nova estirpe de Bradyrhizobium para a inoculação de feijão-caupi em Roraima*. Boa Vista: Embrapa Roraima. 7p (Comunicado técnico, 10).

- Zilli, J. E.; Marson, L. C.; Marson, B. F.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R. , (2009a) Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. *Acta Amazonica*, 39:749-758.
- Lima, A. S. T.; Barreto, M. C. S.; Araújo, J. M.; Seldin, L.; Burity, H. A.; Figueiredo, M. V. B. (2011). Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* E, OU, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-Caupi R. *Bras. Ci. Solo*, 35:713-721.
- Yadegari M, Asadi Rahmani H (2010) Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds' inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on yield and yield components. *Afr J Agric Res* 5:792–799

3-2- PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À RIZOSFERA E RAIZ DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

A prospecção de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, além de potencial biotecnológico para o aumento da produtividade, vem como alternativa para redução dos danos ambientais causados pelo uso dos fertilizantes agrícolas. O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar de forma morfocultural, fisiológica e genotípica bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas à rizosfera e raiz de feijão-caupi. Solos de quatro diferentes propriedades dos municípios de Cachoeiras de Macacu e Magé, no Estado do Rio de Janeiro, foram utilizados num experimento, em casa de vegetação, para a prospecção de rizobactérias de feijão-caupi (cv. Maua). Após 45 dias de plantio, amostras de raízes e rizosfera foram coletadas e utilizadas para o isolamento e estimativa de bactérias diazotróficas presentes nos solos. Os isolados que cresceram no meio NFb semissólido passaram por sucessivas repicagem de isolamento e purificação e posteriormente utilizados para caracterização morfocultural, fisiológica (produção de compostos indólicos e sideróferos, solubilização de fosfatos e atividade da enzima nitrogenase) e genotípica (sequenciamento parcial do 16S rDNA). Foi observado considerável número de bactérias diazotróficas nos solos das áreas de coleta, variando de 0,24 a 4,53 log₁₀ células por grama de massa fresca de raiz. Foram obtidos 32 isolados da rizosfera e raiz de feijão-caupi. Destes, 81,25% apresentou borda da colônia inteira e 71,87% coloração branca na caracterização morfocultural. A produção de compostos indólicos pelos isolados foi baixa em relação aos padrões de auxina utilizados, variando entre

0,31 a 0,41 μg de compostos indólicos mg de proteína⁻¹. Todos os isolados apresentaram produção de sideróforos igual ou superior à estirpe padrão de *Azospirillum brasiliense* (BR 11001), porém, apenas 26% apresentaram capacidade de solubilização de fosfato. A taxa de atividade da nitrogenase variou de 0,5 a 42468,50 $\text{nmol C}_2\text{H}_4.\text{mg}$ de proteína⁻¹, sendo os maiores valores observados na avaliação aos 48 h após repicagem. Foram obtidos 20 isolados pertencente ao gênero *Azospirillum spp*, 6 pertencentes ao gênero *Pseudomonas spp* e um isolado identificado como *Rhizobium*. Destes todos apresentaram produção de sideróforos, produção de AIA e atividade da enzima nitrogenase e apenas 6% apresentaram os quatro mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, rizobactérias, promoção de crescimento.

EXPLORATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH COWPEA RHIZOSPHERE AND ROOT

ABSTRACT

The prospection of plant growth promoter rhizobacteria in addition to biotechnological potential for increasing productivity comes as an alternative to reduce environmental damage caused by the use of agricultural fertilizers. This study aimed to isolate and characterize by morphocultural form, physiological and genotypic, diazotrophic bacterium of the *Azospirillum* genus associated with the cowpea rhizosphere and root. Soils of four different sites in the municipalities of Cachoeiras de Macacu and Magé in the State of Rio de Janeiro were used in an experiment in greenhouse conditions, for the prospection of cowpea (cv. Maua) rhizobacteria. After 45 days of planting, roots and rhizosphere samples were collected and used for the isolation and estimation of diazotrophs bacteria present

in the soil. Isolates which grew in the semi-solid NFb medium were successively isolate an purified and subsequently used for the Morphocultural, physiological (production of indole compounds and siderophore, phosphate solubilization, nitrogenase activity) and genotypic characterization. It was observed considerable number of diazotrophs bacteria in soils of the areas of collection, varieing from 0.24 to 4.53 \log_{10} cells per gram of fresh root mass. It has been obtained 32 isolates from the rhizosphere and cowpea root. Of these isolates, 81.25% presented colonies with whole borders and 71.87% presented white color in Morphocultural characterization. The production of indole compounds isolated by auxin was lower compared to AIA standards, ranging from 0.31 to 0.41 μg indole compounds⁻¹. mg protein^{-1} . All isolates showed siderophores production equal to or higher than the standard strain of *Azospirillum brasiliense* (BR 11001), but only 26% had phosphate solubilization capacity. The nitrogenase activity rate ranged from 0.5 to 42468.50 $\text{nmol C}_2\text{H}_4.\text{mg protein}^{-1}$, and the highest values were observed in the evaluation 48 h after transplanting. Of the obtained isolates, 20 belonged to the genus *Azospirillum* spp, 6 to the *Pseudomonas* genus and one isolate identified as *Rhizobium*. These all presented production of siderophores, AIA production and activity of nitrogenase enzyme and only 6% had four plant growth promoting mechanisms.

Keywords: *Vigna unguiculata* (L.) Walp, rhizobacteria, growth promotion.

1-INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado dos insumos químicos na agricultura convencional pode acarretar o aumento da contaminação ambiental e da degradação dos solos. Como alternativa para a minimização desses danos, tem-se realizado pesquisas voltadas para o uso de biotecnologias na agricultura.

Algumas bactérias apresentam potencial biotecnológico para o uso na agricultura devido à capacidade de estimular o crescimento das plantas, sendo

então conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), podendo contribuir para o aumento da produtividade das culturas a elas associadas (Kloepper e Schroth, 1978).

A ação promotora no crescimento das plantas pelas rizobactérias pode ocorrer através de diferentes mecanismos, tais como: a produção de fitohormônios, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a mineralização e a solubilização de nutrientes e o antagonismo contra patógenos (Cattelan e Hartel, 2000; Ahmad et al., 2008).

Dentre os fito-hormônios produzidos pelas rizobactérias, a auxina é o mais estudado, pela sua importância sobre o crescimento e desenvolvimento dos vegetais, atuando também na alongação do sistema radicular (Mockaitis e Estelle, 2008). A solubilização do fósforo é também um mecanismo muito explorado nas rizobactérias, principalmente nos trópicos, no qual elas atuam produzindo ácidos orgânicos que quelam os cátions do solo ligados ao fosfato liberando o P disponibilizando-o para a planta (Adesemoye e Kloepper, 2009). O antagonismo contra os patógenos pode ser realizado pelas rizobactérias através da produção de sideróforos com complexação do Fe^{3+} disponível na rizosfera, o que além de favorecer o estabelecimento das mesmas nas raízes, diminui a população de microrganismos patogênicos (Lemanceau et al., 2007).

Da mesma forma, o fornecimento de nitrogênio através da FBN é um mecanismo de extrema importância, pelo qual o nitrogênio, nutriente que frequentemente limita a produção, pode ser suprido total ou parcialmente, favorecendo o desenvolvimento das plantas cultivadas (Hungria e Vargas, 2000) e contribuindo para a diminuição do uso do nitrogênio mineral.

Dentre as principais RPCPs destacam-se as bactérias do gênero *Azospirillum*, devido a sua habilidade para biossíntese de fitohormônios, além de solubilizar fosfatos minerais e FBN (Moreira et al., 2010; Hungria, 2011).

As bactérias do gênero *Azospirillum* geralmente estão associadas a gramíneas como trigo (Díaz-Zorita e Fernández-Canigia, 2009), milho (Hungria et al., 2010), cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2002) e arroz (Rodrigues et al., 2008). Trabalhos recentes também têm relatado resultados promissores com a coinoculação dessas bactérias com bactérias do grupo *Rhizobium* em leguminosas como a soja (Hungria et al., 2013) e o feijão comum (Remans et al. 2008b). São, porém, escassos trabalhos sobre a coinoculação com *Azospirillum*

spp. em feijão-caupi, leguminosa de grande importância socioeconômica em algumas regiões brasileiras, devido ao seu alto teor proteico e nutricional.

A seleção de rizobactérias, principalmente do gênero *Azospirillum*, que apresentem um ou mais mecanismos de promoção de crescimento é uma alternativa biotecnológica para o feijão-caupi, podendo maximizar, quando em coinoculação com estirpes eficientes do grupo rizóbio, a produção de biomassa e grãos na cultura.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar de forma morfo cultural, fisiológica e molecular bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* associadas à rizosfera e raiz de feijão-caupi cultivado em solos de regiões produtoras do estado do Rio de Janeiro.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Amostragem e coleta do material

Foram coletadas amostras representativas da rizosfera (raiz+solo) de cultivares de feijão-caupi cultivadas em diferentes áreas no Estado do Rio de Janeiro nos municípios de Cachoeiras de Macacu e Magé. Esses municípios são tradicionalmente produtores de feijão-caupi, onde se faz uso de genótipos de sementes introduzidas anos atrás junto a imigrações de nordestinos e são localmente conhecidos como Mauá, Costelão, Piabetá.

Os solos rizosféricos foram coletados em quatro propriedades familiares (duas em Cachoeiras de Macacu e duas em Magé), todas com históricos de muitos anos de plantio de Feijão-caupi, com adubação nitrogenada e sem utilização anterior de inoculantes.

Em Cachoeiras de Macacu, as coletas foram realizadas nas propriedades dos produtores Sr Alcenir (1) e Sr Roberto (2). Na propriedade 1 o caupi é cultivado nas entre linhas de cultivo de laranja. Já na propriedade 2, o feijão-caupi é cultivado em rotação de cultura com batata doce e milho. Em Magé, as coletas foram realizadas nas propriedades dos produtores Sr Jailson (3) e Sr João Carlos

(4), nos quais o feijão-caupi é plantado em rotação de culturas com batata e quiabo, respectivamente.

As amostras dos solos de cada propriedade foram coletadas dentro de cada área na camada de 0 a 20 cm, de maneira inteiramente casualizada. De cada área foram coletadas 10 amostras compostas de solo, obtidas a partir de 20 amostras simples. Em sequência, os solos foram destorroados, secos ao ar e peneirados em malha de 4 mm e sub-amostras dos solos foram separadas e enviadas para análises químicas, no laboratório de Química agrícola da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica-RJ, constando os resultados na tabela a seguir (tabela 1).

Tabela 1: Resultados da análise química do solo de diferentes propriedades nos municípios de estudo antes da implantação do ensaio de solos.

Localidades /Propriedades		C	Al	Ca	H+Al	K	Mg	N	P	pH
		%	-----cmolc/d-----					%	mg/L	
Cachoeiras de macacu	1	0,64	0,11	1,50	3,04	132,00	0,49	0,08	16,59	5,39
	2	1,11	0,20	2,11	4,36	360,00	0,95	0,13	19,72	4,91
Magé	3	1,56	1,86	0,50	8,98	16,00	0,18	0,17	25,55	4,17
	4	1,41	0,17	2,32	5,08	22,00	0,80	0,14	27,86	5,28

2.2- Obtenção e isolamento das rizobactérias

2.2.1- Ensaio em casa de vegetação

As amostras dos solos coletados foram utilizadas no ensaio para a prospecção das bactérias da rizosfera e raiz de feijão-caupi. O plantio foi realizado em condições de casa de vegetação, em vasos com capacidade de 2 Kg contendo os solos das diferentes propriedades, utilizando-se sementes de feijão-caupi, cultivar Mauá, previamente desinfectadas, para que a microbiota associada à planta correspondesse apenas àquela presente no solo (Baldani et al., 2000).

Foram semeadas quatro sementes por vaso e aos cinco dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso. Durante o ciclo de crescimento, foram realizados tratamentos culturais como: a

irrigação das plantas por rega manual e o tutoramento das plantas com auxílio de estacas de bambú.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições de solos de cada área de coleta. Aos 45 DAE foi realizada a coleta para o isolamento de *Azospirillum* spp.

2.2.2- Isolamento de bactérias de raiz e rizosfera de Feijão-cupi

Como *Azospirillum* spp são consideradas endofíticas facultativos (podem colonizar tanto o interior das raízes, quanto a rizosfera) foram utilizadas duas estratégias para o seu isolamento.

Para o isolamento de *Azospirillum* spp presentes na rizosfera de feijão-caupi, as raízes coletadas foram lavadas levemente em água corrente para a retirada do excesso de solo, sendo o conjunto raiz-solo que permaneceu aderido após lavagem considerado ambiente rizosférico. Posteriormente, 10 gramas de raiz foram colocado em frascos de erlenmeyer com 90 mL de uma solução salina 0,85% estéril e submetido à trituração no liquidificador, para obtenção de uma suspensão com substrato rizosférico. Amostras de 1 mL dessa suspensão foram adicionadas a 9 mL de solução salina 0,85% e a suspensão foi deixada em repouso por 15 minutos. Após esse tempo, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-7} , sendo que 100 μ L das diluições 10^{-2} até 10^{-6} foram inoculados, em triplicata, no meio de cultivo NFb, livre de nitrogênio combinado, semisseletivo para efetuar o isolamento *Azospirillum* spp (Döbereiner et al., 1999).

Para a obtenção de *Azospirillum* spp presentes no interior das raízes de feijão-caupi, as raízes foram lavadas em água corrente e colocadas em solução de Cloramina T 1% por um e 5 minutos, nos solos de Magé e Cachoeiras, respectivamente. Após desinfecção com Cloramina T, as raízes foram lavadas com água estéril por 5 minutos e depois com tampão P 0,5M e seguida de mais uma lavagem com água estéril. Ao final do processo de desinfecção, procedeu-se igual ao isolamento das bactérias da rizosfera de feijão. Porém, as diluições inoculadas no meio NFb foram as de 10^{-1} até 10^{-5} .

Simultaneamente, nos dois isolamentos, foram quantificadas as bactérias endofíticas diazotróficas, através da técnica do Número Mais Provável (NMP), sendo o número populacional obtido com o uso da tabela de McCrady, tomando-

se por base o número de frascos positivos em cada diluição (Döbereiner et al., 1999).

Os meios de cultura (tanto no isolamento de *Azospirillum* spp presentes na rizosfera de feijão-caupi, quanto no de *Azospirillum* spp presentes no interior das raízes) foram incubados a 28° C até a formação de película aerotóxica típica, próxima da superfície do meio (aproximadamente sete dias). As películas formadas nos frascos com crescimento positivo, foram transferidas para um novo meio NFb semissólido até a formação de nova película. Após isso, parte da película foi transferida para placas com meio NFb sólido e incubadas a 28°C até a formação de colônias isoladas. Para a purificação, as colônias formadas no meio sólido foram novamente transferidas para o meio NFb semissólido e, após a formação de película, transferidas para placas de Petri contendo o meio Ágar-batata (Baldani e Döbereiner, 1980). Uma vez isoladas as colônias, estas foram repicadas para frascos inclinados, com 5 mL de meio batata sólido e incubadas por mais três dias, quando foram acrescentados, a cada frasco, óleo mineral, sendo estocados logo em seguida. Também foi realizada a estocagem dos isolados, após crescimento em meio DYGs líquido (Glicose-2g; Ácido málico-2g; Peptona bacteriológica-1,5g; Extrato de levedura-2g; K₂HPO₄-0,5g; MgSO₄.7H₂O-0,5g; Ácido glutâmico-1,5g; 1000 mL de água de água destilada; pH ajustado para 6,8) em microtubos eppendorf com glicerol 50% e em seguida armazenados em congelador à -14°C.

2.3- Caracterização morfocultural das rizobactérias

Os isolados da rizosfera e raiz de feijão-caupi que estavam armazenados em super freezer, foram novamente crescidos em meio Dygs líquido, sob agitação, por 24 h e posteriormente, repicados para placas contendo três meios de cultivo: NFb (3x), meio batata e nutriente Agar. As placas foram incubadas a 28°C até a formação de colônias isoladas, que foram utilizadas na caracterização morfocultural. As colônias foram classificadas de acordo com Zarpelon (2007), levando-se em consideração os critérios de elevação, estrutura da superfície, forma da colônia e das bordas (figura 1). Também foram avaliadas as características culturais relacionadas à (1) tempo de crescimento (muito rápido: menos de 1 dia; rápido: entre 1 a 2 dias; médio: entre 2 a 3 dia; lento: 3 a 4 dias e muito lento: mais de 4 dias); (2) consistência (mucosa, fluida e micelial); (3)

superfície (lisa e rugosa); (4) brilho (brilhante, translúcida e opaca); (5) coloração; (6) alteração da cor do meio (pH) e (7) tamanho (<1 mm, entre 1 a 2 mm e >2 mm).

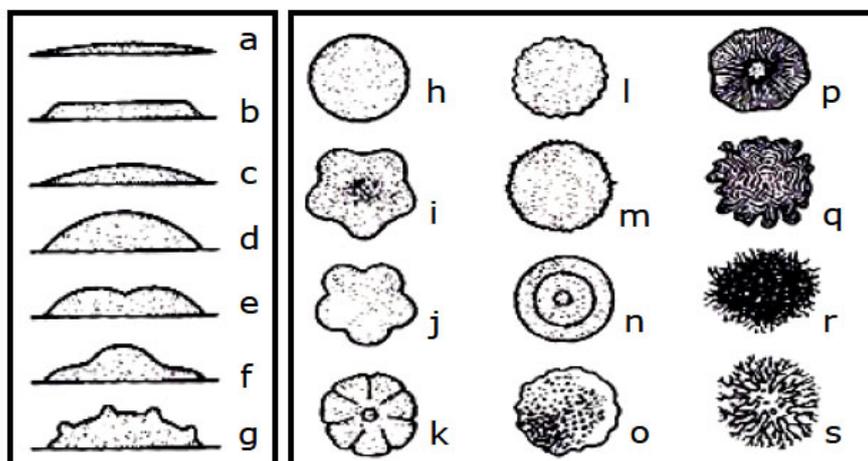


Figura 1: Padrão para caracterização morfo-cultural dos isolados de *Azospirillum* spp, obtidos da rizosfera e raiz de Feijão-caupi. Quanto à: (1) Elevação das colônias: **a**- chata; **b**- espreada; **c**- convexa baixa; **d**- convexa alta; **e**- umbilicada; **f**- centro-saliente e **g**- papilífera. (2) Forma: **h, k, l, m, n** e **p**- circular; **i, j, o, q**- irregular e **r, s**- rizóide. (3) Estrutura das colônias: **h, l, m, n**- amorfa; **i, j, k, o**- granulosa; **q**- cacheada e **p, r, s**- filamentosas. (4) Borda: **h, n**- inteiras; **i, o, p, q**- ondulados; **j, k**- lobados; **l, m**- denticulados e **r, s**- franjados (Adaptado de Zarpelon, 2007).

As estirpes *Azospirillum brasilense* Sp245 (BR 11005) e Sp7 (BR 11001), obtidas a partir do banco de germoplasma da Embrapa Agrobiologia, foram usadas como padrão de referência de crescimento para a comparação entre os isolados. Uma matriz binária de dados foi construída com os isolados e as estirpes padrão. Estes foram comparados por seu grau de similaridade, estimado pelo coeficiente de Jaccard (Sj), agrupados pelo método UPGMA e representados graficamente por um dendrograma obtido pelo programa PAST.

2.4- Caracterização fisiológica das rizobactérias

2.4.1- Determinação colorimétrica da produção de ácido indol-acético (AIA)

A produção de ácido indol-acético (AIA) foi baseada no método quantitativo colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951). As colônias isoladas puras foram repicadas em tubos contendo meio de cultura DYGS líquido suplementado com L-triptofano na concentração final de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, onde elas foram cultivadas a 30 ° C durante 24 h, sob agitação constante (150 rpm). Com

24h de desenvolvimento, alíquotas de 1 mL de cada tubo foram centrifugadas a 8.000 x g por 4 minutos. Após centrifugação, em microplacas, 150 µL do sobrenadante foi misturado a 100 µL do reagente de Salkowski (1 mL de 0,5 M FeCl₃ em 49 mL de HClO₄ 35 %), sendo as microplacas incubadas no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. O teste constou de três repetições para cada isolado bacteriano, cultivados independentemente, um controle negativo (meio DYGS sem bactéria) e padrões positivos (*Azospirillum brasilense*). A quantificação de compostos indólicos foi avaliada utilizando da curva de calibração preparada com diluições seriadas de padrões de AIA com o hormônio sintetizado (0-75 µg mL⁻¹). Para padronização das amostras os resultados foram expressos na unidade mg mL⁻¹ de AIA por unidade de DO. As leituras foram feitas em leitor de microplaca (Labsystem iems reader MF, Labsystem) com comprimento de onda de 595 nm. Todas as amostras de AIA foram analisadas em triplicata e os resultados foram decorrentes de uma média das 3 leituras. Para a normalização dos valores obtidos, os resultados foram expressos em µg mL⁻¹ de IAA por mg proteína⁻¹. As proteínas foram quantificadas de acordo com Bradford (1976). Os dados foram analisados estatisticamente e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa SISVAR (Ferreira, 2003).

2.4.2- Produção de sideróforos

A avaliação de sideróforos foi feita baseando-se no protocolo de Schwyn e Neilands (1987), modificado por Tortora *et al* (2011). Os isolados foram inoculados em triplicata, em meio NFb líquido livre de ferro e sem azul de bromotimol com NH₄Cl a 1%, incubados sob agitação de 150 rpm por 48 horas. Após o crescimento os mesmos, foram inoculados em triplicata em placas de Petri contendo meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH₄Cl a 0,1% e Cromo AzuroIS (CAS) e incubada a 30°C. A concentração celular foi ajustada em uma DO₅₆₀ = 0,6. A avaliação da produção de sideróforos foi realizada aos 7^o e 14^o dias de incubação. As vidrarias utilizadas nesta avaliação foram previamente lavadas com HCl a 10% para retirada de resíduos orgânicos, de acordo com a metodologia utilizada.

2.4.3- Solubilização de fosfato

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico foi testada em meio de cultura NBRIP sólido com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, contendo Glicose-10 g; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,25 g; KCl -0,2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,1g; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -5g; pH ajustado para 7 (Nautiyal, 1999). As bactérias foram previamente cultivadas em meio DYGS líquido, permanecendo sob temperatura de 30 °C por 24 horas com agitação constante a 150 rpm. Após esse período, foi medida a densidade óptica, normalizada a $\text{D.O.}_{600} = 0,7-0,9$. Três alíquotas de 20 μL foram inoculadas na superfície da placa de Petri em forma de pontuações, em triplicata. Como padrões positivos de referência foram utilizados as estirpes BR 11281 de *Gluconobacter diazotrophicus*, BR 11366 de *Burkholderia tropica*, BR 11001 e BR 11005 de *Azospirillum brasilense*. As placas foram incubadas a 30 °C logo após a inoculação. O halo foi percebido como uma área translúcida em torno da colônia, até o 12º dia após inoculação. Foram realizadas avaliações aos 6º e 12º dias de crescimento a 28°C e consideradas positivas aquelas que exibiram halo ao redor da colônia. E para a classificação dos isolados, foram medidos os diâmetros da colônia e do halo de solubilização (figura 2). Os isolados que se demonstraram positivos foram classificados quanto à eficiência de solubilização (ES) a partir do índice de solubilização (IS), obtido por meio da relação feita entre o diâmetro do halo da solubilização ao redor da colônia e o diâmetro da colônia bacteriana (Berraqueiro et al.,1976). Os isolados que apresentaram ($\text{IS} > 2,5$) foram classificados como alta ES; ($1,5 \geq \text{IS} \leq 2,5$) média; ($\text{IS} < 1,5$) baixa e os que não apresentaram halo ao redor da colônia foram considerados como nula a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio.

$$\text{IS} = \text{Diâmetro do halo} / \text{Diâmetro da colônia} \times 100$$

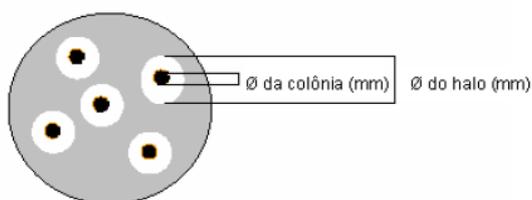


Figura 2: Representação dos halos de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, e das colônias nas placas de Petri. Fonte: Lemos (2009).

2.4.4- Atividade da nitrogenase

A caracterização fisiológica, baseada na atividade da nitrogenase, foi avaliada pela técnica de atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados obtidos, de acordo com o método descrito por Boddey et al., (1990), pela inoculação de uma colônia no meio semissólido NFb, sem indicador. Foram utilizadas três repetições de cada isolado, padrões positivos (estirpes de *Azospirillum brasilense* BR 11001 e BR 11005), além de meio de cultura estéril como controle. A incubação foi a 30 °C, por 48 e 72 horas e após a formação da película, os frascos foram fechados com rolhas de borracha do tipo suba-seal estéreis, e com uma seringa foi injetado 1 mL do gás acetileno (10% da sua fase gasosa). As culturas submetidas ao acetileno foram incubadas por uma hora a 30°C, sem agitação e, posteriormente, 0,5 mL da fase gasosa foi injetada no cromatógrafo de gás, com ionização de chama, marca Perkin Elmer modelo F11, utilizando-se uma coluna Poropak N de 50 cm, a 40 °C, onde foi realizada a leitura do etileno formado pela redução do acetileno (Rodrigues et al., 2006). O teor de proteína foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976).

2.4.5- Reação de Gram

A reação de Gram foi feita de acordo com o protocolo sugerido por Yano et al. (1991), no qual as bactérias foram crescidas em meio batata e o esfregaço preparado a partir de uma colônia de cada isolado. A técnica consistiu na preparação de um esfregaço em lâmina de vidro, secagem ao ar e fixação das células em chama. Após a fixação se aplicou cristal violeta por 1 minuto, lavagem com água destilada, cobertura da lâmina com lugol por 1 minuto, lavagem com água destilada, descoloração com solução de álcool-cetona e lavagem com água destilada, cobertura com safranina por 30 segundos, lavagem com água destilada e secagem. A avaliação da coloração das células foi feita em microscópio ótico de contraste de fase com a objetiva de 100X com uso de óleo de imersão.

2.5- Caracterização Molecular das rizobactérias

2.5.1- Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rDNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit para purificação de DNA genômico (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) da marca Promega®.

Uma suspensão de células dos isolados da rizosfera e raízes de feijão-caupi foi centrifugada (9.000x g, 10 min) e o precipitado foi ressuspensionado em 0,6 ml de solução de lise nuclear e agitado em vórtex. Após o procedimento para extração de DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) a 90V por 90 minutos. O gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) por 20 segundos e descorado em água destilada por 20 minutos em leve agitação orbital. Posteriormente, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK[®] Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. N^o. 172.8468) e um computador. A análise do gel foi realizada com o programa de aquisição e análise de imagens da KODAK[®] 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. N^o. 811.2344).

Na amplificação da sequência conservada do gene 16S rDNA foi utilizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizado os “primers” universais 27F e 1492R (Heuer et al., 1997). Para esta reação foi utilizado o kit de Taq da empresa Promega[®] (GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase).

Para uma reação de PCR com volume final de 50 μl , foram utilizados 50 ng de DNA molde; tampão de reação 10X da Taq DNA polimerase (10 mmol l-1 de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol l-1 de KCl); 1,5 mmol l-1 MgCl_2 ; 200 $\mu\text{mol l-1}$ dNTP com iguais concentrações de dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 25 pmol de cada iniciador: 27F [5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'] e 1492R[5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'] (Heuer et al., 1997). A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 termocycler (MJ Research) com uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento à temperatura de 60 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min, e uma extensão final a 72 °C por 30 min. Após a reação, os produtos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2 %) a 90V por 90 minutos. O gel foi corado e fotografado como descrito acima.

2.5.2- Sequenciamento do gene 16S rDNA

A purificação dos produtos de amplificação foi feita usando o kit de purificação de DNA (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit cat. A1120). Após a purificação, as amostras contendo os isolados purificados foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia. As

reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático AppliedBiosystems (ABI 3730), com auxílio do Kit BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems, USA), e com iniciadores AmpR ou AmpF. Os contigs foram montados com auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler. As sequências foram então comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) e alinhadas usando o programa Mega 3.1, método Neighbor-Joining e o modelo de Kimura 2-parameter com 5000 valores de bootstrap.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.- Número Mais Provável (NMP)

A estimativa das bactérias diazotróficas endofíticas, dos diferentes solos mostrou um número considerável de bactérias diazotróficas nos solos das áreas de coleta, variando de 1,86 a 6,68 log₁₀ células por grama de massa fresca de raiz de feijão-caupi (tabela 2). De acordo com Dobbelaere et al. (2003), o solo é uma importante fonte de bactérias diazotróficas endofíticas ou rizosféricas, que utilizam os exsudados radiculares, liberam substâncias promotoras de crescimento e/ou participam da FBN.

A melhor fertilidade observada nos solos de Magé pode ter favorecido o maior número de isolados obtidos tanto na rizosfera quanto no interior das raízes de feijão-caupi cultivado nos solos na região. De acordo com Hungria e Vargas (2000), a população de microrganismos do solo pode ser afetada pela fertilidade do solo, principalmente por uma concentração elevada de alumínio tóxico e devido ao pH acidificado, condições observadas nos solos da região de Cachoeiras de Macacu.

Menor valor de densidade de bactérias diazotróficas foi obtido do interior da raiz de feijão-caupi, em todos os solos, em comparação ao obtido na rizosfera. Isso provavelmente é devido à interação endofítica precisar de uma coevolução de milhares de anos entre a espécie de planta hospedeira e os microrganismos endofíticos (Oliveira, et al., 2003). E geralmente espécies de gramíneas é que são

consideradas hospedeiras comuns de *Azospirillum spp* (Tarrand et al., 1978; Baldani et al., 1999), contribuindo para maior multiplicação destas bactérias no solo e, conseqüentemente, para maior probabilidade de isolamento (Melloni et al., 2004).

Tabela 2: Estimativa da ocorrência de bactérias formadoras de película em rizosfera e raízes de plantas de feijão-caupi cultivados em diferentes solos, utilizando-se o meio de isolamento NFb, pelo método NMP.

Localidades/Propriedades	Ambiente	NMP*	
Cachoeiras de Macacu	1	Rizosfera	5,41
		Int. Raiz	3,50
	2	Rizosfera	4,64
		Int. Raiz	1,86
Magé	3	Rizosfera	5,42
		Int. Raiz	4,77
	4	Rizosfera	6,68
		Int. Raiz	3,32

*Log₁₀ número de bactérias g⁻¹ de raiz

O número de isolados bacterianos obtidos da rizosfera e raiz de feijão-caupi nos diferentes solos variou ao longo de todo o processo de isolamento, purificação e estocagem. Foram observados isolados com duas ou mais colônias diferentes e todas formando películas aerotácicas. No entanto, com o decorrer do processo de purificação, algumas delas perderam a capacidade de formar película.

A quantidade estocada de isolados dos solos das propriedades 2, 1 e 4 foi de 10, 12, e 10, respectivamente. Não foi estocado nenhum isolado da propriedade 3, entretanto, este solo foi o que apresentou maior número de isolados, tanto na rizosfera quanto no interior da raiz de feijão-caupi, no início dos isolamentos e repicagens. Essa considerável perda no número de isolados originados do meio NFb no decorrer do isolamento e purificação, também foi

observada por Videira (2012) num estudo sobre a comunidade de bactérias diazotróficas associada a plantas de capim-elefante. De acordo com Baldani (2015), muitas vezes esses isolados aproveitam traços de nitrogênio carregados na alça de platina durante a repicagem para um desenvolvimento inicial, porém no processo de purificação só os que apresentam potencial de formar a película aerotóxica sobrevivem.

De um total de 166 isolados bacterianos obtidos, apenas 32 foram considerados no final do isolamento, todos crescidos em meio de cultura NFb, que favorece o crescimento de *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*. Além disso, na reação de Gram os mesmos foram classificados como Gram-negativos, apresentando células individualizadas em forma de bastonetes (figura 3).

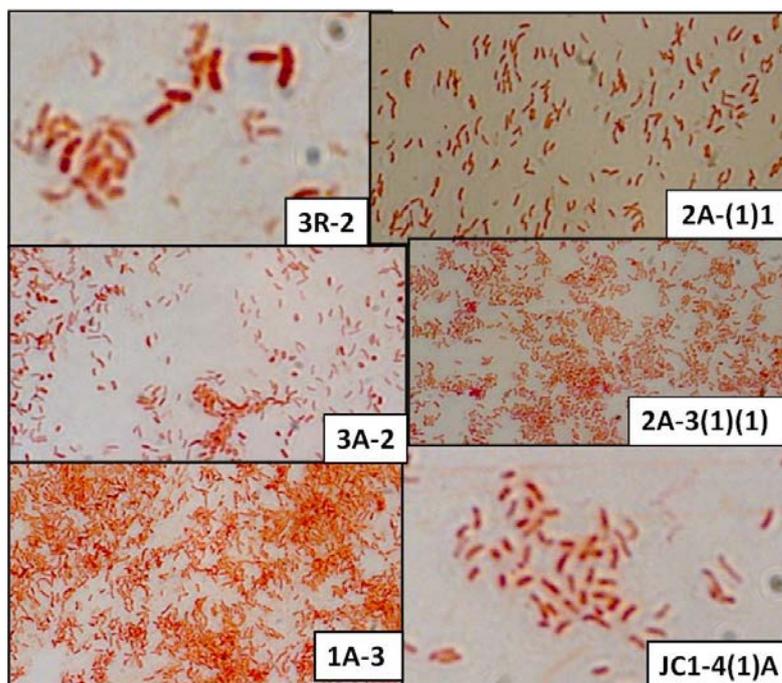


Figura 3: Morfologia celular dos isolados bacterianos, Gram colorido, obtidos de raiz e rizosfera de feijão-caupi (Cv Mauá), observadas em microscópio ótico (aumento de 100X).

3.2- Caracterização morfocultural dos isolados

As colônias apresentaram coloração variada, de acordo com o meio de cultivo utilizado (figura 4). Todos os isolados apresentaram colônias individuais nos meios utilizados, porém com características morfoculturais diferentes entre os diferentes meios empregados: NFb (3x), Batata e Nutriente Agar. Em meio batata houve maior produção de goma quando comparado com outros meios de cultivos,

o que de acordo com Silva (2014) pode ser devido a maior disponibilidade de nutrientes nesse meio, favorecendo um rápido crescimento das colônias.

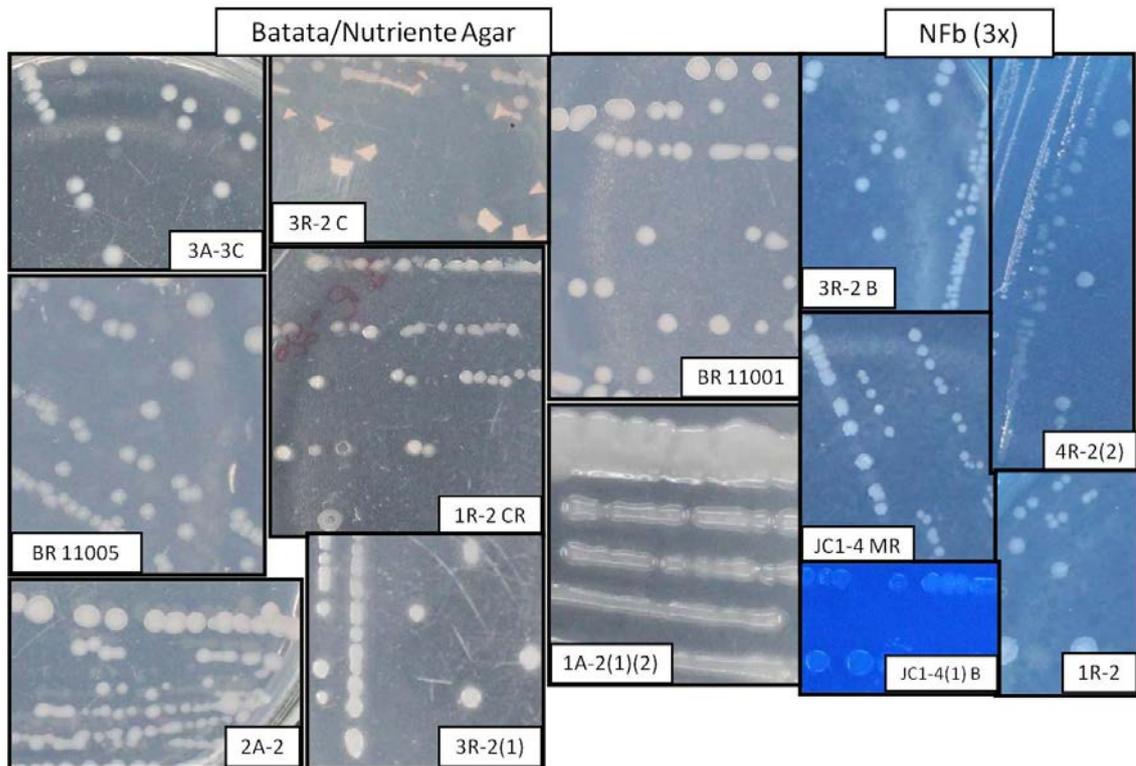


Figura 4: Morfologia das colônias dos isolados obtidos da rizosfera de feijão-caupi, cv Mauá. Observação realizada no quinto dia de crescimento em meio NFb (3x), Batata e nutriente ágar.

Na caracterização morfocultural, 100 % dos isolados tiveram crescimento rápido, pH do meio alcalino, colônias com forma circular e elevação plana. A maioria dos isolados apresentou borda da colônia inteira (81,25 %) e coloração branca (71,87 %). Metade dos isolados formaram colônias ≤ 2 mm de diâmetro.

A caracterização possibilitou a divisão dos isolados em seis grupos, os quais apresentaram considerável grau de discriminação de suas características morfoculturais (figura 5). O isolado bacteriano 3R-2 B não se agrupou, apresentando baixa similaridade com os demais.

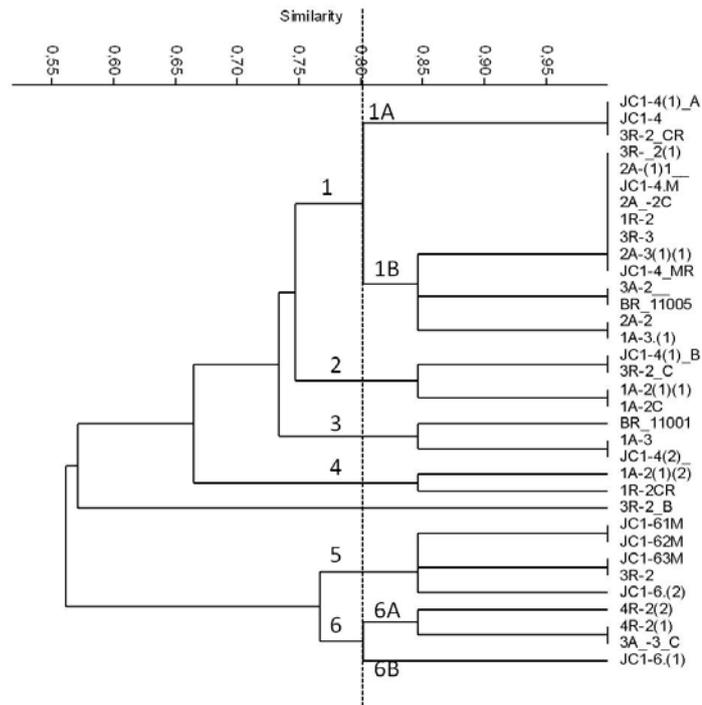


Figura 5: Dendrograma de similaridade com base em características morfoculturais de isolados da rizosfera e raiz de feijão-Caupi, pelo coeficiente de Jaccard e pelo método de agrupamento UPGMA.

Com um índice de 80 % de similaridade, o grupo 1 foi composto pelos isolados com brilho opaco, e se subdividiram em 1A e 1B devido a borda da colônia ondulada e inteira, respectivamente. Os isolados com brilho translúcido e transparente se agruparam nos grupos 2 e 4, respectivamente. O grupo 3 foi formado pelos isolados com consistência gomosa e os grupos 5 e 6 por isolados com coloração amarela/azulada e amarela, respectivamente. O grupo com maior número de isolados foi o 1, agrupando 15 dos 32 isolados.

Dos grupos morfoculturais formados, os grupos 1 e 3 apresentaram alto grau de similaridade com as estirpes referência de *Azospirillum brasilense* BR 11005 e BR 11001, respectivamente. Já os isolados dos grupos 2, 5 e 6 apresentaram baixa similaridade morfocultural com as estirpes referência, o que indica pertencerem a outras espécies de diazotróficos.

As estirpes referência BR 11005 e BR 11001 foram isoladas de raízes de trigo na região Sul e rizosfera de *Digitaria* na região do Rio de Janeiro, respectivamente, e apresentam habilidade de colonizar tanto a superfície quanto

as partes internas das raízes, o que lhes confere uma maior especificidade simbiótica (Baldani et al., 1983; Baldani et al., 1986).

Para as 11 características morfoculturais estudadas, foi possível observar índice de similaridade de 100 % entre o isolado 3A-2 e a estirpe referência BR 11005 de *Azospirillum brasilense*, o que é bastante animador, uma vez que segundo Bashan et al. (2004), bactérias dessa espécie são muito promissoras entre o grupo de bactérias promotoras do crescimento de planta.

3.3- Caracterização Fisiológica

3.3.1- Determinação colorimétrica da produção de ácido indol-acético (AIA)

No presente estudo, os isolados bacterianos apresentaram comportamento distinto quanto à produção de compostos indólicos, e todos foram capazes de produzir AIA na presença de L-triptofano, principal precursor da biossíntese desse fitohormônio (Woodward e Bartel, 2005). Porém, observou-se uma baixa produção em relação aos padrões de auxina utilizados (Figura 6)

De acordo Silveira (2008) as bactérias diazotróficas produtoras de AIA podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros estágios de desenvolvimento e no processo de enraizamento.

Produção de AIA (μg de indólicos.mg de ptn⁻¹)

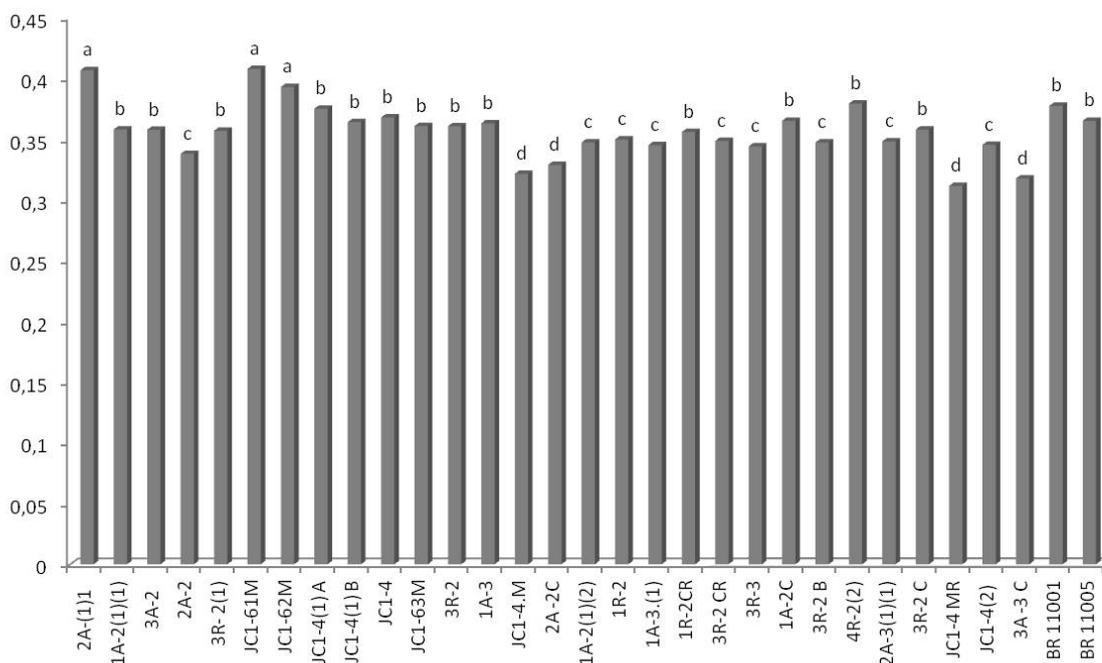


Figura 6: Produção de compostos indólicos dos isolados bacterianos de raiz e rizosfera de feijão- Caupi. Barras seguidas por mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Media de três repetições.

Entre os isolados, destacaram-se o 2A-(1)1, JC1-61M e o JC1-62M que apresentaram maior produção de compostos indólicos, nas condições testadas, inclusive em relação às estirpes padrões de *Azospirillum brasilense* utilizados. Em contrapartida, os isolados JC1-4.M, 2A -2C, JC1-4 MR e 3A-3C obtiveram menor produção (figura 6). De forma semelhante, Ashrafuzzaman et al. (2009) observaram produção de AIA apenas em 6 (60%) dos seus isolados, sendo que destes apenas dois foram considerados bons produtores.

Essa variação quantitativa na produção de AIA entre isolados também foi observada por Radwan et al. (2004), em que diversas linhagens de *Azospirillum* produziram quantidades diferentes de compostos indólicos, sendo constatado nas linhagens de *Azospirillum brasilense* níveis mais elevados em relação às linhagens de *Azospirillum lipoferum*.

De acordo com Pedraza et al. (2004), vários fatores podem interferir na quantidade de AIA produzida por estirpes bacterianas, dentre eles a espécie em estudo e as condições de cultivos referentes a presença ou ausência de

L-triptofano, oxigenação, pH, e a fase de crescimento em que se encontra a bactéria.

Patten e Glick (1996) observaram que a capacidade dos microrganismos produzirem auxinas está relacionada a fatores de patogenicidade e de estímulos ao crescimento vegetal e alguns gêneros de microrganismos são reconhecidamente produtores de AIA, dentre eles: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Rhizobium*, assim como *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acetobacter diazotrophicus*, e *Bradyrhizobium japonicum*. Já Zakharova et al. (1999), apontaram que 80% das bactérias isoladas de rizosferas são capazes de produzir AIA.

Marchioro (2005), em um estudo sobre a produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio, observou que os isolados de *Herbaspirillum* e *Burkholderia* produziram em média 12 e 1,7 μg de AIA mL^{-1} de cultura, respectivamente, a partir do primeiro dia de crescimento. Já as linhagens do gênero *Azospirillum* tiveram uma produção de 9,47 μg AIA mL^{-1} no primeiro dia, sendo essa produção de 43,4 μg AIA mL^{-1} no segundo dia.

A produção de AIA pelos isolados de raízes e rizosfera de feijão-caupi variou entre 0,31 a 0,41 μg de compostos indólicos mg de proteína⁻¹. Apesar de serem considerados baixos em comparação aos valores constatados por Marchioro (2005), esses valores estão dentro da faixa observada por Videira (2012), em que os menores valores de compostos indólicos foram produzidos por bactérias isoladas do meio JNFb e identificadas como *A. brasilense*.

De acordo com Dobbelaere et al. (2003), os fitohormônios influenciam nos processos fisiológicos das plantas em concentrações extremamente baixas, uma vez que a concentração de sinais hormonais é crítico para a regulação de vários processos fisiológicos nas plantas, as alterações locais de níveis dos fitohormônios podem conduzir a alterações características no crescimento e desenvolvimento da planta. Dessa forma, a quantidade de compostos indólicos produzidos pelos isolados do presente estudo, mesmo que em baixa quantidade, podem se tornar relevantes na promoção de crescimento de feijão-caupi quando inoculado com os mesmos.

3.3.2- Produção de sideróforos

No presente estudo, todos os isolados apresentaram um halo de coloração amarelo-alaranjado ao redor da colônia, característico da produção de sideróforos (figuras 7 e 8). Os sideróforos atuam como promotores de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, sequestrando a maioria do Fe^{+3} disponível e desta forma facilitando o crescimento vegetal (Oliveira et al., 2003), e diminuindo também o uso de pesticidas químicos (Loper e Lindow, 1987).

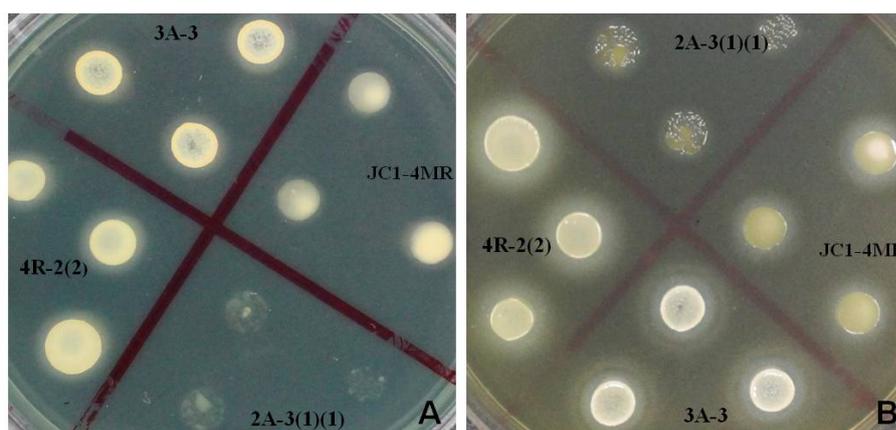


Figura 7: Formação de halo amarelo-alaranjado em meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH_4Cl a 0,1% e CAS de alguns isolados de rizosfera e raiz de feijão-Caupi aos 7 (A) e 14 (B) dias de crescimento.

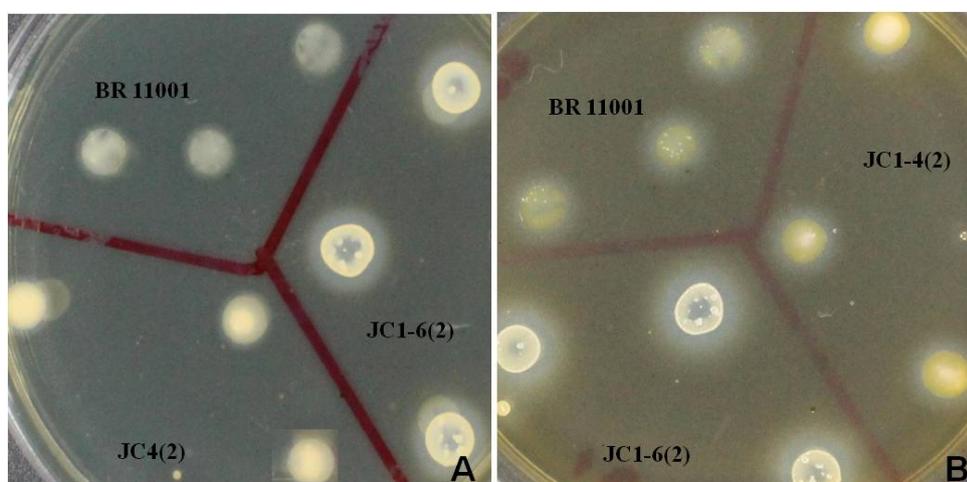


Figura 8: Formação de halo amarelo-alaranjado em meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH_4Cl a 0,1% e CAS de alguns isolados de rizosfera e raiz de feijão-Caupi e da estirpe padrão BR 11001 aos 7 (A) e 14 (B) dias de crescimento.

Na avaliação da produção de sideróforos como reportado em Tortora et al. (2011), observou-se que os isolados JC1-61M, JC1-62M, JC1-63M, 1A-3(1), 3R-2 CR, 2A-3(1)(1), 4R-2(1), JC1-4 MR, JC1-6(2) e 3A -3C apresentaram um aumento no halo produzido na segunda avaliação (14dias) em relação à primeira (7dias). Em contrapartida, apesar de os isolados 1A-2(1)(1), 3A-2, 1A-3, 1A-2(1)(2), 3R-2 B e JC1-6(1) apresentarem halo característico, não se observou aumento no tamanho destes entre os dois dias de avaliação (tabela 3).

Silva (2014), em um estudo de isolamento e seleção de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro, constatou que somente alguns isolados formam positivos para o teste de sideróforos, apresentando halo característico da produção de sideróforos e que todos eles foram provenientes do meio de cultivo cuja fonte de carbono foi ácido málico (NFb e JNFb). Já Beneduzi et al. (2013), avaliando a diversidade e as habilidades de bactérias promotoras de crescimento isoladas de cana-de-açúcar, constataram que 76% , de um total de 516, dos isolados foram capazes de produzir sideróforos.

Os isolados JC1-61M e JC1-62M, que apresentaram maior produção de compostos indólicos, tiveram também melhor produção de sideróforos, revelando-se como potenciais para a promoção de crescimento vegetal em feijão-caupi a ser constatado em experimentos futuros em casa-de-vegetação.

Tabela 3: Indicação de produção de sideróforos de diferentes isolados de raiz e rizosfera de feijão Caupi, usando meio NFb sólido, sem azul de bromotimol e com NH_4Cl a 0,1% e CAS. Utilizando a estirpe Sp7 de *A. brasilense* como controle aos 7 e 14 dias após incubação.

Isolados	7º dia	14º dia
BR 11001	+	++
2A-(1)1	+	+
1A-2(1)(1)	+	+
3A-2	+	++
2A-2	+	++
3R- 2(1)	+	++
JC1-61M	+++	+++
JC1-62M	+++	+++
JC1-4(1) A	+	++
JC1-4(1) B	+	++
JC1-4	+	++
JC1-63M	+++	+++
1A-3	+	+
JC1-4M	+	++
2A -2C	-	+
1A-2(1)(2)	+	+
1R-2	+	++
1A-3(1)	++	+++
1R-2CR	++	++
3R-2 CR	+++	+++
3R-3	+	++
1A-2C	+	+
3R-2 B	+	+
4R-2(2)	+++	+++
2A-3(1)(1)	-	+
3R-2 C	-	++
4R-2(1)	+++	+++
JC1-4 MR	++	+++
JC1-6(1)	+	+
JC1-4(2)	+	++
JC1-6(2)	+++	+++
3A -3 C	+++	+++

Legenda: + (Produz), ++ (boa produtora), +++ (ótima produtora), - (não produz).

De um modo geral, os isolados da rizosfera de feijão-caupi apresentaram produção de sideróforos igual ou superior à estirpe padrão utilizada como controle positivo (BR 11001). De acordo com Cattelan (1999), por serem substâncias capazes de complexar Fe^{3+} , a produção de sideróforos é um mecanismo que

normalmente confere vantagem na competição por nutrientes de baixa disponibilidade entre os microrganismos do solo. Nesse contexto, uma rizobactéria que produz sideróforos pode suprir um organismo deletério, diminuindo a disponibilidade de Fe.

3.3.3- Atividade de redução de acetileno (ARA)

Todos os isolados foram capazes de reduzir o acetileno a etileno, o que indica a presença da nitrogenase, enzima responsável pela redução de N_2 para NH_3 . Porém, foram observadas variações significativas nas taxas de etileno produzidas pelos mesmos. Essas variações foram explicadas por Han e New (1998), que observaram que a capacidade dos isolados reduzirem acetileno é variável, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que torna o ARA uma metodologia indireta para a avaliação da FBN.

Apesar de ser uma metodologia indireta, o ARA é o método mais amplamente utilizado para avaliar a fixação de nitrogênio da enzima nitrogenase, devido à sua simplicidade e baixo custo, apresentando grande importância nos estudos de sistemas fixadores (Boddey et al., 1995).

De acordo com a quantidade de etileno produzido, foi possível o agrupamento dos isolados em cinco grupos (tabela 4).

Tabela 4: Atividade de redução de acetileno (ARA) dos isolados bacterianos obtidos da rizosfera e raiz de feijão-caupi (Cv Mauá)

Grupos	ARA		Nº de isolados	
	(nmol de C_2H_4 . mg de proteína ⁻¹)		48 hs	72hs
	48 hs	72hs		
1	<100	<100	3	10
2	100-600	100-300	6	6
3	680-1500	320-600	4	7
4	1900-4400	605-1105	10	4
5	>17000	1420-9200	9	5

Na média, a taxa de atividade da nitrogenase, expressa em nmol C_2H_4 . mg de proteína⁻¹, variou de 0,5 a 42468,50. Maiores valores foram observados na

avaliação aos 48 h após repicagem, em que os isolados demonstraram melhor potencial de fixação em meio de cultura.

De um modo geral, houve uma diminuição na atividade com o passar do tempo de crescimento dos isolados em meio de cultivo. Apenas os isolados 1R-2CR, 3R-3, 1A-2C e a estirpe padrão BR 11005 mantiverem um nível alto de atividade, mesmo com o passar dos dias de crescimento, demonstrando que possuem alto potencial para promoção de crescimento. Além disso, esses mesmos isolados também foram capazes de produzir auxina, que além de atuar no crescimento vegetal, pode estimular na atividade da nitrogenase (Tien et al., 1979).

Na análise realizada à 48h após repicagem, a maioria dos isolados apresentou taxas de atividade da nitrogenase acima de 1900 nmol de C_2H_4 . mg de proteína⁻¹. Já à 72 h, a maioria apresentou produção de até 600 nmol de C_2H_4 . mg de proteína⁻¹. Esses valores de ARA observados nos estudos estão relativamente altos em comparação aos obtidos por Sabino et al.(2012) e por Viana et al.(2015) e de acordo com Videira (2012) são considerados indicativos de alta atividade da enzima nitrogenase.

3.3.4- Solubilização de fosfato

Neste estudo, a solubilização de fosfato de cálcio não foi um fenômeno generalizado entre os isolados. Dos 32 isolados da rizosfera e raiz de feijão-caupi, apenas 8 (25%) produziram um halo translúcido ao redor das colônias cultivadas em meio sólido NBRIP (figura 9). Resultados semelhantes foram observados por Beneduzi et al. (2013), em que apenas 26% do total de 516 isolados apresentaram capacidade de solubilizar fosfato.

O fósforo (P) é um dos nutrientes, juntamente com o nitrogênio, mais requerido para o desenvolvimento das plantas. Porém, devido a sua grande fixação nos solos tropicais, que são altamente intemperizados e com cargas do solo em sua maioria positivas (Taiz e Zeiger, 2004), a concentração de P solúvel disponível para assimilação pelas raízes vegetais é muito baixa (Raghothama, 1999). Nesse contexto, microrganismos capazes de solubilizar compostos fosfatados inorgânicos do solo são muito importantes no crescimento vegetal, além de uma alternativa para aumentar a eficiência da adubação com fosfatos solúveis e diminuir os custos de produção (Rajankar et al., 2007).

Os halos de solubilização produzidos pelos isolados de rizosfera e raiz de feijão-caupi foram pequenos, apresentando um índice de solubilização (IS) $<1,5$. A estirpe padrão BR 11281 de *Gluconobacter diazotrophicus*, destacou-se das demais apresentando um IS= 2,69. Já a estirpe BR 11366 de *Burkholderia tropica*, apresentou IS=1,55. A estirpe BR 11001 também apresentou capacidade de solubilização de fósforo, porém com IS $<1,5$, se assemelhando aos isolados do trabalho. Por outro lado a outra estirpe de *Azospirillum brasilense* (BR 11005) não apresentou halo de solubilização.

De acordo com Oliveira et al. (2003), o principal mecanismo de ação na solubilização de P mineral é através dos ácidos orgânicos sintetizados por microrganismos, o que também promove a acidificação da célula microbiana e o ambiente ao seu redor. Sobral (2003), estudando bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) endofíticas e epifíticas na cultura da soja, relatou que os grupos bacterianos mais frequentes, que apresentam produção de AIA e solubilização de P, são as *Pseudomonadaceae* e *Enterobacteriaceae*.

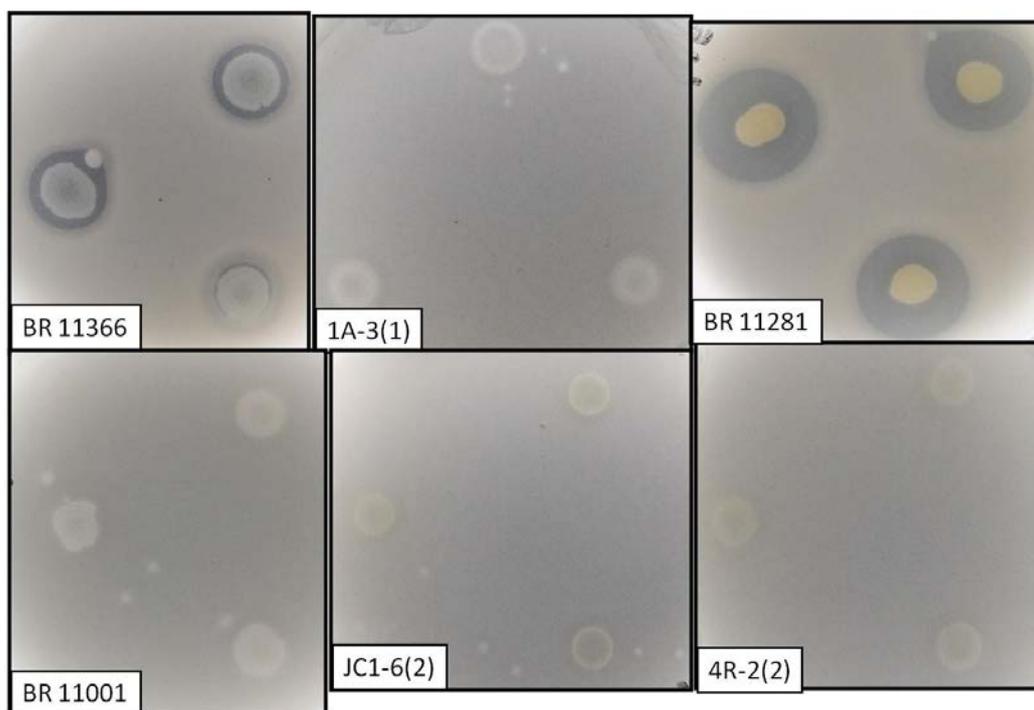


Figura 9: Formação do halo de solubilização de Pi pelas estirpes padrões e alguns isolados da rizosfera e raiz de feijão-Caupi.

Oliveira et al. (2012), estudando o potencial de solubilização de fósforo e produção de AIA por *Trichoderma spp.*, observaram que a concentração de fósforo solubilizado gradualmente aumentou, na maioria dos isolados, de dois a

seis dias, e diminuiu em seguida, no oitavo dia de crescimento. Por outro lado Assumpção et al. (2009), constataram que, entre os 62 inoculados avaliados, apenas 24 (39%) tiveram capacidade de solubilização de fosfato, formando halo. O maior halo de solubilização de fosfato foi observado no isolado 67A(57) de *Enterobacter* sp., com 8,3 cm, e o menor no isolado 122D(61) de *Acinetobacter* sp., com 0,2 cm.

Em relação à classificação quanto a solubilização de fosfato, os 8 isolados e a estirpe padrão BR 11001 apresentaram baixa solubilização. No entanto, as estirpes BR 11366 e BR 11281 apresentaram média e alta solubilização, respectivamente. As mesmas (BR 11281 e BR 11366) iniciaram a solubilização até o terceiro dia após a inoculação e, portanto, podem ser consideradas precoces.

3.3.5- Caracterização Molecular

As análises das sequências parciais do gene 16S rDNA, obtidas a partir do produto de PCR e que foram submetidas às análises comparativas no banco de dados do NCBI, permitiram a identificação taxonômica de 27 isolados em nível de gênero, no qual os isolados apresentaram índice de similaridade, variando entre 98 a 100%, com sequências depositadas no banco de dados (tabela 5).

Tabela 5: Similaridade entre as sequências do gene que codifica o 16S DNAr das bactérias isoladas de raiz e rizosfera de feijão-caupi com as sequências depositadas no banco de dados (GenBank).

Isolados	Número de acesso	Descrição	E-value	Max. Identidade
2A-(1)1	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
1A-2(1)(1)	HE577328.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
3A-2	CP007795.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	98%
2A-2	NR_118155.1	<i>Pseudomonas kuykendall</i>	0.0	100%
3R- 2(1)	KP676402.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
JC1-61M	NR_118155.1	<i>Pseudomonas kuykendall</i>	0.0	100%
JC1-4(1) A	HE577328.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
JC1-4(1) B	HE577328.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
JC1-4	CP007797.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
JC1-63M	NR_118155.1	<i>Pseudomonas kuykendall</i>	0.0	100%
3R-2	NR_118155.1	<i>Pseudomonas kuykendall</i>	0.0	100%
1A-3	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
JC1-4M	CP007797.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
2A -2C	CP007795.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	100%
1A-2(1)(2)	KP282790.1	<i>Rhizobium pusense</i>	0.0	98%
1R-2	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
1A-3(1)	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
1R-2CR	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
3R-2 CR	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
3R-3	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
1A-2C	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
3R-2 B	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
4R-2(2)	NR_118155.1	<i>Pseudomonas kuykendall</i>	0.0	100%
2A-3(1)(1)	CP007794.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
3R-2 C	HE646778.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%
4R-2(1)	NR_118155.1	<i>Pseudomonas kuykendall</i>	0.0	100%
JC1-6(1)	CP007797.1	<i>Azospirillum brasilense</i>	0.0	99%

Do total de 28 isolados da rizosfera e raiz de feijão-caupi sequenciados, 6 foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, 20 ao gênero *Azospirillum* e um isolado ao gênero *Rhizobium*.

De acordo com Cardoso e Nogueira (2007), os exsudatos radiculares influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos do solo, capazes de utilizar eficientemente determinado substrato. Por sua vez, os microrganismos influenciam a composição e a quantidade de vários componentes dos exsudatos radiculares, por meio de seus efeitos no metabolismo das células da raiz, bem como no estado nutricional das plantas.

Os isolados 2A-2, JC1-61M, JC1-63M, 3R-2, 4R-2(2), 4R-2(1) apresentaram elevado grau de similaridade (100 %) com sequências de

Pseudomonas kuykendalli. Já o isolado 1A-2(1)(2) apresentou alta similaridade com *Rhizobium pusense*, enquanto que todos os outros 20 isolados com *Azospirillum brasilense*.

De acordo com Okon e Labandera-Gonzales (1994), bactérias do gênero *Azospirillum* estimulam a densidade e o comprimento dos pêlos radiculares, além da taxa de aparecimento das raízes laterais e aumento da área de superfície das raízes, sendo que a intensidade desses efeitos sobre a morfologia radicular é dependente das espécies de plantas e cultivar em associação. Estes efeitos sobre a morfologia e fisiologia radicular causados na simbiose com *Azospirillum* sp., podem favorecer maior captação de nutrientes minerais e água, resultando em crescimento das plantas mais rápido.

O gênero *Pseudomonas* apresenta algumas espécies geralmente caracterizadas como potenciais biotecnológicos devido à capacidade de promoção de crescimento vegetal, através de mecanismos de controle de patógenos (Compant et al. 2005). Além disso, as espécies *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *P. chlororaphis* já são veiculadas em produtos para biocontrole de fungos fitopatogênicos habitantes do solo (Choudhary et al., 2009). Dias (2011) observou que espécies de *Pseudomonas* isoladas do solo pós-cultivo de hortaliças apresentaram capacidade de formar biofilmes, produzir de sideróforos e ácido indol-acético e compostos indólicos, de solubilizar fosfato de cálcio com baixa e média eficiência de solubilização, além de promover o crescimento da couve de folha.

As espécies do gênero *Rhizobium* foram tradicionalmente isoladas de nódulos e da rizosfera de diversas leguminosas e têm sido relatados como promotores de crescimento de plantas devido a sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Tian et al., 2008). A espécie *Rhizobium pusense*, Strain NRCPB 10T, foi isolada do solo da rizosfera de grão de bico (*Cicer arietinum* L.) cultivado em Pusa, Nova Deli, norte da Índia. Foi classificada como Gram-negativo, colônias circulares de 2,0-3,0 mm de diâmetro, crescimento em até 3 dias a 28°C. Não foi possível amplificar os seus genes *nod A* e *nifH*, no entanto, sugerindo se tratar de uma espécie não-nodulante (Panday et al., 2011).

No alinhamento das sequências de bases dos isolados, pelo método Neighbor-Joining, foram utilizados as estirpes reconhecidas como padrões dos gêneros aos quais os isolados apresentaram similaridade no banco de dados do

NCBI: *Azospirillum brasilense* strain DSM 1690; *Pseudomonas fulva*; *P. vranovensis* strain CCM7279; *P. asplenii* e *P. graminis*. Como esperado, os isolados se agruparam às estripes padrões dos gêneros em que foram pré-identificadas (figura 10).

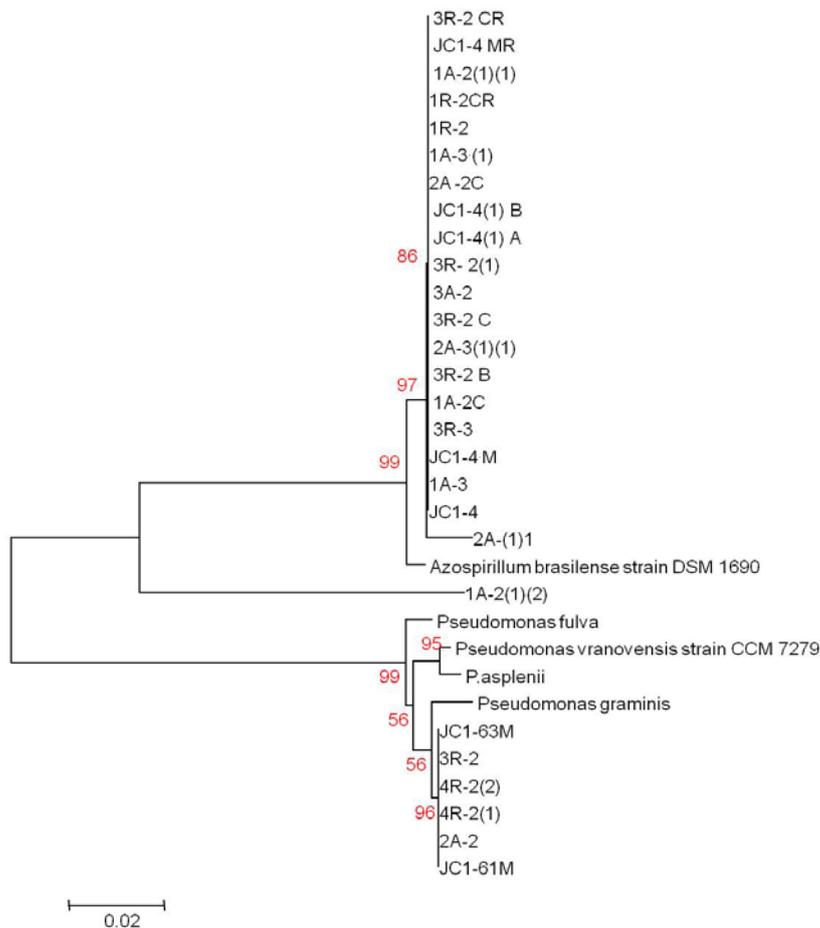


Figura 10: Dendrograma de similaridade com base nas sequências do gene que codifica o 16S RNAr das bactérias que foram comparadas com o banco de dados NCBI e alinhadas usando o programa Mega 3.1, método Neighbor-Joining.

Apesar do objetivo inicial do trabalho ter sido o isolamento de rizobactérias do gênero *Azospirillum*, o isolamento de representantes de outros gêneros e ainda formadores de película aerotóxica em meio NFb é muito importante e abre um leque para estudos das interações entre esses microrganismos e as espécies de plantas hospedeiras.

Nesse contexto, considerando os resultados apresentados e pela comparação entre as sequências dos isolados e as sequências depositadas no banco de dados GenBank, foi detectada maior homologia entre os isolados com

gêneros de bactérias já descritas como fixadoras de nitrogênio (Baldani e Baldani, 2005) e potenciais para promoção de crescimento vegetal.

4 CONCLUSÕES

Foram isoladas 32 bactérias diazotróficas da rizosfera e raiz de feijão-caupi, cultivar Mauá, sendo 6,7% associados às raízes (endofíticas) e 93,3% provenientes do solo rizosférico (associativas). As características morfoculturais das rizobactérias possibilitaram a sua caracterização inicial e agrupamento com as estirpes padrão utilizadas. Do total de rizobactérias, 100% apresentaram produção de sideróforos, produção de AIA e atividade da enzima nitrogenase, 25% solubilização de fosfato e apenas 6% apresentaram os quatro mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Foram obtidos 20 isolados pertencente ao gênero *Azospirillum spp*, 6 pertencentes ao gênero *Pseudomonas spp* e um isolado identificado como *Rhizobium*.

5 REFERÊNCIAS

- Adesemoye, A. O.; Kloepper, J. W. (2009) Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1-12.
- Ahmad,F.; Ahmad, I.; Khan, M. S. (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163:173-181.
- Ashrafuzzaman, M.; Hossen, F. A.; Razi Ismail, M.; Anamul Hoque, Md.; Islam Zahurul, M.; Shahidullah, S. M.; Meon, S. (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8:1247-1252.
- Assumpção L. C.; Lacava, P.T.; Dias, A. C. F.; Azevedo, J. L.; Menten, J. O. M. (2009) Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, 44:503-510.

- Baldani, V. L. D.; Döbereiner, J. (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 12:433-439.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I. , Döbereiner J. (1983) Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.*;29:924-929.
- Baldani, V. L .D., Alvarez, M .A. de B., Baldani, J. I.; Döbereiner, J. (1986) Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*, 90:35-46.
- Baldani, J. I., Azevedo, M. S.; Reis, V. M., Teixeira, K. R. S., Olivares, F. L., Goi, S. R, Baldani, V. L. D., Döbereiner, J. (1999) Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: Siqueira, J. O., Moreira, F. M. S., Lopes, A. S., Guilherme, L. R. G., Faquin, V, Furtini Neto, A. E., Carvalho, J.G., (Eds.) Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS/UFLA/DCS, p.621-666.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., Döbereiner, J.(2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fert. Soils*. 30:485-491.
- Bashan, Y., Holguin, G., Bashan, L. E. (2004) *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can. J. Microbiol.*,50:521-577.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 77:549-579.
- Beneduzi, A.; Moreira, F.; Costa, P. B.; Vargas, L. K.; Lisboa, B. B.; Favreto, R.; Baldani, J. I.; Passaglia L. M. P. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology* 63:94– 104.
- Berraqueiro, F. R.; Baya, A. M.; Cormenzana, A. R. (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *ARS Farmacéutica*, 17:399-406.
- Boddey, R. M., Boddey, L. H., Urquiaga, S. (1990) A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Itaguai: Emprapa-CNPBS,. 37p. (Documento, 6).
- Boddey RM, Döbereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fert. Res.* 1995;42:241-250.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*,72:248-254.

- Cattelan, A. J. (1999) *Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal*. Embrapa Soja, Londrina, PR, 36p. (Documentos, 139).
- Cattelan, A.J.; Hartel, P.G. (2000) Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Tópicos em Ciência do Solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, MG, p.213-234.
- Choudhary, D. K.; Prakash, W. A. V.; Johri, B. N. (2009) Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation. *Current Science*,97:170-179.
- Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clement, C.; Barka, E. A. (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environment Microbiology*, 71:4951-4959.
- Dias, A. (2011) Caracterização e seleção de bactérias fluorescentes promotoras de crescimento de couve. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Seropédica - RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro- UFRRJ, p155.
- Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia M.V. (2009) Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:3-11.
- Dobbelaere, S.; Vanderleyden, J.; Okon, Y. (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22:107-149.
- Döbereiner, J.; Andrade, V. de O.; Baldani, V.L.D. (1999) Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica- RJ, Embrapa Agrobiologia. 38p. (Documentos 110).
- Ferreira, D. F. (2003) Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR). Versão 4.3. Lavras: UFLA.
- Gordon S.A.; Weber R.P. (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26:192-195.
- Han, S. O., New, P.B. (1998) Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum* . *Microbial Ecol.*,36:193-201.
- Heuer ,H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. ,Wellington, E. M. H. (1997) Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *Appl. Environ. Microb.*; 63:3233-3241.
- Hungria M.; Vargas, M.A.T. (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil .*Field Crops Research*, 65:151-164.

- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil.*;331:413-425.
- Hungria, M. (2011) Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo Custo. – Embrapa Soja, Londrina, PR,.36p. (Documentos 325).
- Hungria, M. Nogueira, M. A.Araujo, R. S. (2013) Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biol Fertil Soils.* 49:791-801.
- Kloepper, J.W., Schroth, M.N., (1978). Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes, Fourth International Conference on Plant Pathogen Bacteria, Angers, France, 2: 879–882.
- Lemanceau, P.; Robin, A.; Mazurier, S.; Vansuyt, G. (2007) Implication of pyoverdines in the interactions of fluorescent pseudomonads with soil microflora and plant in the rhizosphere. *Soil Biology*, 12:165-192.
- Lemos, M. T. O. (2009) *Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em quatro espécies arbóreas nativas do Brasil*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Jaboticabal-SP, Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP, p. 59.
- Loper, J. E., Lindow, S. E. (1987) Lack of evidence for in situ fluorescent pigment production by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* on bean leaf surfaces. *Phytopathology*, 77:1449-1454.
- Marchioro, L. E. T. (2005) Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio [Dissertação em Microbiologia]. Curitiba:Universidade Federal do Paraná;-UFPR,76p.
- Melloni, R., Nóbrega, R. S.A., Moreira, F. M. S., Siqueira, J.O. (2004) Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. *R. Bras. Ci. Solo.*,28:85-93.
- Mockaitis, K.; Estelle, M. (2008) Auxin Receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Development Biology*, 24:55–80.
- Moreira, F. M. S.; Silva, K.; Nóbrega, R. S. A.; Carvalho, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1:74-99.
- Nautiyal, C. S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 70:265-270.

- Okon, Y.; Labandera-Gonzales, C. A. (1994) .Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem, Elmsford, 26:1591-1601.
- Oliveira, A. L. M, Urquiaga, S, Döbereiner, J, Baldani, J. I. (2002) The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. Plant Soil. 242:205-215.
- Oliveira, A .L. M, Urquiaga, S., Baldani, J. I. (2003) Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Embrapa Agrobiologia, Seropédic, RJ, 40p. (Documento, 161).
- Oliveira, A. G. , Chagas Junior, A. F., Santos, G. R., Miller, L. O., Chagas, L. B. (2012) Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. Revista Verde.7:149-155.
- Panday, D.;Schumann, P.; Das, S. K. (2011), *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61: 2632–2639.
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol 42:207–220.
- Pedraza, R. O.;Ramirez-Mata, A.; Xiqui, M. L.; Baca, B. E. (2004) Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. FEMS Microbiology Letters, 233: 15–21.
- Radwan, T., El-Sayed El-Desouk, Mohamed, Z. K., Reis, V. M. (2004) Efeito da inoculação de Azospirillum e Herbaspirillum na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 39:987-994.
- Rajankar, P.N., Tambekar, D. H., Wate, S.R. (2007) Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Purna river basin. Res. J. Agric. Biol. Sci.;3:701-703.
- Raghothama, K. G. (1999) Phosphate acquisition. Annu. Rev. Plant Phys. 50:665-693.
- Remans R, Ramaekers L, Schelkens S, Hernandez G, Garcia A, Reyes JL, Mendez N, Toscano V, Mulling M, Galvez L, Vanderleyden J. (2008b) Effect of Rhizobium-Azospirillum coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. Plant Soil.; 312:25-37.
- Rodrigues, E. P., Rodrigues, L.S., Oliveira, A.L.M., Baldani, V.L.D., Teixeira, K.R.S., Urquiaga, S., Reis, V.M. (2008) Azospirillum amazonense inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Soil, 302:249–261.

- Rodrigues, L. da S.; Baldani, V. L. D.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. (2006) Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 41:275-284.
- Sabino, D.C.C., Ferreira, J.S., Guimarães, S.L., Baldani, V.L.D. (2012) Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. *Enciclopédia biosfera*. 8:2337-2345.
- Schwyn, B., Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.*, 160:47-56.
- Silva E. Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz recomendadas para o plantio no Estado do Rio de Janeiro Dissertação [Mestrado em Ciência do Solo]. Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2014.
- Silveira, É. L. (2008) Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) –Jaboticabal-SP, Universidade Estadual Paulista-Campus de Jaboticabal- FCAV, 83p.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed,. 719p.
- Tarrand, J.J.; Krieg, N.R.; Döbereiner, J. (1978) A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description a new genus, *Azospirillum* gen. Nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24:967-980.
- Tian, C. F.; Wang, E. T.; Wu, L. J.; Han, T. X.; Chen, W. F.; Gu, C. T.; Gu, J. G.; Chen, W. X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 58, 2871–2875.
- Tien TM, Gaskins MH, Hubbell DH (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 37:1016-1024.
- Tortora, M.L., Díaz ricci, J.C., Pedraza, R. (2011) *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Arch. Microbiol.*, 193:275-286.
- Viana, T.O., Santos, J.S., Manfredi, C., Moreira, R.V.S., Baldani, V.L.D., Ferreira, J.S. (2015) Isolation and inoculation of diazotrophic bacteria in rice (*Oryza sativa* L.) grown in Vitoria da Conquista – BA. *Afr. J. Agric. Res.*, 10:2847-2854.
- Videira, S.S. (2012) Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associada a plantas de capim-elefante. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-. Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, 105p.

- Woodward, A.W., Barte, I B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot-London*, 95:707-735.
- Yano, D. M. Y., Attili, D. S., Gatti, M. S. V., Eguchi, S. Y., Oliveira, U. M. (1991) Técnicas de microbiologia em controle de qualidade. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello",
- Zakharova, E.A.; Shcherbakov, A.A.; Brudnik, V.V.; Skripko, N.G.; Bulkin, N. S. H.; Ignatov, V.V. (1999) Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*. *European Journal Biochemistry*. Berlin, 259:572-576.
- Zarpelon, T. G. (2007) Caracterização de rizobactérias e eficiência do *Rizolyptus* no enraizamento e crescimento de Eucalipto. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, MG, 69p.

3-3- PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI

RESUMO

O feijão-caupi, leguminosa cujos grãos possuem alto valor alimentar, apresenta elevada capacidade de simbiose com bactérias diazotróficas. O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar, de forma morfo-cultural, fisiológica e molecular bactérias diazotróficas de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos de regiões produtoras do estado do Rio de Janeiro. Solos de quatro propriedades dos municípios de Cachoeiras de Macacu e Magé, no Estado do Rio de Janeiro, foram utilizados num experimento, em casa de vegetação, para a prospecção de isolados de feijão-caupi (cv. Maua) e para a estimativa do número de rizóbios. Após 35 dias de plantio, as raízes foram coletadas, usadas no ensaio de redução de acetileno e os nódulos, posteriormente, destacados e usados no processo de isolamento das bactérias. Após isolamento, e purificação, os isolados foram caracterizados de forma morfo-cultural (alteração do pH do meio, tempo de crescimento, tamanho, forma, borda, transparência, elevação, aparência, cor, aderência e elasticidade do muco), fisiológica (diferentes fontes de carbono, concentrações de NaCl, elevadas temperatura e diferentes faixas pH) e genotípica (sequenciamento parcial do 16S rDNA). Foi observada uma população de bactérias que nodulam feijão-caupi variando em torno de $4,27 \times 10^2$ a $4,62 \times 10^4$ célula. g de solo⁻¹. Dos 45 isolados, 100 % tiveram crescimento rápido, pH ácido

(89%), borda da colônia inteira (80 %), colônias circulares (80%), elevação plana (80%), aparência da colônia homogênea (62 %) e colônias com diâmetro ≤ 2 mm (75%). Do total de isolados, 90% foram capazes de crescer nas diferentes fontes de carbono testadas e 91,5% de crescer na concentração mais baixa (0,5%) de NaCl, porém, mais da metade dos isolados apresentou resistência ao desenvolvimento na concentração nas concentrações de 1 e 2 %. O percentual de isolados crescidos nas temperaturas de incubação de 28, 37 e 42 °C foi de 100, 81 e 64%, respectivamente. O percentual de isolados crescidos nas faixas mais baixas de pH 4,0 e 5,5 foi de 53, 32 %, respectivamente. Do total de isolados de nódulos de feijão-caupi sequenciados, 19 foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, 7 ao gênero *Rhizobium*, 4 ao *Bradyrhizobium*. e 4 *Paenibacillus*. Foi observada baixa similaridade entre os isolados e as estirpes padrão do grupo rizóbio utilizadas na caracterização morfo-cultural. Todos os isolados foram capazes de reduzir acetileno a etileno e a capacidade dos mesmos de crescer em meio YMA com diferentes fontes de carbono, na concentração de 2% de NaCl, em temperatura de até 42 °C e na faixa de pH 4 os revela como promissores para inoculação na cultura em regiões com condições climáticas adversas. Os gêneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*. e *Paenibacillus* observados no presente estudo são potencialmente conhecidos como promotores de crescimento vegetal e podem ser utilizados nas etapas de eficiência e seleção de isolados eficientes para a fixação do N₂ em cultivares de feijão-caupi.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*,(L.) Walp, *Rhizobium*, ARA

EXPLORATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH COWPEA RHIZOSPHERE AND ROOT

ABSTRACT

Cowpea, legume whose grains have a high food value, has high symbiosis capacity with diazotrophs diazotrophic and its inoculation with efficient strains

besides allowing adaptation to a wide range of climate and soil, represents a significant increase in FBN rate and on crop productivity. This study aimed to isolate and characterize by morphocultural form, physiological and genotypic, diazotrophic bacterium of *Bradyrhizobium* the genus associated with the cowpea rhizosphere and root. Soils of four different sites in the municipalities of Cachoeiras de Macacu and Magé in the State of Rio de Janeiro were used in an experiment in greenhouse conditions, for the prospection of cowpea (cv. Maua) rhizobacteria and the estimated the rhizobia number. After 35 days of planting, the roots were collected, used in acetylene reduction assay and nodules subsequently detached and used in bacterial isolation process. After isolation and purification, the isolates were used for the morphocultural (change of pH, time of growth, size, shape, border, transparency, elevation, appearance, color, adhesion and elasticity of mucus), physiological (different sources carbon, NaCl concentrations, high temperature and different pH ranges) and genotypic (partial 16S rDNA) characterization. It was observed a population of cowpea nodule bacteria ranging around $4,27 \times 10^2$ to $4,62 \times 10^4$ cells. g soil⁻¹. Of the 45 isolates, 100% had rapid growth, pH acid (89%), the edge of colony entire (80%), circular colonies (80%), flat elevation (80%), appearance of colony homogeneity (62%) and colonies ≤ 2 mm diameter (75%). The isolates total, 90% were able to grow on different carbon sources tested and 91.5% of growing in the lower concentration (0.5%) NaCl. However, more than half of the isolates were resistant to developing the concentration at concentrations of 1 and 2%. The percentage of isolates grown in incubation temperatures of 28, 37 and 42 ° C was 100, 81 and 64%, respectively. The percentage of isolates grown at lower pH ranges 4.0 to 5.5 was 53 to 32%, respectively. Of the isolates of cowpea nodules sequenced, 19 were identified as belonged to the genus *Bacillus*, 7 to the *Rhizobium*, 4 to the *Bradyrhizobium* and 4 to the *Paenibacillus*. There was a low similarity among isolates and standard strains of rhizobia group used in Morphocultural characterization. All isolates were able to reduce acetylene to ethylene and the ability there of to grow in YMA medium with various carbon sources at a concentration of 2% NaCl at temperatures up to 42 ° C and at pH 4 reveals them as promising for inoculation culture in regions with adverse weather conditions. The genus *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*. and *Paenibacillus* observed in this study are potentially known as plant growth promoters and can be used in

steps efficiency and efficient selection of isolates for N₂ fixation in cowpea varieties.

Keywords: *Vigna unguiculata* L. Walp, *Rhizobium*, ARA

1-INTRODUÇÃO

Estudos nas áreas de preservação e conservação dos solos vêm crescendo devido a preocupação com as consequências do manejo inadequado nos sistemas agrícolas. Intensifica-se com isto, a demanda para o desenvolvimento de tecnologias ecológicas que possibilitem o aumento da produção de alimentos e matérias-primas, dentro de um enfoque de preservação e utilização racional dos recursos naturais (Neves et al., 1998).

Práticas como adubação verde, plantio direto, policultivo, rotação de culturas e instalação de sistemas agroflorestais se mostram como alternativas para a manutenção e/ou recuperação dos teores de matéria orgânica e da capacidade produtiva do solo. Neste mesmo contexto, o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), refletido no aumento da produtividade vegetal, na recuperação de áreas degradadas, no incremento da fertilidade e da matéria orgânica do solo (Bratii et al., 2005) torna-se de fundamental importância.

Devido a sua contribuição para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados e diminuição da poluição ambiental, a FBN vem sendo adotada em vários sistemas produtivos (Smyth et al., 1991). Da mesma forma, a habilidade das bactérias para fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas tem sido estudada por diversos autores (Silva 2003, Carvalho 2003, Rumjanek et al., 2005, Zilli et al, 2009a; Lima, 2009). Sendo a simbiose rizóbio-leguminosas no solo, resultante de um processo evoluído onde as perdas do N₂ fixado por interferência de fatores químicos, físicos e biológicos são reduzidas (Morreira e Siqueira, 2002).

Quando cultivados em condições favoráveis, as leguminosas em associação com bactérias diazotróficas podem favorecer um aporte de 60 a 100 Kg N.ha⁻¹.ano⁻¹ ao sistema (Sampaio e Maluf, 1999), o que reduz ou elimina os gastos com fertilizantes minerais, permitindo uma economia considerável nas despesas com a produção.

O feijão-caupi, leguminosa cujos grãos possuem alto valor alimentar, apresenta elevada capacidade de simbiose com bactérias diazotróficas. A inoculação do feijão-caupi com estirpes de rizóbios eficientes além de possibilitar a adaptação a uma ampla faixa de clima e solo, nas mais diversas condições de cultivo do Brasil, representa um incremento significativo na taxa de FBN e na produtividade da cultura, reduzindo também o uso de fertilizantes nitrogenados (Ehlers e Hall, 1997; Franco et al., 2002).

Para garantir o sucesso simbiótico e otimização da FBN é necessário, porém, que se conheça a ecologia das bactérias do grupo de rizóbio (Rumjanek et al., 2005) devendo-se realizar a seleção de estirpes baseada na sua capacidade de estabelecimento e sobrevivência no solo, bem como na sua eficiência, eficácia e efetividade, fatores esses que podem ser analisados através de estudos morfológicos, genéticos e testes em casa de vegetação e campo.

Devido a alta promiscuidade apresentada por feijão-caupi, compreendida como a capacidade da leguminosa associar-se com diversas espécies e estirpes de rizóbio (Thies et al., 1991, Perret et al. 2000), a seleção de novas bactérias através de estudos da eficiência simbiótica torna-se de fundamental importância, objetivando a obtenção de estirpes mais específicas (restritivas) e competitivas, que irão se associar ao caupi e através da adaptação dos mesmos às condições locais do plantio se terá incremento na produtividade e/ou contribuindo também na adubação verde.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar, de forma morfocultural, fisiológica e molecular, bactérias diazotróficas, do gênero *Bradyrhizobium*, de nódulos de feijão-caupi cultivado em solos de regiões produtoras do estado do Rio de Janeiro.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Amostragem e coleta do material

Foram coletadas amostras representativas da rizosfera (raiz+solo) de cultivares de feijão-caupi cultivadas em diferentes áreas no Estado do Rio de Janeiro nos municípios de Cachoeiras de Macacu e Magé. Esses municípios são tradicionalmente produtores de feijão-caupi, onde se faz uso de genótipos de sementes introduzidas anos atrás junto a imigrações de nordestinos e são localmente conhecidos como Mauá, Costelão, Piabetá.

Os solos rizosféricos foram coletados em quatro propriedades familiares (duas em Cachoeiras de Macacu e duas em Magé), todas com históricos de muitos anos de plantio de feijão-caupi, com adubação nitrogenada e sem utilização anterior de inoculantes.

Em Cachoeiras de Macacu as coletas foram realizadas nas propriedades dos produtores Sr Roberto(1) e Sr Alcenir (2). Na propriedade do SR Roberto, o feijão-caupi é cultivado em rotação de cultura com batata doce e milho. Na do Alcenir, o caupi é cultivado nas entre linhas de cultivo de laranja. Em Magé, as coletas foram realizadas nas propriedades dos produtores Sr Jailson (3) e Sr João Carlos (4), nos quais o feijão-caupi é plantado em rotação de culturas com batata e quiabo, respectivamente.

As amostras dos solos de cada propriedade foram coletadas dentro de cada área na camada de 0 a 20 cm, de maneira inteiramente casualizada. De cada área foram coletadas 10 amostras compostas de solo, obtidas a partir de 20 amostras simples. Em sequência, os solos foram destorroados, secos ao ar e peneirados em malha de 4 mm e sub-amostras dos solos foram separadas e enviadas para análises químicas, no laboratório de Química agrícola da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica-RJ, constando os resultados na tabela a seguir (tabela 1).

Tabela 1: Resultados da análise química do solo de diferentes propriedades nos municípios de estudo antes da implantação do ensaio de solos.

Localidades /Propriedades		C	Al	Ca	H+Al	K	Mg	N	P	pH
		%	-----cmolc/d-----					%	mg/L	
Cachoeiras de macacu	1	0,64	0,11	1,50	3,04	132,00	0,49	0,08	16,59	5,39
	2	1,11	0,20	2,11	4,36	360,00	0,95	0,13	19,72	4,91
Magé	3	1,56	1,86	0,50	8,98	16,00	0,18	0,17	25,55	4,17
	4	1,41	0,17	2,32	5,08	22,00	0,80	0,14	27,86	5,28

Foi realizada, simultaneamente, um ensaio para a estimativa do número de rizóbios presentes nos solos coletados através do método do NMPP (número mais provável em plantas), descrito por Woormer et al. (1988), procedendo-se de acordo com Gualter (2010). Inicialmente, 10 g de solo de cada área de coleta foram transferidas para um tubo Falcon, contendo 90 ml de solução fisiológica (0,85% de NaCl). As amostras foram então agitadas (10 minutos; 5000 rpm) em um agitador orbital. Considerou-se esta diluição 10^{-1} . Posteriormente, retirou-se uma alíquota de 1,0 ml desta solução e acrescentou-a a outro tubo Falcon contendo 9,0 ml de solução fisiológica, procedendo-se à homogeneização desta solução em um agitador de tubos, tendo-se assim a diluição 10^{-2} . Repetindo-se este procedimento, fizeram-se diluições seriadas até a ordem de 10^{-10} .

Como planta hospedeira, utilizou-se o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivar Mauá, a qual foi plantada em vasos tipo *Leonard* (Vincent, 1970). A inoculação das plantas foi realizada com 1,0 mL das amostras de solo diluídas, cinco dias após o plantio, com três repetições. As plantas foram coletadas aos 30 dias observando-se a formação de nódulos e estimando-se o número de rizóbios no solo, através das tabelas apresentadas por Woormer (1994).

2.2- Obtenção e isolamento das rizobactérias

2.2.1- Ensaio em casa de vegetação

As amostras dos solos coletados foram utilizadas no ensaio para a prospecção das bactérias da rizosfera e raiz de feijão-caupi. O plantio foi realizado em condições de casa de vegetação, em vasos com capacidade de 2

Kg contendo os solos das diferentes propriedades, utilizando-se sementes de feijão-caupi, cultivar Mauá, previamente desinfectadas, para que a microbiota associada à planta correspondesse apenas àquela presente no solo (Baldani et al., 2000).

Foram semeadas quatro sementes por vaso e aos cinco dias após a emergência (DAE) foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso. Durante o ciclo de crescimento, foram realizados tratamentos culturais como: a irrigação das plantas por rega manual e o tutoramento das plantas com auxílio de estacas de bambú.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições de solos de cada área de coleta. Aos 35 DAE, no início da floração da cultura, foi realizada a coleta para o isolamento de *Bradyrhizobium* spp.

2.2.2- Isolamento de bactérias de nódulos de Feijão-caupi

As raízes foram coletadas com o mínimo de impacto possível, lavadas em água corrente com auxílio de uma peneira, para a retirada do excesso de solo, colocadas em recipientes adequados e levadas para o ensaio de redução de acetileno (estratégia utilizada para a seleção e isolamento de novos isolados do gênero *Bradyrhizobium*). Posteriormente, os nódulos foram destacados das raízes e estocados em potes com sílica gel para maior conservação até o início do isolamento.

2.3- Atividade da nitrogenase

As raízes de feijão-caupi coletados no ensaio em casa de vegetação foram utilizadas para confirmar a atividade do nódulo e determinar a ocorrência ou não da fixação de N, indiretamente pelo método da atividade de redução do acetileno (Acetylene Reduction Assay-ARA) (Hardy et al., 1968).

As mesmas foram colocadas em frascos de vidros de especificamente para a técnica, fechados hermeticamente, sendo retirados 10% da atmosfera do vidro e injetados o mesmo volume de acetileno (C₂H₂). Após a incubação por 15 minutos, foram retirados 10 mL da amostra de gás de cada frasco através de uma seringa e acondicionados em tubos “vacunteiner”, que foram armazenados até a análise. Posteriormente, na análise, amostras de 0,5 mL do conteúdo gasoso de

cada frasco foram retiradas, com seringas plásticas e injetadas no cromatógrafo de gás, com ionização de chama, marca Perkin Elmer modelo F11, utilizando-se uma coluna Poropak N de 50 cm, a 40 °C, onde foi realizada a leitura do etileno formado pela redução do acetileno, conforme metodologia descrita em Saito (1980). A presença do etileno indicará que os nódulos estavam fixando nitrogênio e a taxa de redução de acetileno foi calculada em nanomoles (nmoles) de C₂H₄ produzidos por raiz por tempo de incubação.

2.4- Caracterização morfocultural dos isolados

No isolamento, os nódulos passaram por uma lavagem com etanol (p.a.) durante 30 segundos, para reduzir a tensão superficial, seguida de uma desinfecção superficial com Peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30% p.a.) durante 3 minutos, e em sequência, 10 lavagens com água destilada estéril. Após desinfecção, os nódulos foram pressionados com uma pinça sobre o meio YMA (Fred e Waksman, 1928; Vicent, 1970), contendo vermelho congo (0,25%) em placa de Petri, com o objetivo de separar rizóbios de possíveis contaminantes. As placas foram incubadas a 28°C até o aparecimento de colônias isoladas, as quais foram avaliadas e as colônias que não absorveram o indicador, com coloração rosa, foram repicadas sucessivamente para novas placas, contendo o meio YMA com o indicador Azul de Bromotimol em placa de Petri, e incubadas a 28°C, para purificação, isolamento e posterior caracterização e armazenamento.

Após a purificação dos isolados, foram avaliadas as seguintes características culturais dos mesmos: (1) alteração do pH do meio de cultura (alcalino, ácido e neutro); (2) tempo de crescimento, avaliado pela presença de colônias isoladas (lento: 4 ou mais dias; rápido: até 3 dias); (3) características das colônias (tamanho: mm; forma: puntiforme, circular ou irregular; borda: inteira ou irregular; transparência: opaca, translúcida ou transparente); (4) elevação (plana, lenticular ou convexa); (5) aparência (homogênea ou heterogênea); (6) cor (branca, amarela, branca/amarelada); (7) aderência (à alça de platina quando da remoção do muco da superfície do meio de cultivo) e (8) elasticidade do muco (observada pela formação ou não de fio, no momento da remoção das colônias do meio de cultura), conforme metodologias adaptadas e discriminatórias de grupos morfológicos da rizobiologia (Martins et al., 1997; Hungria et al., 2001; Fernandes Júnior, 2009; Medeiros et al., 2009; Lima, 2009).

Seis estirpes padrão foram usadas na comparação com as bactérias isoladas, sendo elas *Bradyrhizobium elkanii* (BR 115 = USDA 76), *B. japonicum* (BR 114 – USDA 06), *Sinorhizobium fredii* (BR 112 = LMG 6217), *Rhizobium tropici* IIA (BR 10016 =CFN 299), *R. etli* (BR 10026 = CFN 42) e *R.leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR 10052 = LMG 8819). Uma matriz binária de dados foi construída com os isolados caracterizados de cada solo e as cinco estirpes padrão. Os isolados foram comparados por seu grau de similaridade estimado pelo coeficiente de Jaccard (Sj), agrupados pelo método UPGMA e representados graficamente por um dendrograma a ser obtido pelo programa PAST.

2.5- Caracterização fisiológica dos isolados

Foi avaliada a capacidade dos isolados bacterianos de crescer em meio de cultura YMA modificado e suplementado com diferentes fontes de carbono, concentrações de NaCl, elevadas temperatura e pH de acordo com Fernandes Júnior, (2009). Para estes testes, os isolados bacterianos foram crescidos previamente em meio YM líquido (Vincent, 1970) sob agitação constante de 160 rpm em um agitador orbital pelo tempo de crescimento de cada um, para posterior inoculação nos respectivos meios de cultura. Sendo o detalhamento dos testes descritos a seguir:

2.5.1- Fontes de carbono

O meio de cultura YMA foi modificado com a adição de glicose, sacarose, maltose e ácido málico em substituição ao manitol como fonte de carbono para o meio de cultura na concentração de 1% (p/v). As bactérias foram repicadas nas placas de Petri, em triplicata e incubadas a 28° C pelo período de crescimento de cada uma. O crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

2.5.2- Concentrações de NaCl

O meio de cultura YMA foi modificado com a adição de 0,5; 1; 2 e 3 % de NaCl. As bactérias foram riscadas nas placas de Petri, em triplicata e incubadas a 28°C pelo período de crescimento de cada isolado e o crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

2.5.3- Incubação em diferentes temperaturas

As bactérias foram riscadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura YMA e as placas foram incubadas em estufa a 28; 32; 37 e 42°C pelo tempo de crescimento ideal para cada um dos isolados bacterianos. O crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

2.5.4- Incubação em diferentes pH

As bactérias foram riscadas, em triplicata, em placas de Petri contendo meio de cultura YMA. O pH do meio foi ajustado em diferentes faixas: 3,5-4,0; 5,0-6,5; 6,5-7,0 e 7,0-8,5. As placas foram incubadas a 28°C pelo tempo de crescimento ideal para cada um dos isolados e o crescimento foi avaliado como positivo (visível) ou negativo (não visível).

2.6- Caracterização Molecular dos isolados

2.6.1- Extração de DNA e Amplificação do gene 16S rDNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se o kit para purificação de DNA genômico (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) da marca Promega®. Uma suspensão de células dos isolados da rizosfera e raízes de feijão-caupi foi centrifugada (9.000x g, 10 min) e o precipitado foi ressuspensionado em 0,6 ml de solução de lise nuclear e agitado em vórtex. Após o procedimento para extração de DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) a 90V por 90 minutos. O gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg. mL⁻¹) por 20 segundos e descorado em água destilada por 20 minutos em leve agitação orbital. Posteriormente, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK® Gel Logic 100 (KODAK Scientific Imaging Systems, Cat. N°. 172.8468) e um computador. A análise do gel foi realizada com o programa de aquisição e análise de imagens da KODAK® 1D Image Analysis (KODAK Molecular Imaging Systems, Cat. N°. 811.2344).

Na amplificação da sequência conservada do gene 16S rDNA foi utilizado a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi utilizado os “primers” universais 27F e 1492R (Heuer et al., 1997). Para esta reação foi utilizado o kit de Taq da empresa Promega® (GoTaq® Flexi DNA Polymerase).

Para uma reação de PCR com volume final de 50 µl, foram utilizados 50 ng de DNA molde; tampão de reação 10X da Taq DNA polimerase (10 mmol l-1 de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol l-1 de KCl); 1,5 mmol l-1 MgCl₂; 200 µmol l-1 dNTP com iguais concentrações de dATP, dTTP, dCTP e dGTP; 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 25 pmol de cada iniciador: 27F [5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'] e 1492R[5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'] (Heuer et al., 1997). A reação de amplificação foi realizada em termociclador PTC 100 termocycler (MJ Research) com uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento à temperatura de 60 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min, e uma extensão final a 72 °C por 30 min. Após a reação, os produtos foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (2 %) a 90V por 90 minutos. O gel foi corado e fotografado como descrito acima.

2.6.2- Sequenciamento do gene 16S rDNA

A purificação dos produtos de amplificação foi feita usando o kit de purificação de DNA (Wizard® Genomic DNA Purification Kit cat. A1120). Após a purificação, as amostras contendo os isolados purificados foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genoma da Embrapa Agrobiologia. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático AppliedBiosystems (ABI 3730), com auxílio do Kit BigDye terminator 3.1 (Applied Biosystems, USA), e com iniciadores AmpR ou AmpF. Os contigs foram montados com auxílio do programa DNA Baser Sequence Assembler. As sequências foram então comparadas com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) e alinhadas usando o programa Mega 3.1, método Neighbor-Joining e o modelo de Kimura 2-parameter com 5000 valores de bootstrap.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.- Número Mais Provável em Plantas (NMPP)

Os resultados encontrados no presente estudo indicam uma população de bactérias que nodulam feijão-caupi variando em torno de $4,27 \times 10^2$ a $4,62 \times 10^4$

célula. g de solo⁻¹ (tabela 2). Esses valores estão dentro da faixa observada por Thies et al.(1991), em um estudo sobre a capacidade de nodulação e de fixação de nitrogênio de estirpes recomendadas e da populações de rizóbios nativos em nove leguminosas, entre elas o feijão-caupi. Os mesmos observaram uma população variando de 0 a $5,3 \times 10^4$ ufc g de solo⁻¹.

Tabela 2: Número de células de rizóbio obtidos de diferentes solos coletados em áreas produtoras de feijão-caupi no estado do Rio de Janeiro, pelo método NMPP.

Localidades/Propriedades		Número de rizóbio. gde solo ⁻¹
	1	$1,11 \times 10^3$
Cachoeiras de Macacu	2	$4,62 \times 10^4$
	3	$9,32 \times 10^2$
Magé	4	$4,27 \times 10^2$

Favero et al. (2013), em um estudo sobre a densidade de rizóbios capazes de nodular feijão-caupi em solo do Centro-oeste, observaram uma população em torno de 10^7 células g⁻¹ de solo nas amostras de Sinop-MT, indicando uma alta população na área com cultivo de soja a um longo período. Da mesma forma, Nascimento et al. (2010), avaliando a eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi (cv. Sempre-Verde), constaram uma grande população de rizóbios capaz de nodular a cultivar, em torno de $1,14 \times 10^6$ ufc g de solo⁻¹, o que justificaria, segundo os autores, uma competição entre os isolados de rizóbios inoculados e os rizóbios nativos pelos sítios de infecção, uma vez que o solo não foi esterilizado.

Segundo Moreira e Siqueira (2006), estirpes nativas e ineficientes podem competir com as eficientes, introduzidas através da inoculação, por sítios de infecção na planta hospedeira, uma vez que numa mesma planta podem ocorrer nódulos formados por diferentes estirpes e até mesmo por diferentes espécies. Porém, têm-se evidenciado respostas semelhantes entre a população nativa de solos, estirpes recomendadas e adubação nitrogenada, na produção de biomassa seca e de grãos em feijão-caupi (Zilli et al. 2004; Nascimento et al.,2008; Nosoline, 2012; Borges et al.,2012), sendo necessário elevar a competitividade

das estirpes inoculadas, através de aplicação de uma densidade rizobiana ideal nas sementes (Silva Júnior et al.,2012), ou a prospecção dessa população nativa para avaliação do seu potencial biotecnológico.

O solo da propriedade 2 foi o que apresentou maior densidade de população de rizóbio estabelecida, o que pode ser devido ao cultivo sucessivo de feijão-caupi na área, nas entre linhas da produção de laranjas. De acordo com Ferreira et al.(2000), o cultivo sucessivo de uma leguminosa em uma mesma área tende a elevar a densidade de bactérias nodulantes no solo, devido a multiplicação dos rizóbios ser favorecida com a nodulação das plantas. Zilli et al. (2004), observaram um aumento significativo da população de rizóbios em resposta ao cultivo sucessivo do feijão-caupi, sugerindo que a presença dessa leguminosa favorece o estabelecimento de grupos de rizóbios específicos e que adquirem características competitivas, garantindo assim seu estabelecimento no solo.

4.2- Atividade da nitrogenase (ARA)

No presente estudo, os isolados bacterianos de nódulos de feijão-caupi apresentaram capacidade para fixar nitrogênio (figura 1). A atividade da redução de acetileno (ARA) é uma das técnicas utilizadas para avaliação da atividade da enzima nitrogenase. Essa técnica, considerada indireta, foi desenvolvida por Stewart et al. (1968) e Hardy et al. (1968) e permite uma análise prévia da fixação biológica de nitrogênio por microrganismos diazotróficos.

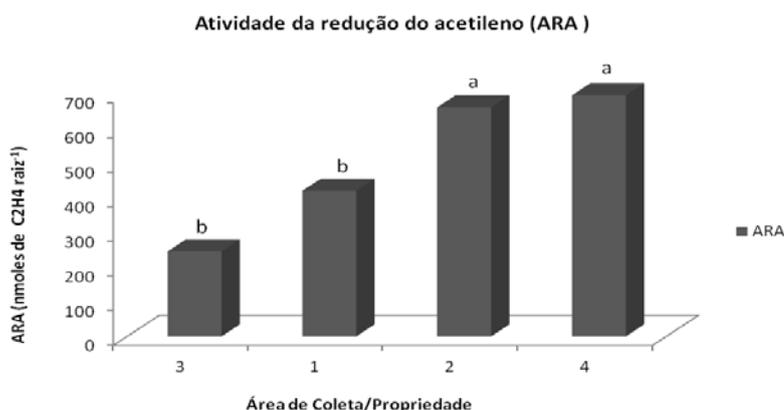


Figura 1: Atividade da nitrogenase pelo método de redução de acetileno de isolados de nódulos de feijão-caupi. Barras seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Scott-Knott. Média de 6 repetições.

A diferença no ARA observada entre as diferentes áreas de coleta dos solos no presente estudo indica a presença de isolados nativos com diferente eficiência de FBN. Diversos estudos relatam existir nos solos uma população nativa de rizóbio capaz de nodular leguminosas com variabilidade de respostas no favorecimento de acúmulo de biomassa e produtividade na cultura. Zilli et al. (2006), avaliando a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em feijão-caupi, observaram poucas diferenças na redução de acetileno entre as estirpes nativas e as estirpes padrão de referência BR 3262 e BR 3267. Por outro lado, Vieira et al. (2005), em um estudo sobre a nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, observaram menores taxas de atividade da nitrogenase nos isolados nativos.

Além da diferença entre os isolados nativos do solo na eficiência na ARA, também existem diferenças nas respostas das culturas a eles associados. Brito et al. (2009), constataram que o potencial da atividade da fixação ($\mu\text{mol/planta/h}$ de C_2H_4) variou ao longo do ciclo do feijão-comum e feijão-caupi. O feijão alcançou o seu pico próximo à floração, aos 38 dias após a semeadura (DAS). Já no caso do feijão-caupi o potencial de atividade máxima da enzima nitrogenase ocorreu dias antes da floração (47 DAS). O caupi apresentou taxas de redução do acetileno (C_2H_2) mais elevadas do que as do feijão-comum em todo o período analisado, caracterizando diferenças acentuadas em relação à fixação entre essas duas culturas, sobretudo no intervalo entre os 31 e 38 DAS.

Pessoa et al. (2001), avaliando os efeitos do Mo na atividade das enzimas nitrogenase e redutase do nitrato no feijoeiro em condições de campo, obtiveram valores de até $197 \text{ mmol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ planta}^{-1}$, com a aplicação de 108 g ha^{-1} de Mo. Corroborando com estes, Kubota et al. (2008), observaram a inoculação de sementes de feijoeiro com estirpes de *Rhizobium tropici* combinada com enriquecimento com Mo estimula a atividade da nitrogenase, provocando um aumento na acumulação de biomassa e de N do feijoeiro.

Os solos das propriedades 4 e 2 de Magé e Cachoeiras de Macacu, respectivamente, apresentaram isolados com maiores taxas de atividade da nitrogenase quando comparados aos das outras propriedades. Na média, a atividade, expressa em $\text{nmol de etileno raiz}^{-1} \text{ tempo de incubação}^{-1}$, variou de 245 a 696, sendo esses valores considerados relativamente altos.

Como a estratégia utilizada para a seleção de novos isolados do gênero *Bradyrhizobium*, a habilidade para fixar nitrogênio apresentada pelos isolados de nódulos de feijão-caupi nos permitiu dar sequência no processo de isolamento e caracterização dos mesmos.

4.3- Caracterização morfocultural dos isolados

No final de isolamento e purificação foram obtidos 45 isolados de nódulos de feijão-caupi, dos quais 37, 6 e 2 foram oriundos das propriedades 2, 4 e 1, respectivamente. As colônias caracterizadas apresentaram coloração variando entre branca (33%), amarela (22%), branco-amarelada (41%) e rosa (4%), (figura 2) e algumas com características morfoculturais diferentes das geralmente observadas no gênero *Bradyrhizobium*.

Na caracterização morfocultural, 100 % dos isolados tiveram crescimento rápido, sendo observadas colônias isoladas em até três dias após repicagem e crescimento ácido (89%), modificando o meio de cultura de verde para amarelo. A predominância de bactérias de crescimento rápido e que acidificam o meio de cultura isoladas de leguminosas cultivadas em regiões tropicais foi relatada em diversos estudos. Santos et al. (2007) obtiveram um total de 433 isolados de rizóbio, por meio de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, em que cerca de 90% dos isolados formaram colônias em até dois dias de crescimento, caracterizando estirpes de crescimento rápido. Lima (2009), também observou uma proporção alta de isolados de crescimento rápido e reação ácido no meio YMA, isolados de mucuna anã, cinza e preta, cultivadas em diferentes solos sob manejo orgânico com diferentes históricos de uso e coberturas vegetais. Contudo, também existem trabalhos demonstrando a presença de bactérias, capazes de nodular feijão-caupi, apresentando crescimento lento e alcalinizando o meio de cultivo. Essas bactérias, mais especificamente do gênero *Bradyrhizobium*, tem favorecido incrementos na biomassa e produtividade de feijão-caupi (Zilli et al., 2004; 2006).

De acordo com Coutinho et al. (2000) a mudança de pH em meio de cultura YMA é, geralmente, consistente dentro dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que apresentam a característica de acidificar o meio

de cultura, enquanto que os gêneros *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA.

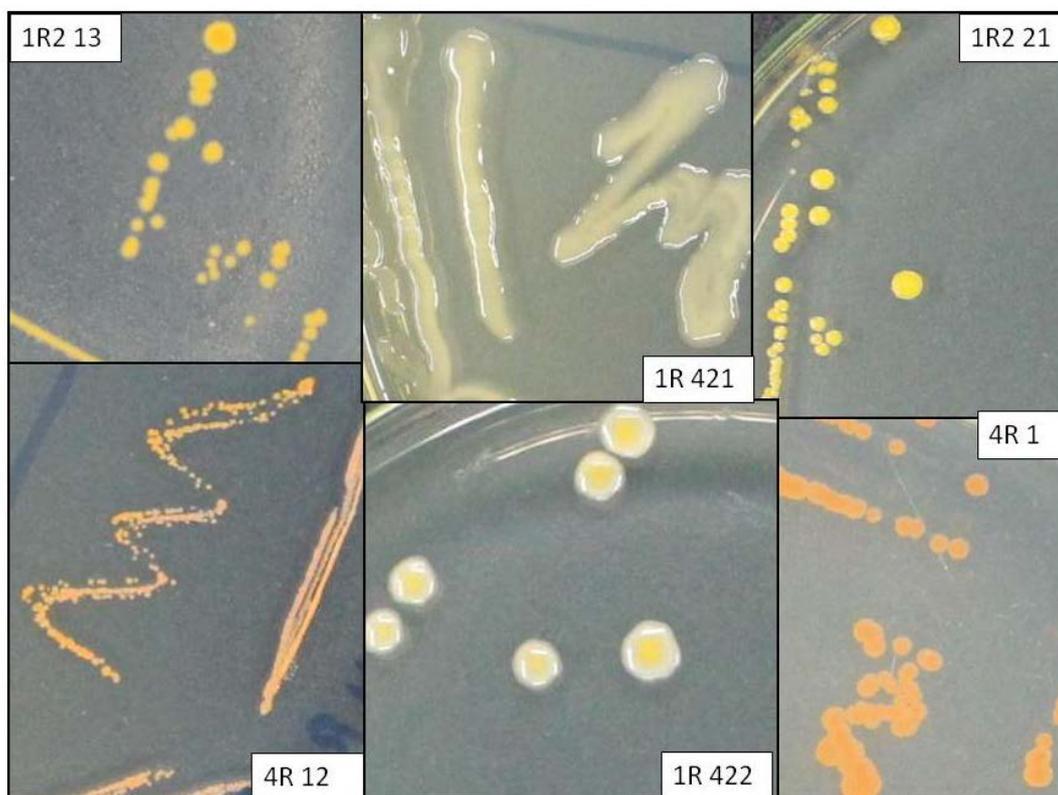


Figura 2: Morfologia das colônias dos isolados obtidos de nódulos de feijão-Caupi, cv Mauá. Observação realizada do segundo ao quinto dia de crescimento em meio YMA com azul de Bromotimol.

A maioria dos isolados apresentou, borda da colônia inteira (80 %), colônias com forma circular (80%), elevação plana (80%), aparência da colônia homogênea (62 %) e colônias com diâmetro ≤ 2 mm (75%). Resultados semelhantes foram observados por Chagas Jr et al.(2010) em uma caracterização fenotípica de isolados nativos de solos da Amazônia.

A produção de muco observada na maioria dos isolados é uma característica considerada importante por Hollingsworth et al. (1985), sendo correlacionada à adaptação a condições edafoclimáticas de estresse, como elevada concentração de alumínio, elevadas temperaturas e um período longo de seca em algumas áreas.

Com base nas características morfoculturais dos isolados nativos e das estirpes-padrão de referência foi possível agrupá-los, com um índice de 65 % de

Entretanto, os isolados com crescimento ácido e coloração amarela se agruparam no grupo 5. Os isolados com elevação da colônia lente e brilho translúcido se agruparam no grupo 6. As estirpes padrão de referência não se agruparam com os isolados do estudo, ficando as que apresentam elevação da colônia lente e brilho opaco no grupo 7 e as com crescimento lento e diâmetro <2 mm no grupo 8.

Dos grupos morfoculturais formados, o grupo 6 foi o que apresentou maior grau de similaridade com as estirpes referência de *Sinorhizobium fredii* (BR 112), *Rhizobium tropici* IIA (BR 10016), *R. etli* (BR 10026 = CFN 42) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR 10052), se diferenciando destes apenas pela aparência translúcida da colônia dos isolados que formaram o grupo. Diferente do observado no presente estudo, Chagas Jr et al. (2010), em um estudo de caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi, constataram um grau de similaridade variando entre 75 a 100% entre os isolados do estudo essas mesmas estirpes padrão utilizadas.

A baixa similaridade morfocultural com as estirpes referência indica pertencerem os isolados a outros gêneros ou outras espécies. Sendo então necessários, para confirmar essa inferência e esclarecer a posição taxonômica desses isolados, estudos genéticos. Medeiros et al. (2009), estudando a diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte, observaram elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbios, sendo que 70% (293) destes apresentaram similaridade com *Bradyrhizobium* e os demais isolados apresentaram similaridade com diversos outros gêneros, demonstrando a baixa especificidade do feijão-caupi com relação ao microssimbionte para estabelecer a nodulação e apontando a espécie como uma boa opção como planta-isca.

4.4- Caracterização Fisiológica dos isolados

4.4.1- Fontes de carbono

No presente estudo, 42 isolados (90%) foram capazes de crescer em meio de cultura suplementado com as diferentes fontes de carbono testadas (figura 4), o que denota uma boa diversidade metabólica. De acordo com

Cavaglieri et al., (2004), a habilidade das rizobactérias utilizarem diversas fontes de carbono representa uma vantagem ecológica importante na disputa por determinados nichos na rizosfera, em que bactérias benéficas, utilizando múltiplas fontes presentes nos exsudatos radiculares, poderiam sobressair frente a outros microrganismos e reduzir a disponibilidade de nutrientes disponíveis para um patógeno.

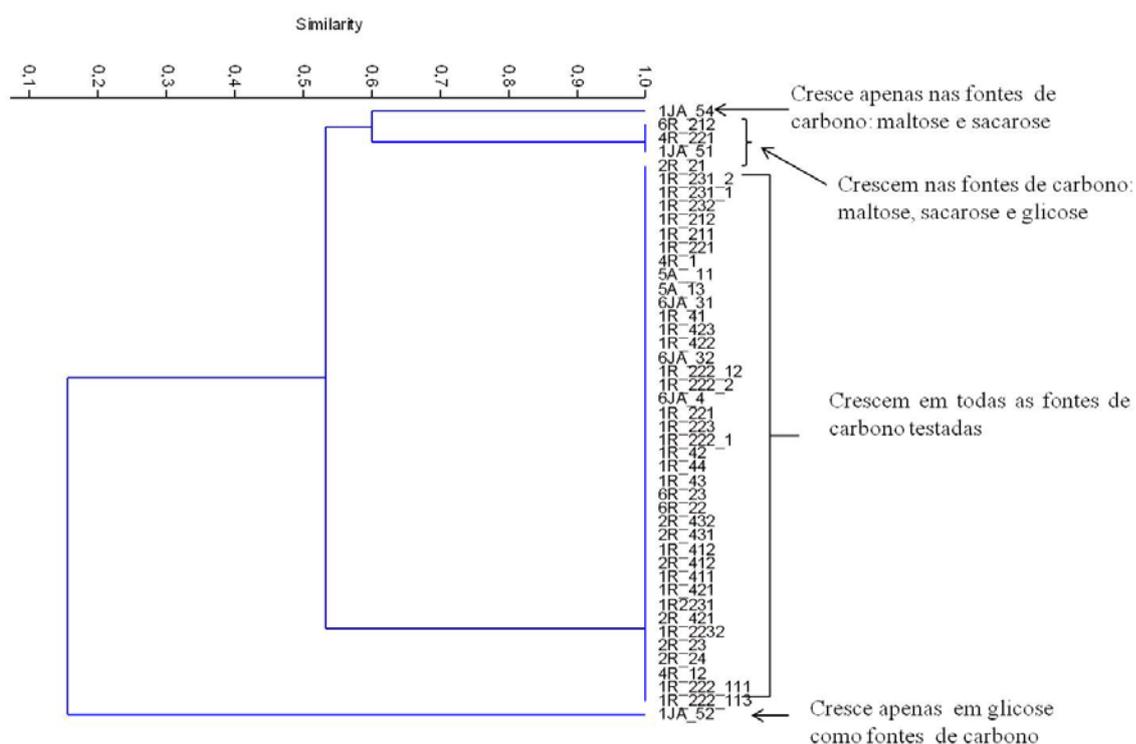


Figura 4: Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio YMA sob diferentes fontes de carbono de 45 isolados bacterianos oriundos de nódulos de feijão-caupi. (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard).

Sampaio (2013), também observou elevado número de isolados de nódulos de genótipos silvestres de Feijoeiro capazes de crescer em meios suplementados com diferentes fontes de carbono sendo as fontes frutose, sorbitol, sacarose, glicose, arabinose e glicerol as mais utilizadas. De acordo com Cavalcante et al. (2015), os estudos de avaliação das diferentes fontes de carbono contribuem não somente para a seleção de microrganismos para a produção industrial e de inoculantes, mas também são importantes para a compreensão dos mais diversos perfis metabólicos dos rizóbios.

Os isolados, 1JA 54, 6R 212, 4R 221, 1JA 51 E 1JA 52 não utilizaram o ácido málico como fonte de carbono em substituição ao manitol. Resultados semelhantes foram observados por Fernandes Júnior (2009) em um estudo de seleção de isolados nodulantes em guandu, em que o ácido málico foi a fonte de carbono menos utilizada pelos isolados.

A utilização de meios de cultura com outras fontes de carbono pode aumentar o espectro de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas, principalmente para os estudos de diversidade (Fernandes Júnior, 2009). Além disso, as diferentes fontes de carbono podem estimular a produção de exopolissacarídeos (EPS) pelas bactérias (Cavalcante et al., 2015) e influenciar na composição dos mesmos (Castellane e Lemos, 2007). Os EPS são substâncias importantes na formação de biofilme por bactérias do solo (Rinaudi et al., 2010), além de participar na sinalização molecular no processo de simbiose dessas bactérias com plantas (Rumjanek et al., 2004).

Dentre as fontes de carbono avaliadas, a glicose e a maltose foram as que proporcionaram melhor crescimento dos isolados (98%), apresentando menor variabilidade no percentual de isolados capazes de metabolizar este açúcar. Esses resultados diferem dos observados por El Idrissi e Abdelmoumen (2008), em que os isolados não foram capazes de crescer em meios suplementados com maltose.

De acordo com Jensen et al.(2002), o uso de uma ampla variedade de fontes de carbono pode ser essencial à competitividade e sobrevivência dos rizóbios. E corroborando com este, Singh et al. (2011) destacam que a capacidade dos rizóbios em metabolizar diversos tipos substratos aumenta seu potencial biotecnológico, favorecendo a redução dos custos de cultivo, além de abrir o leque de possibilidades para aplicações dessas bactérias.

4.4.2- Concentrações de NaCl

Na avaliação da capacidade dos isolados em crescer em meios suplementados com diferentes concentrações de sal, observou-se que a maioria dos isolados (91,5%) foi capaz de crescer na concentração mais baixa (0,5%) de NaCl, mostrando resistência a essa concentração salina (figura 5).

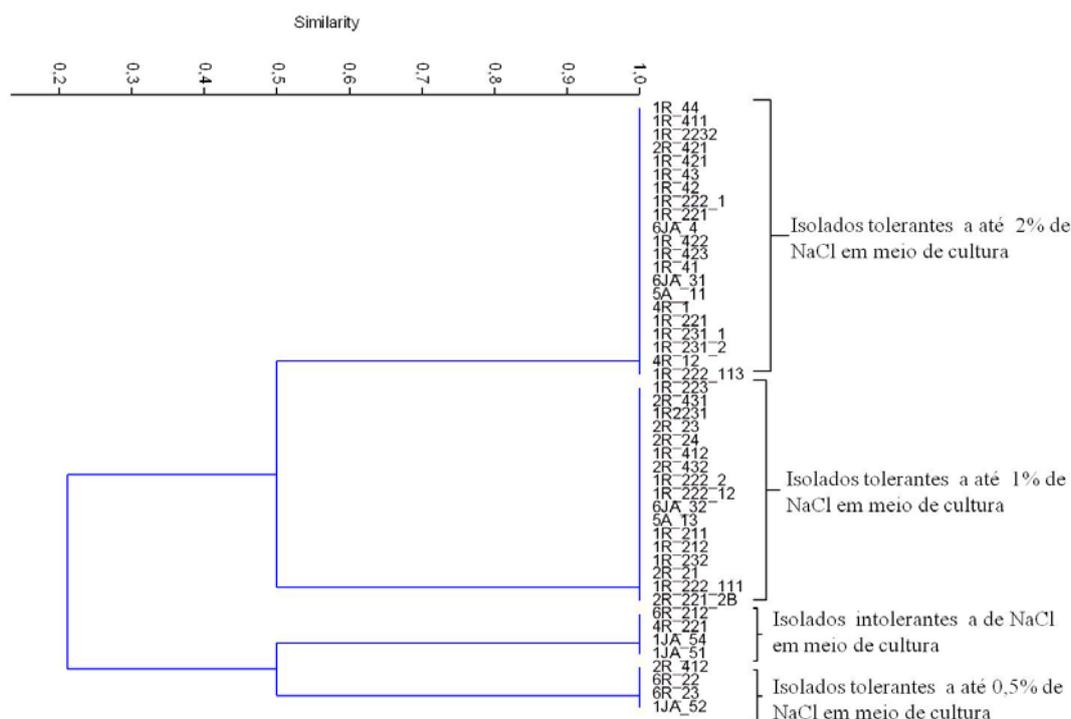


Figura 5: Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio YMA suplementado com diferentes concentrações de NaCl de 45 isolados bacterianos oriundos de nódulos de feijão-caupi. (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard).

No presente estudo foi observado a diminuição da resistência à salinidade com o aumento da concentração de NaCl. O percentual de isolados não crescidos nas concentrações de 1 e 2 % foi de 17 e 53%, respectivamente, ou seja, mais da metade dos isolados apresentou resistência ao desenvolvimento na concentração mais alta. Fernandes Júnior (2009), também observou um aumento de 54% no número de isolados que não crescem no meio YMA suplementado com NaCl quando a concentração salina foi aumentada de 1 para 3%.

A seleção de isolados tolerantes a salinidade torna-se importante, uma vez que quase 40% do total dos solos agricultáveis no mundo são afetadas pela salinidade (Patil et al.,2014), sendo uma realidade preocupante, uma vez que sal reduz o crescimento das plantas, a fotossíntese, e a demanda por N (Sprent e Zahran 1988). Segundo L'Taief et al (2012) o estresse salino afeta diretamente simbiose dos rizóbios, sendo então importante a seleção de isolados tolerantes a uma gama de concentração salina.

O Nordeste é a maior região produtora de feijão-caupi no Brasil. Porém, as condições climáticas da região de altas temperaturas, intensa evaporação e baixa

pluviosidade e os elevados teores de sais nas águas de irrigação, vêm causando problemas de salinização nos solos (Djilianov et al., 2003; Lima et al., 2007). A alta concentração de sais solúveis e sódio trocável encontrada nestes solos podem reduzir, interferir ou até mesmo impedir o desenvolvimento vegetal e, conseqüentemente, a produção das culturas (Barros et al., 2009).

Em geral, o estresse salino em plantas é acompanhado de acúmulo de íons potencialmente tóxicos e de efeitos osmóticos nutricionais, que podem afetar a fisiologia da planta, a produtividade, os teores de moléculas orgânicas (Lacerda et al., 2006). De acordo com Singleton et al. (1982), o sal pode também afectar a quimiotaxia, a ondulação de pelos radiculares, e outros passos no processo de infecção.

Leite et al.(2009), avaliando a nodulação em feijão-caupi sob estresse salino em Neossolo Flúvico, constataram que a água de irrigação salina afetou a nodulação, produção de massa seca de nódulos e da parte aérea em plantas de feijão-caupi inoculadas e não inoculadas, o que contribuiria para uma baixa produtividade da cultura.

Xavier et al. (2007), analisando estirpes oriundas de três regiões nordestinas, encontraram resistência ao desenvolvimento de algumas estirpes ao serem testadas em concentrações de 2 e 3% de NaCl. Os mesmos constataram que das 76 estirpes avaliadas, cerca de 40% foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1% de NaCl. Na concentração de 2% de NaCl, foram capazes de crescer 17% do total de isolados. Entretanto, na concentração de 3% deste sal, somente 12% das estirpes testadas foram capazes de crescer.

Cavalcante et al. (2015) avaliando a tolerância à salinidade e uso de fontes de carbono de estirpes de rizóbio oriundas de Pentecoste-CE, observaram que todas as estirpes cresceram em meio com concentração de sal de até 2 g L⁻¹ e foram susceptíveis à salinidade em meios com concentrações a partir de 3 g L⁻¹.

Nóbrega et al.(2004), avaliando o padrão de tolerância de estirpes rizobianas à salinidade de estirpes de solo salino do Ceará e de solo salino da Amazônia, demonstraram que diversas estirpes de feijão-caupi apresentaram tolerância a 3% de NaCl em meio de cultura YMA.

Os isolados que apresentaram resistência às concentrações salinas de 2% e 3%, provavelmente, devem possuir um mecanismo de osmo adaptação que evita a desidratação das células, apresentando resposta adaptativa a condições

salinas (Videira, 2008). No presente estudo não foi testado o crescimento na concentração salina de 3%, porém 47% dos isolados apresentaram tolerância a concentrações salinas de até 2%. Os mesmos podem apresentar respostas positivas num teste futuro de aumento da salinidade.

Solos salinos, em geral, contêm valores muito baixos de nitrogênio, não adequados para o cultivo da maioria das plantas. Uma solução apropriada para a situação é o cultivo de plantas capazes de fixar nitrogênio através da simbiose rizóbio-leguminosa (Freitas et al.2007). A seleção de bactérias que apresentem naturalmente tolerância à salinidade e a sua introdução nos solos pode representar uma estratégia para a prática da agricultura em regiões marginais, com elevado risco de desertificação e até mesmo para a recuperação de áreas degradadas, decorrente de atividades que aumentem a concentração de sais no solo, como a exploração mineral, por exemplo (Fernandes Júnior, 2009).

4.4.3- Incubação em diferentes temperaturas

Quanto à análise do crescimento das colônias em diferentes temperaturas (figura 6), observou-se um percentual alto de isolados capazes de crescer quando crescidos na temperatura mais elevada (42 °C). Essa capacidade é uma característica desejável na prospecção de microrganismos, principalmente nos trópicos, onde os solos alcançam elevadas temperaturas, uma vez que a temperatura da raiz afeta muitos processos na simbiose Rhizobium-leguminosa (Lie 1974). Corroborando com este, Eaglesham e Ayanaba (1984) citam que altas temperaturas podem prejudicar o desenvolvimento da FBN e limitar a nodulação.

De acordo com Martinez-Romero et al. (1991), isolados bacterianos capazes de crescer em altas temperaturas podem apresentar mesmo desempenho quando inoculadas no campo, favorecendo a sua competitividade com as bactérias nativas e seu desempenho na FBN.

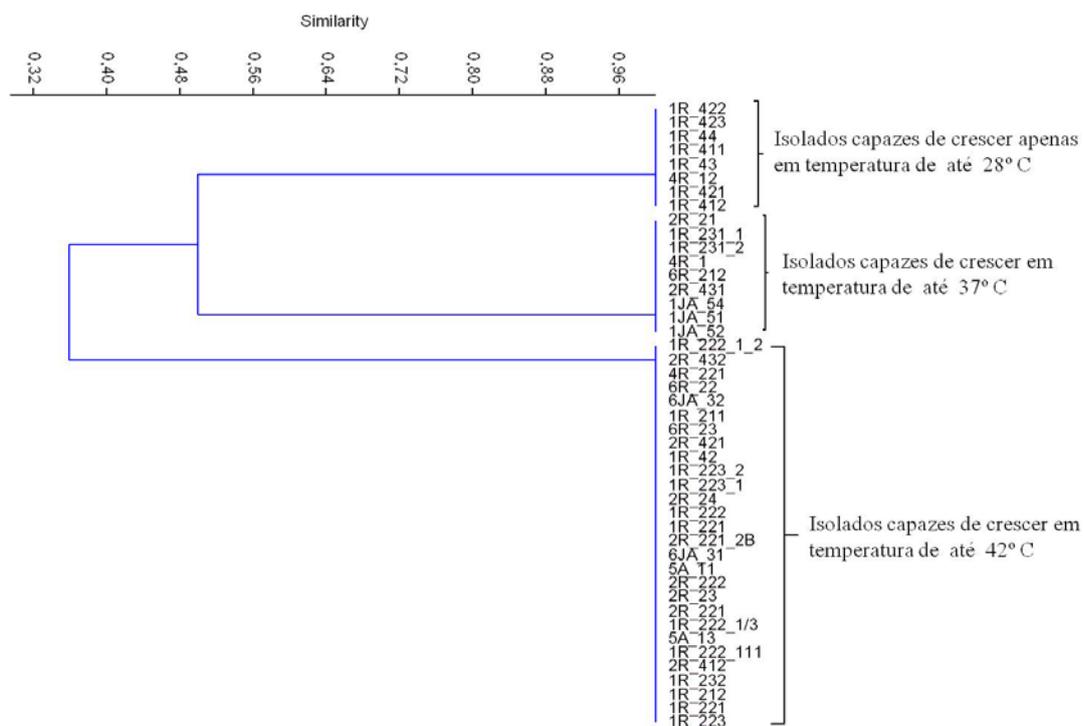


Figura 6: Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio YMA de 45 isolados bacterianos oriundos de nódulos de feijão-caupi incubados em diferentes temperaturas (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard).

O percentual de isolados crescidos nas temperaturas de incubação de 28, 37 e 42 °C foi de 100, 81 e 64%, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Fernandes Júnior (2009) para isolados de nódulos de guandu, constatando ainda os autores uma diminuição de 28% no número de isolados capazes de crescer em meio YMA com o aumento da temperatura de 28 para 42 ° C.

Hashem et al.(1998), em um estudo sobre identificação e caracterização da tolerância a NaCl e altas temperaturas por estirpes de *Rhizobium* nodulantes de Leucena, observaram que as estirpes apresentaram ótimo crescimento nas temperaturas de 30° e 37° C, porém algumas não foram capazes de crescer a 42° C. Os mesmos constataram que as estirpes que cresceram a 42° C foram os que proporcionaram melhor massa e nitrogênio da parte aérea, nodulação e atividade da nitrogenase quando inoculadas em condições de casa-de-vegetação a altas temperaturas.

Xavier et al. (2007), testando o crescimento de estirpes de rizóbio de feijão-caupi, oriundas de três regiões nordestinas (Zona da Mata, Agreste e Sertão), observaram, em relação a tolerância das estirpes a 39° e 42°C, que as

bactérias provenientes do Sertão (onde o clima é mais quente e seco com o aumento da latitude) são mais tolerantes a temperaturas elevadas, evidenciando então que origem do rizóbio é provavelmente associada com a adaptação de pressões específicas do ambiente. No entanto, não foi observado um gradiente de acordo com as características de origem das estirpes, entre os isolados da Zona da Mata que tem temperaturas mais amenas que as do Agreste e este, por sua vez, é mais ameno quando comparado ao Sertão.

Bactérias isoladas de solos brasileiros, característicos por apresentarem altas temperaturas, e que apresentam capacidade de crescer em altas temperaturas, são muito eficientes na inoculação do feijão-caupi, favorecendo alta produtividade na cultura é o caso das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (SEMIA 6462) e BR 3262 (SEMIA 6464), recomendadas para inoculação na cultura pelo MAPA (Martins et al., 2003).

Muitos dos isolados do presente estudo que apresentaram crescimento à 42° C também apresentaram crescimento na concentração de 2% de NaCl, o que as tornam recomendadas à introdução em ambientes muito quentes e de solos salinos, para utilização da cultura de feijão-caupi. E de acordo com Fernandes Júnior (2009), a seleção de materiais genéticos com capacidade de crescer em elevadas temperaturas e concentrações salinas representa uma estratégia para seleção de material biológico com potencial para utilização em um futuro cenário de mudanças climáticas com o agravamento do efeito estufa e o aumento de áreas marginais com solos depauperados e salinos.

4.4.4- Incubação em diferentes pH

No presente estudo, os isolados foram testados quanto a sua capacidade de crescer em meios de cultivo YMA com faixas de pH diferentes ao recomendado para o crescimento de bactérias do grupo rizóbio (6,8-7,0). Foi observado que todos os isolados foram capazes de crescer nas faixas de pH de 6,8 e 7,8, porém houve variação na capacidade de crescimento nas faixas de pH mais baixas (4,0 e 5,5) pelos isolados (figura 7).

Os solos tropicais que são altamente intemperizados, apresentam cargas do solo em sua maioria positivas (Taiz e Zeiger, 2004), o que torna o pH desses solos geralmente baixo. A acidez do solo pode causar sérias limitações à produtividade agrícola, devido à restrição ao crescimento radicular e à absorção

de água e nutrientes pelas culturas (Pavan et al., 1982), principalmente Ca, Mg, N, P e Mo, além de favorecer o aumento da concentração de Al na solução do solo (Ernani et al, 1996). A acidez do solo também pode ser prejudicial às atividades da microbiota do solo, limitando sua multiplicação e sobrevivência, e no caso dos isolados do grupo rizóbio, a nodulação e fixação de nitrogênio (Graham, 1991), tornando-se então necessária a seleção de microrganismos tolerantes a baixas faixas de pH.

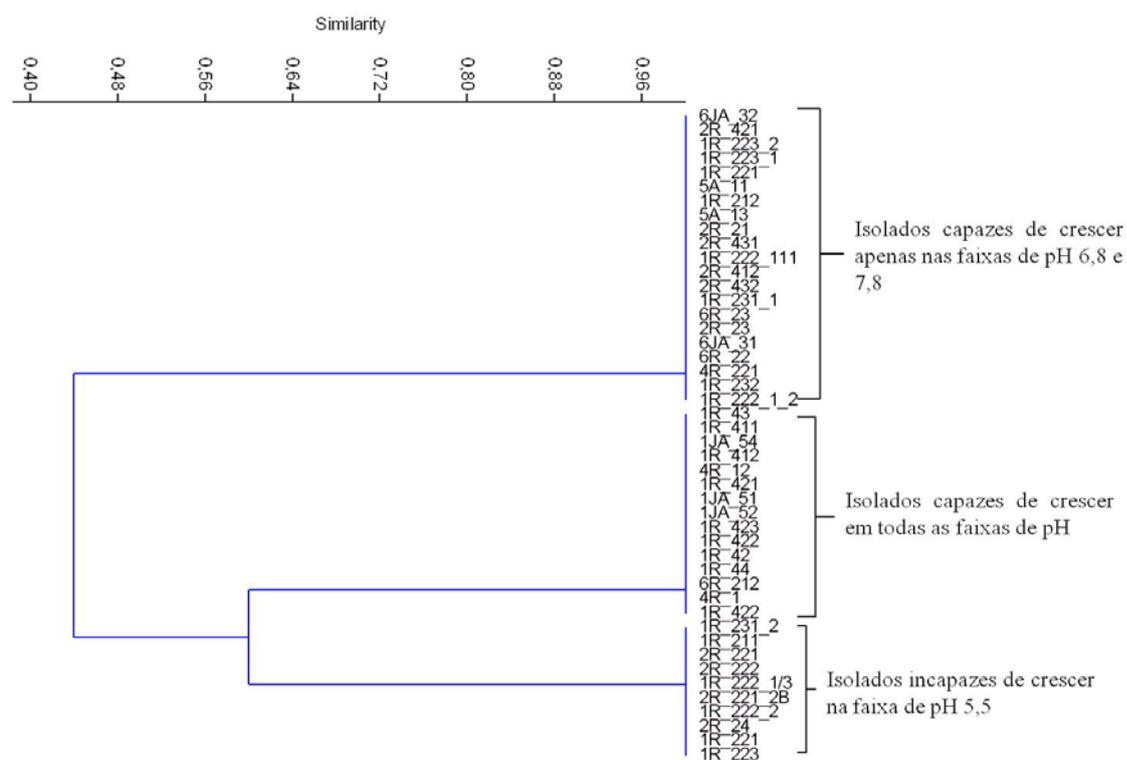


Figura 7: Dendrograma de similaridade em função do crescimento em meio YMA de 45 isolados bacterianos oriundos de nódulos de feijão-caupi incubados em diferentes faixas de pH (algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard).

O percentual de isolados crescidos nas faixas mais baixas de pH 4,0 e 5,5 foi de 53, 32 %, respectivamente, mostrando-se tolerantes a acidez. De acordo com Howieson e Ewing (1986) a seleção de estirpes com melhor crescimento em meio de cultura com valores de pH abaixo de 6,8 pode implicar melhor estabelecimento de sua simbiose nas condições de acidez predominante nos solos ácidos tropicais.

Oito dos isolados que foram tolerantes ao pH 4,0 não apresentaram crescimento na faixa de pH 5,5, ocasionando uma redução de 40% no número de isolados capazes de crescer nas faixas mais baixas de pH.

Hara e Oliveira (2004), estudando as características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo em Amazonas, observaram que a acidez do meio de cultura afetou o crescimento dos isolados, uma vez que apenas 25% dos isolados foram tolerantes a acidez, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis a esse fator.

Miguel e Moreira (2001), observaram um comportamento diferenciado das estirpes de *Bradyrhizobium* em meio líquido em função do pH, tanto em número de UFC quanto em produção de exopolissacarídeos. Todas as estirpes cresceram melhor em pH 6,0, onde alcançaram os maiores números de unidades formadoras de colônias e maior a produção de exopolissacarídeos. Esse melhor desempenho em pH 6,0 apresentado pelas estirpes pode estar relacionado com uma resposta adaptativa ao meio levemente ácido promovido pela produção de exopolissacarídeos.

A utilização de estirpes bacterianas tolerantes à acidez pode aumentar a fixação biológica em solos ácidos e reduzir a aplicação de nitrogênio e fósforo, de acordo com os princípios da agricultura ecológica e economicamente sustentável (Hara e Oliveira, 2005).

4.5- Caracterização Molecular dos isolados

As sequências obtidas a partir do produto de PCR foram submetidas às análises comparativas no banco de dados do NCBI, usando a ferramenta BLAST, para que pudessem ser identificadas e classificadas (tabela 3). As análises das sequências parciais do gene 16S rDNA permitiram a identificação taxonômica de apenas de 34 (72%) dos total de isolados de nódulos de feijão-caupi em nível de gênero, no qual as estirpes apresentaram índice de similaridade, variando entre 97 a 100%, com sequências depositadas no banco de dados.

A comparação com as sequências depositadas mostrou elevado grau de similaridade dos isolados de nódulos de feijão-caupi com sequências de alguns gêneros de bactérias como: *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus*. O isolado 1R 42, que apresentou coloração rosa na caracterização morfo-cultural,

apresentou alta similaridade com *Roseomonas mucosa*, espécie considerada patogênica.

O isolamento de grande número de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* em nódulos de leguminosas é reportado em diversos trabalhos. Acredita-se que por esses gêneros serem promotores de crescimento vegetal, podem estar em associação com os rizóbios, apresentando papel benéfico na atuação do mesmo (Costa, 2013; Dudeja e Giri, 2014)

Segundo Li e Alexander (1988), o *Bacillus* pode aumentar a nodulação e a competitividade do rizóbio pelos múltiplos efeitos positivos na rizosfera das plantas. Além disso, de acordo com Gardener (2004), inúmeras estirpes de *Bacillus* e *Paenibacillus* expressam atividades que suprimem pragas e patógenos ou promovem o crescimento de plantas.

As bactérias desses gêneros são muito utilizadas nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. A maioria das proteases comerciais de origem bacteriana é produzida por *Bacillus* sp, principalmente pela sua facilidade de adaptação e crescimento tanto em meios complexos, quanto em meios sintéticos (Takami et al., 1990).

De acordo com Araújo e Hungria (1999), *Bacillus subtilis* induz na planta a síntese de fitohormônios, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas que favorecem o crescimento das raízes e o aumento no número dos pelos radiculares.

Tabela 3: Similaridade entre as sequências do gene que codifica o 16S RNAr das bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi com as sequencias depositadas no banco de dados (GenBank).

Isolado	Número de acesso	Espécie	Max. Identidade	E-value
2R 221	KU179337.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
2R 432	KU179337.1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	0,0
2R 23	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 22 112	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 221	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 42	KF740325.1	<i>Roseomonas mucosa</i>	99%	0,0
1R 44	JQ660020.1	<i>Rhizobium sp</i>	99%	0,0
1R 412	JQ660051.1	<i>Rhizobium sp</i>	97%	0,0
2R 412	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
2R 24	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 222 1/3	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 223 2	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 231 2	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 222	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 422	JQ660020.1	<i>Rhizobium alkalisoli</i>	99%	0,0
1R 232	KU179337.1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	0,0
1R 222 2	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 421	DQ202284.1	<i>Rhizobium sp</i>	99%	0,0
1R 2311	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	100%	0,0
1R 223	KU179343.1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	0,0
1R 43	DQ202284.1	<i>Rhizobium sp</i>	99%	0,0
1R 222 1 2	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	0,0
1JA 52	AB931152.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99%	0,0
5A 11	KT831432.1	<i>Paenibacillus cineris</i>	99%	0,0
2R 222	KU179346.1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	0,0
1JA 51	AB931152.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100%	0,0
1JA 54	AB931152.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100%	0,0
5A 13	KT831432.1	<i>Paenibacillus cineris</i>	99%	0,0
6R 212	AB931152.1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100%	0,0
1R 423	DQ202284.1	<i>Rhizobium sp</i>	99%	0,0
6JA 32	KT831432.1	<i>Paenibacillus cineris</i>	99%	0,0
6JA 31	KT831432.1	<i>Paenibacillus cineris</i>	99%	0,0
1R 411	DQ202284.1	<i>Rhizobium sp</i>	99%	0,0
1R 212	KU179337.1	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	0,0

Araujo e Hungria (1999), avaliando a interação entre *Bacillus* e rizóbio observaram que a coinoculação pode contribuir no aumento de competitividade da bactéria inoculada, favorecendo o aumento dos sítios de infecção e a ação inibitória do crescimento de fungos nas raízes, proporcionando maior produtividade da cultura.

Silva et al. (2006), observaram que o feijão-caupi coinoculado com estirpe de *Bradyrhizobium sp.* e *Paenibacillus* apresentou maior média para número de nódulo chegando a 11,1%, sugerindo que o *P. polymyxa* (Loutit (L), provavelmente, proporciona incrementos na nodulação, aumentando a colonização pelos rizóbios.

Araujo et al.(2009), constataram um aumento na nodulação do feijão-caupi com a coinoculação, sugerindo uma influência do *Bacillus subtilis* na promoção de nodulação pela *Bradyrhizobium*. Além disso, a matéria seca das raízes do feijão-caupi e da leucena também aumentou com a coinoculação, sugerindo um efeito positivo do *Bacillus* sobre o crescimento radicular. O que pode ter influenciado positivamente a fixação de N₂ pelo *Bradyrhizobium*, aumentando o crescimento das plantas e acúmulo de N no feijão-caupi.

No alinhamento das sequências de bases dos isolados, pelo método Neighbor-Joining, foram utilizadas estirpes reconhecidas como padrões dos gêneros aos quais os isolados apresentaram similaridade no banco de dados do NCBI, dentre elas: *Bacillus aryabhatai* (B8W22^T), *Bacillus megaterium* (IAM 13418^T), *Paenibacillus cineris* (LMG 18439^T), *Paenibacillus endophyticus* (PECAE04^T), *Paenibacillus brasiliensis* (PB 172^T), *Roseomonas mucosa* (MDA5527^T), *Bradyrhizobium elkanii* (USDA 76^T), *Rhizobium fredii* (LMG 6217^T), *Rhizobium alkalisoli* (CCBAU 01393^T) e *Rhizobium cellulosilyticum* (ALA10B2^T)

Os isolados se agruparam às estirpes padrões dos gêneros em que foram pré-identificadas (figura 8), mostrando alta similaridade com as mesmas. Do total de isolados de nódulos de feijão-caupi sequenciados, 19 foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, 7 ao gênero *Rhizobium*, 4 ao *Bradyrhizobium*. e 4 *Paenibacillus*.

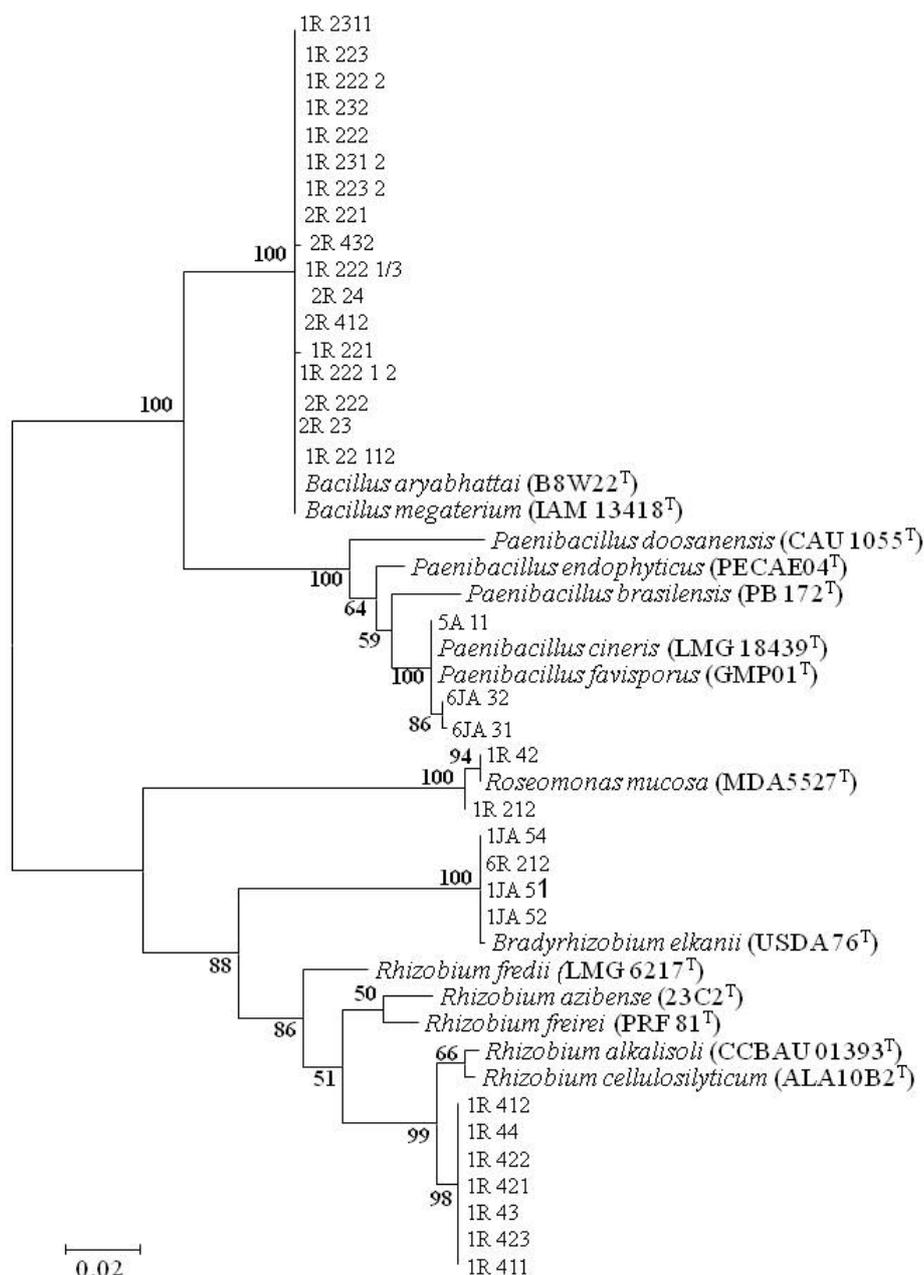


Figura 8: Dendrograma de similaridade com base nas seqüências do gene que codifica o 16S RNAr das bactérias que foram comparadas com o banco de dados NCBI e alinhadas usando o programa Mega 3.1, método Neighbor-Joining

Apesar do gênero *Paenibacillus* e *Bacillus* não serem comumente reportado como nodulíferos de feijão-caupi e outras leguminosas, alguns trabalhos têm observado a presença dos mesmos em nódulos de leguminosas. (Li et al. 2008; Marra et al., 2012 ;Costa, 2013) . De acordo com Kan et al., (2007), possivelmente, essas bactérias penetram no tecido vegetal juntamente com as nodulíferas durante a infecção e a formação dos nódulos.

Mara et al.(2012), obtiveram 8 isolados de nódulos de feijão-caupi pertencentes ao gênero *Paenibacillus*, sendo 4 isolados nodulíferos e 4 não nodulífero. Os autores ainda constataram uma eficiência na nodulação e fixação de N₂ por um dos isolados, apresentando comportamento semelhante às estirpes de *Bradyrhizobium* inoculantes do feijão-caupi.

A simbiose entre estirpes de rhizobium e leguminosas se destaca por sua importância ecológica, que está relacionada à sua ampla distribuição geográfica, como também econômica, já que ocorre uma maior eficiência do processo de FBN decorrente de uma parceria vegetal mais evoluída entre a planta e o microrganismo (Moreira, 2008).

Bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são amplamente reconhecidos como nodulíferas de feijão-caupi e a inoculação destes na cultura vêm favorecendo incrementos na nodulação, biomassa da parte aérea e produção de grãos (Martins et al., 2003; Soares et al. 2006; Zilli et al, 2006). De acordo com Moreira (2008), o feijão caupi é considerado uma espécie promíscuas, devido ao grande número de espécies e gêneros de bactérias que são capazes de estabelecer simbiose formando nódulos nas suas raízes. Entre estas bactérias são diversas espécies de *Rhizobium* e outros que pertencem aos gêneros *AlloRhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*.

Vários trabalhos têm relatado o isolamento de bactérias não simbióticas em nódulos desinfestados superficialmente, e os gêneros de ocorrência frequente são: *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Bacillus* e *Paenibacillus* (Kan et al., 2007; Li et al., 2008; Marra et al., 2012). Possivelmente, essas bactérias penetram no tecido vegetal juntamente com as nodulíferas durante a infecção e a formação dos nódulos (Kan et al., 2007).

A similaridade dos isolados obtidos no presente estudo com as estirpes de referência é um indicativo de bactérias com possível efeito benéfico para inoculação em feijão-caupi. Porém, são necessários ainda testes para avaliação de mecanismos promotores de crescimentos dos mesmos, além de eficiência em casa de vegetação para elucidar o papel dos mesmos.

Segundo Hameed et al. (2004), o estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizobio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio

destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies, principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

5-CONCLUSÕES

Foram obtidos 45 isolados de nódulos de feijão-caupi, todos com crescimento rápido, capazes de reduzir acetileno a etileno e em sua maioria com crescimento ácido. Porém, observou-se baixa similaridade com as estirpes padrão do grupo rizóbio utilizadas na caracterização morfocultural. A maioria dos isolados apresentou também capacidade de crescer em meio YMA com diferentes fontes de carbono, na concentração de 2% de NaCl, em temperatura de até 42 °C, e na faixa de pH 4,0, revelando-se como promissores para inoculação na cultura em regiões com condições climáticas adversas. Estes isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus*, gêneros potencialmente conhecidos como promotores de crescimento vegetal. A caracterização morfofisiológica e genotípica possibilitou um maior conhecimento da população de bactérias de nódulos de feijão-caupi dos solos coletados neste trabalho, e o agrupamento facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de eficiência e seleção de isolados eficientes para a fixação do N₂ em cultivares de feijão-caupi.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, A.S.F.; Carneiro, R.F.V.; Bezerra, A.A.C.; Araújo, F.F.(2009) Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: Efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. *Ciência Rural*, on line. <http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a414cr2014.pdf>. em 06/04/2016.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., Döbereiner, J.(2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fert. Soils*. 30:485-491.

- Barros, M.F. C.; Bebé, F. V.; Santos, T. O.; Campos, M. C. C. (2009) Influência da aplicação de gesso para correção de um solo salino-sódico cultivado com feijão caupi. *Revista de biologia e ciências da terra*, 9:77-82.
- Borges, P.R.S.; Saboya, R. de C.C.; Saboya, L.M.F.; Santos, E.R. dos; Souza, S.E.A. (2012) Distribuição de massa seca e rendimento de feijão-caupi inoculadas com rizóbio em Gurupi, TO. *Revista Caatinga*, 25:37-44.
- Bratti, A. E.; Xavier, G. R.; Rumjanek, N. G.; Martins, C. M.; Zilli, J. E.; Guerra, J.G.M.; Almeida, D. L. DE; Neves, M. C. P. (2005) Levantamento de Rizóbios em Adubos Verdes Cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA), Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, 21p. (Documento 204).
- Brito, M. de M. P.; Muraoka, T.; Silva, E. C. (2009) Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ^{15}N . *R. Bras. Ci. Solo*, 33:895-905.
- Carvalho, F.G. (2003) Variabilidade de Isolados de Estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para cultura da soja. Tese (Doutorado em Ciência do solo)-Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, 104 p.
- Castellane, T. C. L.; Lemos, E. G. M. (2007) Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42:1503-1506.
- Cavaglieri L., Passone A., Etcheverry, M (2004) Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Research in Microbiology*, 155:747-754
- Cavalcante, F. G.; Sousa, J. B.; Bertini, C. H. C. M.; Martins, S. C. S.; Martins, C. M. (2015) Tolerância à salinidade e uso de fontes de carbono de estirpes de rizóbio oriundas de Pentecoste-CE. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer*, 11:2384-2397.
- Chagas Junior, A. F.; Oliveira, L. A.; Oliveira, A. N. (2010). Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32:161-169.
- Costa, C. M. C.; Maia, L. C.; Cavalcante, U. M. T.; Nogueira, R. J. M. C. (2001) Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). *Pesquisa agropecuária brasileira*, 36: 893-901.
- Costa, E. M. (2013) Potencial de promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi em solos do Sudoeste piauiense. Dissertação (Mestrado). Universidade federal de Lavras
- Coutinho, H. L. C.; Oliveira, V. M.; Moreira, F. M. S. (2000) Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria: agronomic and ecological applications. In:

- Priest, F. G.; Goodfellow, M. (Ed.). Applied microbial systematics. Dordrecht: Kluwer, p. 107-134.
- Djilianov, D.; Prinsen, E.; Oden, S.; Van Onckelen, H.; Muller, J. (2003) Nodulation under saltstress of alfalfa lines obtained after in vitro selection for osmotic tolerance. *Plant Science*, 165:887-894.
- Dudeja, S.S.; Giri, R. (2014) Beneficial properties, colonization, establishment and molecular diversity of endophytic bacteria in legumes and non legumes. *African Journal of Microbiology Research*, 8:1562-1572.
- Eaglesham, A.R.J., Ayanaba, A. (1984) Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume nitrogen fixation. In: Subba Rao, N.S. (Ed.). *Selected Topics in Biological Nitrogen Fixation*. Oxford/IBH Publishing, New Dehli, p. 1–35.
- Ehlers, J. D.; Hall, A. E. (1997) Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Field Crops Research*, 53:187-204.
- El Idrissi, M. M.; Abdelmoumen, H. (2008) Carbohydrates as carbon sources in rhizobia under salt stress. *Symbiosis*, 46:33-44.
- Ernani P.R.; Figueiredo O.R.A.; Becegato V.; Almeida J.A. (1996) Decréscimo na retenção de fósforo no solo pelo aumento do pH. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 20: 159-162.
- Favero, V.O.; Silva Junior, E.B.; Xavier, G.R. (2013) Densidade de rizóbios capazes de nodular feijão-caupi em solo do centro-oeste. In: XXIII Jornada de Iniciação Científica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013. Anais. Seropédica: UFRRJ, 2013. CD-ROM
- Fernandes Júnior, P.I. (2009) *Caracterização fenotípica e produção de biopolímeros por bactérias isoladas de nódulos de Guandu [Cajanus cajan (L.) MILLSP.]*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ; p.183.
- Ferreira, M.C.S.; Andrade, D.O.; Chueire, L.M.; Takemura, S.M.; Hungria, M. (2000) Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology and Biochemistry*, 32: 627-637.
- Franco, M.C.; Cassini, S.T.A.; Oliveira, V.R.; Vieira, C.; Tsai, S.M. (2002) Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. *Pesq. agropec. bras.*, 37:1145-1150,
- Fred, E. B.; Waksman, S. Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York: McGraww Hill, 1928. 145p.
- Freitas, A. D. S.; Vieira, C. L.; Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Lyra, M. C. C. P. (2007). Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, *Bragantia*, 66:497-504.

- Gardener, B. B. M. (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*, 94:1252-1258.
- Graham, P.H. (1991) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.*, 38:475-484.
- Gualter, R. M. R. (2010) Efeito da Inoculação com Diferentes Estirpes de Rizóbio na Nodulação, Fixação Biológica de Nitrogênio e na Produtividade em Feijão-Caupi Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Seropédica-RJ, Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRRJ, p.85.
- Hameed, S.; Yasmin, S.; Malik, K. A.; Zafar, Y.; Hafeez, F. Y. (2004) *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*, 39:179-185.
- Hara, F. A. S.; Oliveira, L. A. (2004) Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, 34:343-357.
- Hara, F. A. S.; Oliveira, L. A. (2005) Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. agropec. bras.*, 40: 667-672.
- Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D., Jackson, E.K.; Burns, R.C. (1968) The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. *Plant Physiology*, Rockville, 43:1185-1207.
- Hashem, F. M.; Swelim, D. M.; Kuykendall, L. D.; Mohamed, A. I.; Abdel-Wahab, S. M.; Hegazi, N. I. (1998) Identification and characterization of salt- and thermo-tolerant *Leucaena*-nodulating *Rhizobium* strains. *Biol Fertil Soils*, 27:335-341.
- Hollingsworth, R.; Smith, E.; Ahmad, M.H. (1985) Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. *Archives of Microbiology*, 142: 18-20.
- Howieson, J.G.; Ewing, M.A. (1986) Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* Symbiosis. *Aust. J. Agric. Res.*, 37:55-64.
- Hungria, M.; Chueire, L.; Coca, R. G.; Megias, M. (2001) Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybeans nodules in Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33:1349-1361.
- Jensen, J. B.; Peters, N. K.; Bhuvaneshwaril, T. V. (2002) Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 11: 2978-2986.
- Kan, F.L.; Chen, Z.Y.; Wang, E.T.; Tian, C.F.; Sui, X.H; Chen, W.X. (2007) Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from root

- nodules of herbaceous legumes grown in Qinghai- Tibet plateau and in other zones of China. *Archives of Microbiology*, v.188, p.103 -115.
- Kubota, F. Y.; Neto, A. C. de A.; Araújo, A. P.; Teixeira, M. G. (2008) Crescimento e acumulação de nitrogênio de plantas de feijoeiro originadas de sementes com alto teor de molibdênio R. *Bras. Ci. Solo*, 32:1635-1641.
- Lacerda, C. F.; Assis Júnior, José O.; Lemos Filho, L. C. A.; Oliveira, T. S.; Guimarães, F. V.A.; Gomes-Filho, E.; Prisco, J. T.; Bezerra, M. A. (2006) .Morpho-physiological responses of cowpea leaves to salt stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18:455-465.
- Leite, J.; Santos, M. M.; Santos, N. T.; Oliveira, W. S.; Malheiros, M.G.; Santos, E. E. F.; Martins, L. M. (2009) Nodulação em Feijão-Caupi sob Estresse Salino em Neossolo Flúvico. *Rev. Bras. De Agroecologia/nov*,4:2158-2161.
- Li, D.; Alexander, M. (1988) Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. *Plant and Soil*,108:211-219.
- Li, J.H.; Wang, E. T.; Chen, W. F.; Chen, W. X. (2008) Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology & Biochemistry*, 40 238–246.
- Lie TA (1974) Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: Quispel A (ed) *The biology of nitrogen fixation*. North Holland, Amsterdam, pp 555–582.
- Lima, C. J. G. S.; Oliveira, F. A.; Medeiros, J. F.; Oliveira, M. K. T.; Almeida Júnior, A. B. (2007) Resposta do feijão caupi a salinidade da água de Irrigação. *Revista Verde*, 2:79–86.
- Lima, A. A. (2009) *Caracterização e seleção de rizóbios de Mucuna*. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Seropédica- RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, p.92.
- L'Taief, B.; Sifi, B.; Zaman-Allah, M.; Horres, R.; Molina, C.; Beebe, S.; Winter, P.; Kahl, G.; Drevon, J.; Lachaâl, M. (2012). Genotypic variability for tolerance to salinity and phosphorus deficiency among N₂-dependent recombinant inbred lines of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *African Journal of Microbiology Research*, 6:4205-4213.
- Marra, L. M.; Soares, C. R. F. S.; Oliveira, S. M.; Ferreira, P. A. A.; Soares, B. L.; Carvalho, R. F.; Lima, J. M.; Moreira, F. M. S. (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil* 357:289–307.
- Martinez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F.M.; Franco, A.A.; Graham, P.; Pardo, M.A. (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulantig *Phaseolus*

- vulgaris L. beans and *Leucaena* sp. Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41:417- 426.
- Martins, L. M. V.; Xavier, G.R; Neves, M.C.P., Rumjanek, N.G. (1997) Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio". *Seropédica: Embrapa Agrobiologia-CNPAB*. p. 1-14. (Comunicado Técnico,19).
- Martins, L. M. V.; Xavier, G. R.; Rangel, F. W.; Ribeiro, J. R. A.; Neves, M. C. P.; Morgado, L.R.; Rumjanek, N. G. (2003) Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a Strategy for improving grain yield in the Semi-Arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 38:333-339.
- Medeiros, E. V.; Martins, C. M.; Lima, J. A. M.; Fernandes, Y.T. D.; Oliveira, V. R.; Borges, W. L. (2009) Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. *Acta Scientiarum Agronomy*, 31:529-535.
- Miguel, D. L.; Moreira, F. M. S. (2001) Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 25:873-883.
- Moreira, F.M.S; Siqueira, J.O. (2002) *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras, MG, UFLA. 626p.
- Moreira, F.M. de S.; Siqueira, J.O. (2006) *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2.ed. atual. e ampl. Lavras: Ufla, 729p.
- Moreira, F.M.S. (2008) Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae. In: Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussard, L. (ed.). *Biodiversidade dos Solos em Ecossistemas Brasileiros*. Lavras: Editora da UFLA, p. 299-322.
- Nascimento, C.S.; Lira Junior, M.A.; Stamford, N.P.; Freire, M.B.G.S.; Sousa, C.A. (2008) Nodulação e produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) sob efeito de plantas de cobertura e inoculação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:579-587.
- Nascimento, L. R. S.; Sousa, C, A.; Santos, C, E. R. S.; Freitas, A. D. S.; Vieira, I. M. M. B.; Sampaio, E. V. S. B. (2010) Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.* 5:36-42
- Neves, M. C. P.; Martins, L. M.; Xavier, G. R.; Rumjanek, N. G. (1998) Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular Caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. II.Zona da Mata. *Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ*, 8p.(Documentos, 47).
- Nóbrega, R.S.A.; Lacerda, A.M.; Mota, J.S.; Moreira, F.M.S. (2004) Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. *Ciência e Agrotecnologia*, 28:899-905.

- Nosoline, S. M. (2012) Avaliação da produção de biomassa vegetal e grãos por cultivares de feijão-caupi. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ. p46.
- Patil, S. M.; Patil, D. B.; Patil, M. S.; Gaikwad, P. V.; Bhambudekar, S. B.; Patil, P. J. (2014) Isolation, characterization and salt tolerance activity of Rhizobium sp. from root nodules of some legumes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3:1005-1008.
- Pavan, M.A.; Bingham, F.T.; Pratt, P.F. (1982) Toxicity of aluminium to coffee in Ultisol and Oxisols amended with CaCO₃ and CaSO₄. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46:1201-1207.
- Perret, X.; Staehelin, C.; Broughton, W.J.. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 64:180–201.
- Pessoa, A. C. S.; Ribeiro, A. C.; Chagas, J. M.; Cassini, S. T. A. (2001) Atividades de nitrogenase e redutase de nitrato e produtividade do feijoeiro “ouro negro” em resposta à adubação foliar com molibdênio. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:217-224.
- Rinaudi, L.V.; Giordano, W.(2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 304:1-11.
- Rumjanek, N.G.; Fonseca, M.C.C. da; Xavier, G.R. , (2004) Quorum sensing em sistemas agrícolas: comportamento multicelular em procaríoto via comunicação intercelular. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* , n.33, p.35-50.
- Rumjanek, N. G.; Martins, L. M. V.; Xavier, G. R.; Neves, M. C. P. (2005) Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. de A.; Ribeiro, V. Q. (Eds). *Feijão caupi: avanços tecnológicos*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica,. Cap. 8. P. 281-335.
- Sampaio, M. T, Maluf, W. R. (1999) Adubação verde: como contribuir para a saúde da horta, do homem e ainda obter lucro. *Boletim Técnico de Hortaliças* nº 38. UFLA. 1ª edição.
- Sampaio, Fernanda Bueno. (2013) Isolados de rizóbios capturados por genótipos silvestres de feijoeiro: obtenção, morfologia e uso de fontes de carbono. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –Goias-GO, Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos –EAEA-UFG, 86p
- Santos, C. E. R. S.; Stamford, N. P.; Neves, M.C. P.; Runjanek, N. G.; Borges, W. L.; Bezerra, R. V.; Freitas, A. D. S. (2007). Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 2, n. 4, p. 249-256.
- Silva, L.E.S.F.(2003) Fixação do N₂ no caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pela interação *Bradyrhizobium* sp. x *Glomus clarum* sob condições de estresse hídrico Dissertação (Mestrado)- Recife-PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRP, 102 p.

- Silva, V.N. et al. (2006). Co-inoculação de sementes de caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 36:95-99.
- Silva Júnior, E.B. da; Fernandes Júnior, P.I.; Oliveira, P.J. de; Rumjanek, N.G.; Boddey, R.M.; Xavier, G.R. (2012) Eficiência agronômica de nova formulação de inoculante rizobiano para feijão-caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*,47:138-141.
- Singh, A. K. Singh, G.; Bhatt, R. P.; Pant, S.; NagloT, A.; Singh, L. (2011) Sugars waste, an alternative growth and complete medium for fast growing *Rhizobium* cells. *African Journal of Microbiology Research*, 5:3289-3295.
- Singleton PW, El Swaify SA, Bohlool BB (1982) Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl Environ Microbiol.* 44:884–890.
- Smyth, T.J.; Cravo, M.S.; Melgar, R.J. (1991) .Nitrogen supplied to corn by legumes in a Central Amazon Oxisol. *Tropical Agriculture*,68:366-372.
- Sprent JI, Zahran HH (1988) Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. In: Beck DP, Materon LA (eds) *Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture*. Martinus Nijhoff, W. Junk, Dordrecht, The Netherlands, p.145–151.
- Soares, A. L. L.; Pereira, J.P.A.; Ferreira, P. A .A ; Vale, H. M .M ; Lima, A. J.; Andrade, M. J. B.; Moreira, F. M. S. (2006) Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I-caupi. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30:795-802.
- Stewart, W. D. P.; Fltzgerald, G. P.; Burris, R. H. (1968) Acetylene Reduction by Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. *Archiv für Mikrobiologie*, 62:336—348.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2004) *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed,. 719p.
- Takami, M., Akiba, T., Horikishi, K. (1990) Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. *Applied Microbiology Biotechnology*, 34:157-162.
- Thies, J.E.; Bohlool, B.; Singleton, P.W. (1991) .Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaeae*, *Macroptilium atropurpureum*. *Applied and Enviromental Microbiology*,.57:1540-1545.
- Vieira, R. F.; Tsai, S. M.;Teixeira, M. A. (2005) Nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em feijoeiro com estirpes nativas de rizóbio, em solo tratado com lodo de esgoto. *Pesq. agropec. bras.*,.40:1047-1050.
- Vincent, J. M. (1970) *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell Scientific.164p.

- Xavier, G. R.; Martins, L. M.; Rumjanek, N. G.; Neves, M. C. P. (2007) Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. *Caatinga*, 20:01-09
- Woomer, P.; Singleton, P.; and Bohlool, B.B. (1988) Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Applied and Environment Microbiology*, 54:1112-1116.
- Woomer, P.L. (1994) Most probable number counts. In: Weaver, P.W.; Angle, J.S.; Bottomely, P.S. (eds) *Methods of soil analysis*. Wisconsin: Soil Science Society of American Book, p. 59-79.
- Zilli, J.E.; Valisheski, R.R.; Freire-Filho, F.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. (2004) Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 35:281-287.
- Zilli, J. E.; Valicheski, R. R.; Rumjanek, N. G.; Simões-Araújo, J. L; Freire Filho, F. R.; Neves, M. C. P. (2006) Eficiência simbiótica de estirpes de Bradyrhizobium isoladas de solo do Cerrado em caupi. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 41:811-818.
- Zilli, J. E.; Marson, L. C.; Marson, B. F.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R. , (2009a) Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. *Acta Amazonica*, 39:749-758.

4-RESUMO E CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da coinoculação de plantas de feijão-caupi com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e produção de biomassa da cultura e isolar, caracterizar de forma morfocultural, fisiológica e genotípica as rizobactérias, principalmente as dos gêneros *Azospirillum* e *Bradyrhizobium* associadas a plantas feijão-caupi. O trabalho foi dividido em duas etapas, sendo conduzidos em casas de vegetação e nos laboratórios de Ecologia Microbiana e Gramíneas da Embrapa Agrobiologia-Seropédica-RJ. Na primeira etapa, para avaliar o efeito da coinoculação de plantas de feijão-caupi com bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e produção de biomassa da cultura um experimento, foi realizado, em casa de vegetação, em blocos casualizados com dez tratamentos e três repetições. Os tratamentos consistiram da inoculação da cultivar Mauá com a estirpe SEMIA 6462 de forma individual e coinoculada com as estirpes de *Azospirillum*; a mistura das cinco estirpes de *Bradyrhizobium* de forma individual e coinoculadas com as estirpes de *Azospirillum*; testemunha nitrogenada (50 Kg.ha⁻¹) e testemunha absoluta (sem adubação nitrogenada e inoculação). Na segunda etapa, para prospecção de novas rizobactérias da rizosfera, raiz e nódulos de feijão-caupi, um experimento foi conduzido, em casa de vegetação, utilizando-se solos rizosféricos de quatro propriedades no Estado do Rio de Janeiro, em vasos com 4 tratamentos (2 solos de Cachoeiras de Macacu e 2 de Magé) e 12 repetições com a cv. Mauá. Após 35 e 45 dias do plantio, amostras de raízes e rizosfera foram coletadas, respectivamente, e utilizadas para a contagem,

isolamento e caracterização morfofisiológica, fisiológica e genotípica das rizobactérias.

Diante dos resultados obtidos conclui-se que:

Na etapa I foi observado que a coinoculação entre a estirpe de *Bradyrhizobium* SEMIA 6462 e a estirpe de *Azospirillum* BR 11001 proporcionou maior nodulação, um incremento na massa seca de nódulos e um incremento de 25% na biomassa seca da parte aérea na cultivar Mauá, o que caracteriza um efeito significativo da coinoculação entre as estirpes de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na nodulação e biomassa de feijão-caupi.

Na etapa II foram isoladas 32 bactérias diazotróficas da rizosfera e raiz de feijão-caupi, cultivar Mauá, sendo 6,7% associados às raízes e 93,3% provenientes do solo rizosférico. Estes isolados apresentaram em sua maioria borda da colônia inteira (81,25%) e coloração branca (71,87%) e produziram de 0,31 a 0,41 μg de AIA por mg ptn^{-1} . Todos os isolados foram capazes de reduzir acetileno e produzir sideróforos, porém apenas 26% apresentaram capacidade de solubilização de fosfato. Destes, 20 pertenciam ao gênero *Azospirillum spp*, 6 ao gênero *Pseudomonas spp* e um isolado foi identificado como *Rhizobium*.

Foram obtidos, também na etapa II, 45 isolados de nódulos de feijão-caupi, todos capazes de reduzir acetileno a etileno, com crescimento rápido e em sua maioria com crescimento ácido (89%), colônias com forma circular (80%), borda inteira (80 %) e elevação plana (80%). Na caracterização fisiológica, 90% dos isolados foram capazes de crescer em meio YMA com diferentes fontes de carbono e 53% na concentração de 2% de NaCl, 64% cresceram na temperatura de 42 °C e 53% faixa de pH 4,0. Destes isolados, 19 pertenciam ao gênero *Bacillus*, 7 ao gênero *Rhizobium*, 4 ao gênero *Bradyrhizobium*. e 4 ao gênero *Paenibacillus*.

A caracterização morfofisiológica e genotípica, realizada na etapa II, possibilitou um maior conhecimento da população de rizobactérias de feijão-caupi dos solos coletados, sendo os gêneros encontrados, potencialmente conhecidos como promotores de crescimento vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, T.; Meier, R.; Toth, R.; Weber, H.C. (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L.. *The New Phytologist*, 110:363-370.
- Andrade Júnior, A. S.; Santos, A. A.; Sobrinhos, C. A.; Bastos, E. A.; Melo, F. B.; Viana, F. M. P.; Freire Filho, F. R.; Carneiro, J. S.; Rocha, M. M.; Cardoso, M. J.; Silva, P.H. S.; Ribeiro, V. Q. (2003) *Cultivo de feijão-caupi*. EMBRAPA MEIO-NORTE Sistemas de Produção, 2 Versão Eletrônica. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/index.htm>>. Acesso em 27 de abril de 2013.
- Andrade Júnior, A.S. (2000) Viabilidade da irrigação, sob risco climático e econômico, nas microrregiões de Teresina e Litoral Piauiense.. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem)-Piracicaba- SP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ, 566p.
- Asghar, H.N., Zahir, Z. A.; Arshad, M.; Khaliq, A. (2002) Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, 35:231-237. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00374-002-0462-8#page-1> em: 24 de abril de 2013.
- Ashraf, M.; Hasnain, S.; Berge, O.; Mahmood, T. (2004) Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, 40:157-162.
- Baldani, V.L.D.; Oliveira, E.; Balota, E.; Baldani, J.I.; Kirchhof, G.; Döbereiner, J. (1997) *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*: Rio de Janeiro, 69:116.

- Balota, E. L.; Lopes, E. S.; Hungria, M.; Döbereiner, J. (1997) Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízico-arbusculares na cultura da mandioca. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 32:627-639.
- Barea J.M.; Pozo M.J.; Azcón, R.; Azcón-Aguilar, C. (2005) Microbial cooperation in the rhizo-sphere. *J Exp Bot*, 56:1761-78.
- Barriuso, J.; Solano, B. R.; Lucas, J. A.; Lobo, A. P.; García-Villaraco, A.; Mañero, F. J. G. (2008) Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria. In: Ahmad, I.; Pichtel, J.; Hayat, S. (ed). *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*, p. 1-17.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16:729-770.
- Basso, S.M.S. (1999) Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. e *Lotus* L. Tese (Doutorado em zootecnia) Porto Alegre - RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, 268.
- Broek, A. V.; Vanderleyden, J. (1995) The genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, 14:445-466.
- Cardoso, M. J.; Ribeiro, V. Q. (2006) Desempenho agrônômico do feijão-caupi, cv. Rouxinol, em função de espaçamentos entre linhas e densidades de plantas sob regime de sequeiro. *Revista Ciência Agronômica*, 37:102-105.
- Carneiro, M. A. C.; Siqueira, J. O.; Curi, N.; Moreira, F. M. S. (1999) Efeitos da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e da aplicação de fósforo no estabelecimento de forrageiras em solo degradado. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 34:1669-1677.
- Cassini, S.T.A.; Franco, M.C. (2006) *Fixação biológica de nitrogênio: microbiologia, fatores ambientais e genéticos*. In: Vieira, C.; Paula Junior, T.J.; Borém, A. (Eds). *Feijão: 2 ed.* Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p.143-159.
- Castro, C. M.; Alves, B. J. R.; Almeida, D. L.; Ribeiro, R. L. D. (2004) Adubação verde como fonte de nitrogênio para a cultura da berinjela em sistema orgânico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:779-785.
- Ceccon, G.; Matoso, A. O. Feijão-caupi é pesquisado no centro-oeste. <http://www.agrosoft.org.br/agropag/216241.htm> em 09/09/2015.
- Chagas JR., A. F.; Oliveira, L. A. de; Oliviera, A. N. de (2009) Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. *Revista Ceres*, 56:812-817.
- Chang, W. S; Van De Mrotel, M. Nielsen, L.; Guzman, G.N.; Li, X.; Halverson, L.J. (2007) Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated

- microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*, 189:8290-8299.
- CIF-Centro de inteligência do feijão. Pragas e Doenças. Disponível em http://www.cifeijao.com.br/index.php?p=pragas_doencas. em 14/09/2015.
- Cleland, R.E. 2010. Auxin and cell elongation. In: Davies, P.J. (Ed.), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. 3d. New York: Springer Dordrecht Heidelberg London, p 204–220.
- Conab (2016) Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2015/2016: Sexto levantamento, março 2016. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_03_11_15_20_36_bol_etim_graos_marco_2016.pdf em 26 /4/2016.
- Cordeiro, L. Fixação do Nitrogênio. In: Kerbauy G. B. *Fisiologia vegetal*. 2004. p.76-93.
- Damasceno-Silva, K. J. (2009) *Estatística da produção de feijão-caupi*. Portal do agronegócio. Online. <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=34241>. em 04 /05/2013.
- Dantas, J. P.; Marinho, F. J. L.; Ferreira, M. M. M.; Amorim, M. dos. N.; Andrade, S. I. de O.; Sales, A. L. de. (2002) Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. *Revista brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 6:425-430.
- Dantas, J. S.; Souza, A. P.; Farias, M. F.; Nogueira, V. F. B. (2009) Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. *Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia*, 2:213-218.
- Day, J.M.; Roughley, R.J.; Eaglesham, A.R.J.; Dye, M.; White, S.P. (1978) Effect of high soil temperatures on nodulation of cowpea, *Vigna unguiculata*. *Annals of Applied Biology*, 88:476-481.
- Döbereiner, J.; Day, J.M. (1975) *Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites*. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J. (Eds). *Nitrogen fixation; proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman: Washington State University, 2:518-538.
- Döbereiner, J. (1984) Nodulação e fixação de nitrogênio em leguminosas florestais. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 19:83-90.
- Döbereiner, J.; Baldani, V.L.D.; Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Itaguaí- RJ, Embrapa-CNPAB. 60p.

- Döbereiner, J. (1995) Isolation and identification of aerobic nitrogenfixing bacteria from soil and plants. In: ALEF, K.; NANNIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic, p.134-141.
- Döbereiner, J.; Baldani, J.I. (1982) Bases científicas para uma agricultura biológica. *Ciência e Cultura*, 34:869-881.
- Duque, F. F.; Neves, M. C. P.; Franco, A. A.; Victoria, R. L.; Boddey, R. M. (1985) The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. *Plant and Soil*, 88:333-343.
- Embrapa Meio-Norte (2015). Feijão-Caupi.: <https://www.embrapa.br/meio-norte/cultivos>. em 08 /09/2015.
- Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Solos . (1997). *Manual de métodos de análises de solo*. 2. ed. Rio de Janeiro-RJ: Embrapa-CNPQ, 212 p.
- Embrapa Semi-Árido. *Agrishow Semiárido: Embrapa lança BRS Pujante, variedade de feijão caupi produtivo e boa de panela* (2008). <<http://www.cpatsa.embrapa.br/imprensa/noticias/agrishow-semi-arido-embrapa-lanca-brs-pujante-variedade-de-feijao-caupi-produtivo-e-bom-de-panela/>>. em 27/04/2013.
- Ehlers, J.D.; Hall, A.E. (1997) Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crops Research* 53 187-204.
- Evans, H.J.; Burris, R.H. (1992) *Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years*. In: Stacey, G.; Burris, R.H.; Evans, H.J (Eds). *Biological Nitrogen Fixation*. New York: Chapman and Hall. p.1-42.
- Fao, 2008. *FAOStat*. <http://faostat.fao.org/> em 25/04/2015.
- Ferlini, H. A. (2006) Co-Inoculación en Soja (*Glycine max*) con *Bradyrhizobium japonicum* y *Azospirillum brasilense*. *Articulos Técnicos – Agricultura*. em: <http://www.engormix.com/co_inoculacion_soja_glycine_s_articulos_800_AGR.htm>. 30/03/2016.
- Fernandes Junior, P. I.; Lima, A.A.; Passos, S.R.; Gava, C. A. T.; Oliveira, P. J.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R. (2012) Phenotypic diversity and amylolytic activity of fast growing rhizobia from pigeonpea [*Cajanus cajan*(L.) Millsp.]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43:1604-1612.
- Filgueira, F. A. R. *Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças*. 2. ed. rev. e ampl. Viçosa: UFV, 2003. 412 p.
- Finlay, R. D. (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany*, 59:1115-1126.

- Franco, A. A.; Döbereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathológica*, 20:68-74.
- Franco, M. C.; Cassini, S.T. A.; Oliveira, V. R.; Vieira, C.; Tsai, S. M (2002) Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso americano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37:1145-1150.
- Freiberg, C.; Fellay, R.; Bairoch, A.; Broughton, W.J.; Rosenthal, A.; Perret, X. (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*, 387:394–401.
- Freire Filho, F. R. (1988) *Origem, evolução e domesticação do caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp.)*. In: Araújo, J. P. P. de; Watt, E.E. (Org). *O Caupi no Brasil*. EMBRAPA-CNPAP/ Ibadan: IITA: Goiânia, p.25-46.
- Freire Filho, F. R.; Ribeiro, V. Q.; Rocha, M. de M.; Lopes, A. C. A. (2003) Adaptabilidade e estabilidade da produtividade de grãos de genótipos de caupi enamador de tegumento mulato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:591-598.
- Freire Filho, F. R.; Ribeiro, V. Q.; Barreto, P. D.; Santos, A. A. (2005) Melhoramento genético. In: Freire Filho, F.R; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V. Q. (Eds). *Feijao-Caupi – Avancos tecnologicos*. Embrapa-informação Tecnológica Brasília, p29-92.
- Freire Filho, F. R.; Ribeiro, V. Q.; Barreto, P. D.; Santos, C. A. F. (1999) Melhoramento genético de Caupi (*Vigna unguiculata (L.) Walp.*) na Região do Nordeste. In: Queiroz, M.A.; Goedert, C.O.; Ramos, S.R.R. (Eds.). *Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro*. Petrolina: Embrapa-CPATSA; Brasília, DF: Embrapa-Cenargen,. Não paginado. <<http://www.cpatosa.embrapa.br/catalogo/livrorg/caupinordeste.pdf>>. em 05/09/2015.
- Freire Filho, F. R. Ribeiro, V. Q.; Rocha, M. M.; Damasceno E Silva, K. J.; Nogueira, M. S. R.; Rodrigues, E. V. (2011) Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. IV Reunião nacional de Biofortificação. Teresina, Piauí, Brasil, 2011. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/897440/1/Producaomelhoramento.pdf>. em 09/09/2015.
- Freire, J.R.J. (1992) *Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas*. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. (Eds). *Microbiologia do Solo*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP, p.121-140.
- Freitas, S.S.; Vlldoso, C.I.A. (2004) Rhizobacteria and growth promotion of citrus plants. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28:987-994.
- Giller, K.E., Wilson, K.J. *Nitrogen Fixation in Tropical Cropping Systems*. CAB International, Wallingford, UK, 1993. 313p.

- Gitti, D. C.; Arf, O.; Kaneko, F. H.; Rodrigues, R. A. F.; Buzetti, S.; Portugal, J. R.; Corsini, D. C. D. C. (2012) Inoculação de *Azospirillum brasilense* em cultivares de feijões cultivados no inverno. *Revista Agrarian*, 5:36-46.
- Grace, C.; Stribley, D. P. (1991) A safer procedure for routine staining of vesiculararbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 95:1160-1162.
- Grangeiro, T. B.; Castellón, R. E. R.; Araújo, F. M. M. C. de; Silva, S. M. de S.; Freire, É de A.; Cajazeiras, J. B.; Andrade Neto, M; Grangeiro, M. B.; Cavada, B. S. (2005) Composição bioquímica da semente. In: Freire Filho, F. R.; Lima, J. A. A.; Viana, F. M. P.; Ribeiro, V. Q. Feijão caupi: avanços tecnológicos. Embrapa Meio-Norte, Teresina, p.337-365.
- Gray, E.J.; Smith, D. L. (2005) Intracellular and extracelular PGPR:commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology And Biochemistry*, 37: 395-412.
- Gualter, R. M. R.; Boddey, R. M.; Rumjanek, N. G.; Freitas, A. C. R.; Xavier, G. R. (2011) Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 46:303-308.
- Hao, X., C. M. Cho, G. J. Racz and C. Chang. (2002) Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Nutr. Cycl. Agroecosys*. 64:213-224.
- Hardy, R. W. F. (1993) Biological Nitrogen Fertilization: Present and future applications. In: Srivastava, J. P.; Aldermans, H. (Ed.). *Agriculture and Environmental Challenges. Agricultural Sector Symposium, 13. Proceedings.* Washigton: The World Bank. p.109- 117.
- Hassan, U.; MIRZA, M. S.; MEHNAZ, S.; RASUL, G.; MALIK, K. A. (1998) Physiological, biochemical and molecular characterization of *Azospirillum* spp. Isolated from cereal crops. In: Malik, K. A.; Mirza, M. S.; Ladha, J. K., (Eds). *Nitrogen fixation with non-legumes. proceedings of the 7th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, Faisalabad, Pakistan.* Dordrecht: Kluwer. *Developments in Plant and Soil Sciences*, v.79 p. 159.
- He, Z. L. and J. Zhu. (1998) Microbial utilization and transformation of phosphate adsorbed by variable charged minerals. *Soil Biol. Biochem.* 30:917-923.
- Hellriegel, H., Wilfarth, H. (1888) Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. *Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins Rübenzucker-industrie industrie deutschen Reiches*, p. 1- 234.
- Hoffmann, L. V. (2007) *Biologia Molecular da Fixação Biológica do Nitrogênio.* In: Silveira, A. P. D. da; Freitas, S. dos S (Ed.). *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental.* Instituto Agronômico Campinas, Campinas, SP, p.153-164.

- Holguin, G.; Bashan, Y. (1996) Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology Biochemistry*. 28:1651-1660.
- Hungria, M. (2011) Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo Custo. – Embrapa Soja, Londrina, PR,.36p. (Documentos 325).
- Imlay, J.A. (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77: 755–76.
- Khan, A. A.; Jilani, G.; Akhtar, M. S.; Naqvi, S. M. S.; Rasheed, M. (2009a). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *J. AGRIC. BIOL. SCI.* 1:48-58.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends Biotechnol* 7:39–43.
- Lacerda, A. M. (2002) Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. com estirpes selecionadas de rizóbio. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). Lavras-MG, Universidade Federal de Lavras-UFLA, 44p.
- Lie, T. A. (1981) Environmental physiology of the legume-Rhizobium symbiosis. In: Broughton, W. J. (Ed.). *Nitrogen Fixation*. Oxford: Clarendon Press, p. 104-134.
- Marin, V. A.; Baldani, V. L. D.; Teixeira, K. R. S.; Baldani, J. I. (1999) Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. Seropédica: Embrapa Agrobiologia-CNPAB,. 34p. (Documentos, 91).
- Martins, L. M. V.; Rangel, F.W.; Xavier, G.R.; Ribeiro, J.R.A.; Morgado, L.B.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. (2003) Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biology and Fertility of Soils*, 38: 333-339.
- Mello, M. R. F. de (2001) Efeito de bactérias na promoção de crescimento e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Recife,-PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRP, p.94.
- Mello, N. (2012) *Inoculação de azospirillum brasiliense nas culturas de milho e trigo*. Dissertação (Mestrado). Passo Fundo-RS, Universidade de Passo Fundo-UPF, p.90.
- Melo, S. R.; Zilli, J. E (2009). Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 44:1177-1183.

- Moat, A.G.; Foster, J.W; Spector, M. P. (2002) *Microbial Physiology*. 4 ed. 736p. https://books.google.com.br/books?id=DdTI61UzgC&dq=Moat+e+Foster.+Microbial+Physiology&lr=&hl=pt-BR&source=gbs_navlinks_s em 28 /03/ 2016.
- Moat, A.G.; Foster, J.W. (1996) *Microbial Physiology*. 3 ed. New York: Wiley Liss,. p.437-461.
- Moreira, F.M.S. (1991) Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)-, Seropédica.-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro-UFRRJ, 152p.
- Moreira FMS (2008) Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: Moreira FMS, Siqueira JO, Brussaard L (eds) *Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros*, edn. Ufla, Lavras, p 621–680.
- Moreira, F. M.S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para a caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para produção de inoculantes comerciais. <http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/extensao/boletim-extensao-126.pdf>. em 08 /09/2015.
- Moreira, F.M.S. (2008) Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosae. In: Moreira. F.M.S.; Siqueira, J.O.; Brussard, L. (Ed.). *Biodiversidade dos Solos em Ecossistemas Brasileiros*. Lavras:UFLA, p. 299-322.
- Nascimento, J. T.; Pedrosa, M.B.; Tavares S. J. (2004) .Efeito da variação de níveis de água disponível no solo sobre o crescimento e produção de feijão caupi, vagens e grãos verdes. *Horticultura Brasileira*, 22:174-177.
- Nascimento, L. R. S.; Sousa, C, A.; Santos, C, E. R. S.; Freitas, A. D. S.; Vieira, I. M. M. B.; Sampaio, E. V. S. B. (2010) .Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. *Rev. Bras. Ciênc. Agrár.*5:36-42
- Neilands, J.B.; Leong, S. A. (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review of Plant Physiology*, 37:187-208.
- Nelson, L. M. (2004) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. *Crop Management*. University Way, Kelowna.. Online. < <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>>. em 20/04/2013.
- Neroni, R. F. (2007) *Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à Araucaria angustifolia no estado de São Paulo*. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas). Piracicaba-RJ, Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo- ESALQ-USP, 60p.
- Nicolson, T. H.; N. C. Schenck. (1979). Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. *Mycologia* 71: 178-198.

- Nosoline, S. M. (2012) Avaliação da produção de biomassa vegetal e grãos por cultivares de feijão-caupi. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,UFRRJ. p46.
- Odum, E.P. (1988) Fundamentos de Ecologia. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian,. 927p.
- Olivares, F. L.; James, E. K.; Baldani, J. I. (1997) Infection of mettled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytologist*, New York, 135:723-737.
- Oliveira, A. P ; Araújo, J. S.; Alves, E. U.; Noronha, M. A. S.; Cassimiro, C. M.; Mendonça, F. G. (2001) Rendimento de feijão-caupi cultivado com esterco bovino e adubo mineral. *Horticultura Brasileira*,19:81-84.
- Palaniappan, P.; Chauhan, P.S.; Saravanan, V.S.; Anandham, R.; SA, T. (2010) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biology Fertility Soils*, Berlin, 46:807-816. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g385407120575151/>>. Acesso em: 24 de abril de 2013.
- Peixoto Neto, P. A. S.; Azevedo, J. L.; Araújo, W. L. (2002) Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 29:62-76.
- Peoples, M.B.; Craswell, E.T. (1992) Biological nitrogen-fixation - investments, expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and soil*, 141:13-39.
- Pereira, R. M.; Silveira, É. L.; Carareto-Alves, L. M. Lemos, E. G. M. (2008) Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1921-1927.
- Pereira, J. C.; Neves, M. C. P.; Drozdowicz, A. (1999) .Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília,34: 99-108.
- Perin, L.; Silva; M. F.; Ferreira, J. S.; Canuto, E. L.; Medeiros, A. F. A.; Olivares, F. L.; Reis, V. M. (2003) Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* E *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia*, 37:47 - 53.
- Pinho, J. L. N.; Távora, F. J. A. F.; Gonçalves, J. A. (2005) *Aspectos fisiológicos*. In: Freire Filho, F. R; Lima, J. A. A.; Ribeiro, V. Q. (Ed). *Feijao-Caupi – Avancos tecnologicos*. Brasilia: Embrapa informação Tecnologica, .p.192-210.
- Pinho, J.L.N.; Távora, .F.J.A.F.; Gonçalves,J.A. (2005) .Aspectos fisiológicos. In: Freire Filho, F.R; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V. Q. (Ed). *Feijao-Caupi – Avancos tecnologicos*. Brasilia: Embrapa informação Tecnologica, .p.192-210.

- Raij, B.V. (2004) *Fósforo no solo e interação com outros elementos*. In: Yamada, T.; Abdalla, S.R.S. (Eds). *Fósforo na agricultura brasileira*. Piracicaba, Potafos,. p.106-114.
- Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. (1996) *Biologia vegetal*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 728p.
- Redecker, D.; Morton, J.B.; Bruns, T.D. (2000) Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14:276-284.
- Rifat, H.; Safdar, A.; Ummay, A.; Rabia, K.; Iftikhar, A.. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review *Ann Microbiol* 60:579–598
- Rodrigues, L. S. (2003) *Estudo da Diversidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Associadas a Cultivares de Arroz Inundado*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Seropédica-RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,UFRRJ 96p.
- Sala, V. M. R.; Freitas, S. S.; Donzeli, V. P.; Freitas, J. G.; Gallo, P. B.; Silveira, A. P. D. (2005) Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29:345-352.
- Sala, V. M. R.; Freitas, S. dos S.; Silveira, A. P. D. (2007) Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e bactérias diazotróficas em trigo. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 42:1593-1600.
- Saleem, M.; Arshad, M.; Hussain, S.; Saeed, B. A. (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34:635–648.
- Sarwar, M.; Kremer, R.J. (1995) Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant and Soil*, 172:261-269.
- Sawada H, Kuykendall L.D, Young J.M. (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *Journal of General and Applied Microbiology*, 49:155–179.
- Schwieger, F.; Tebbe, C.C. A (1998) New approach to utilize PCR- single –strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 64:4870-4876.
- Siqueira J.O.; Franco, A. A. (1988) *Biotechnologia do Solo: Fundamentos e perspectivas*. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/FAEPE, p 236.
- Silva, P. S. L.; Oliveira, C. N. (1993) Rendimentos de feijão verde e maduro de cultivares de caupi. *Horticultura Brasileira*,11:133-135.

- Silveira, A.P.D. (1992) *Micorrizas*. In: Cardoso, E.J.B.N.; Saito, S.M.; Neves, M.C.P. (Eds). *Microbiologia do Solo*. Sociedade Brasileira Ciência Solos Campinas. p.257-282.
- Sinimbu, F. (2011) *Feijão-caupi é arma do Brasil Sem Miséria*. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2011/julho/4a-semana/feijao-caupi-e-arma-do-brasil-sem-miseria>>. Acesso em 29 de abril de 2013.
- Smyth, T.J.; Cravo, M.S.; Melgar, R.J. (1991) Nitrogen supplied to corn by legumes in a Central Amazon Oxisol. *Tropical Agriculture*, London, 68:366-372.
- Sommers, E.; Vanderleyden, J. (2004). Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.*, 30:205-240.
- Souto-Padrón, T. (1998) *Soluções tampão*. In: Souza, W. (Ed.). *Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas*. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, p.18-21.
- Sottero, A. N.; Freitas, S. S; Melo, A. M.T.; Trani, P. E. (2006) Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30:225-234.
- Spaepen, S.; Das, F.; Luyten, E.; Michiels, J.; Vanderleyden, J. (2009) Indole-3-acetic acid-regulated genes in *Rhizobium etli* CNPAF512. *FEMS Microbiology Letters*, 291:195-200.
- Sprent, J.I.; Raven, J. A. (1985) Evolution of nitrogen-fixing symbioses. *Biological sciences*, 85:215-237.
- Sprent, J.I. (1971) Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. *Plant and Soil*, Spec. Vol:225-228.
- Stamford, N. P.; Stamford, T. L.M.; Andrade, D. E.G.T.; Michereff, S. J. (2005) *Microbiota dos Solos Tropicais*. In: Sami J. Michereff; Domingos E.G.T. Andrade; Maria Menezes (Eds). *Ecologia e Manejo de Patógeno Radiculares em Solos Tropicais*. Universidade Federal Rural de Pernambuco- Recife, p.61-91.
- Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; La Torraca, S.; Magalhães, F. M. M.; Oliveira, L. A.; Pereira, R. M. (1982) Levantamento quantitativo de microorganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazonica*, 12:15-22.
- Teixeira, M. A.; Melo, I. S.;Vieira, R. F.;Costa, F. E. C.; Harakava, R. (2007) Microorganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 42:43-49.

- Thies, J.E.; Singleton, P.W.; Bohlool, B.B. (1991) Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:19-28.
- Tsien, H. C.; Dreyfus, B. L.; Schmidt, E. L. (1983) Initial stages in the morphogenesis of nitrogen-fixing stem nodules of *Sesbania rostrata*. *Journal of Bacteriology*, Washington, 156:888-897.
- Unkovich, M.; Herridge, D.; Peoples, M.; Cadisch, G.; Boddey, R.; Giller, K.; Alves, B.; Chalk, P. (2008) *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems*. Canberra: ACIAR, 258 p.
- Vessey, J. K.; Pawlowski, K.; Bergman, B. (2004) Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil*, Dordrecht, 266:205-230.
- Vessey, J. K.; Pawlowski, K.; Bergman, B. (2005) Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil*, 274:51–78.
- Vinhal-Freitas, I. C.; Rodrigues, M. B. (2010) Fixação biológica do nitrogênio na cultura do milho. *Agropecuária Técnica*, 31:143-154.
- Xavier, G. R.; Silva, F. V.; Zilli, J. E.; Rumjanek, N. G. (2004) *Adaptação de método para extração de DNA microbiano*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 24p. (Documentos 171).
- Wang, E. T.; Martínez-Romero, J.; López, I.(2001) Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas.. In: Martínez-Romero,E.; Martínez-Romero, J. (Eds) *Microbios en línea*. UNAM: p131-156. Disponível em: <<http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/>>. Acesso em: 20 de abril de. 2013.
- Yang, J.; Kloepper. J.W.; Ryu, C.M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, 14:1-4.
- Yates, M. G.; Souza, E. M. de; Kahindi, J. H. (1997) Oxygen, hydrogen and nitrogen fixation in *Azotobacter*. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 29:863-869.
- Zahir, Z.A.; Arshad, M.; Frankenberger Jr. W. T. (2003) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives In Agriculture. *Advances in Agronomy*,81:97–168.
- Zakhia, F.; Lajudie, P. (2001) Taxonomy of Rhizobia. *Agronomie*, 21:569-576.
- Zilli, J.E. Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] em áreas do cerrado. 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). Seropédica –RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,137 p.

- Zilli, J.E.; Valisheski, R.R.; Freire-Filho, F.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. (2004) Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 35:281-287.
- Zilli, J. E.; Xavier, G. R.; Moreira, F. M. S.; Freitas, A. C. R.; Oliveira, L. A. (2009b) *Fixação Biológica de Nitrogênio*. In: Zilli, J. E.; Vilarinho, A. A.; Alves, J. M. A. (Eds). A cultura do Feijão-Caupi na Amazônia Brasileira. Boa Vista, RR: Embrapa Roraima, p.185-221.
- Zhang, W. T.; Yang, J. K.; Yuan, T. Y.; Zhou, J. C. (2007) Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Biology and Fertility of Soils*, 1:201-210.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Soluções utilizadas

Soluções Solução salina para diluição seriada

K_2HPO_4	sol. 10%	1ml
$MgSO_4$	sol. 10%	0,5ml
NaCl	sol. 10%	0,2ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	sol. 1%	0,5ml
FeEDTA	sol. 1,64%	1ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5ml

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H_2SO_4 a 5%
Completar para 1000 ml com água destilada.

Meio NFb (BALDANI & DOBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v. 12, n.4, p 433 - 439, 1980)

Ácido málico		5g
K_2HPO_4	sol. 10%	5ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	sol. 10%	2ml
NaCl	sol. 10%	1ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	sol. 1%	2ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5% em 0,2 N de KOH	2ml
FeEDTA	sol. 1,64%	4ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2ml
Vitamina para meio de cultura		1ml
KOH		4,5g
Extrato de levedura (para meio sólido)		50mg

Ajustar o pH para 6,5 com solução de KOH a 10%
Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar $1,6g\ l^{-1}$ de agar para semi-sólido e $15g\ l^{-1}$ para sólido
Para meio líquido adicionar 1g por Litro de NH_4Cl (Cloreto de amônio)

Meio DYGS (RODRIGUEZ NETO, Summa Phytopathologica, Campinas, v. 12, n. 1-2 p 16, 1986.)

Glicose	2g
Ácido málico	2g
Peptona bacteriológica	1,5g
Extrato de levedura	2g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
Ácido glutâmico	1,5g

Ajustar o pH com solução de KOH a 10% pH 6,0 para *Herbaspirillum*. pH 6,0 para *Gluconacetobacter* (menos ácido málico) ou pH 6,8 para *Azospirillum*. Completar para 1000 ml com água destilada

Meio Batata (BALDANI & DÖBEREINER, Soil Biology & Biochemistry. Oxford, v.12, n. 4, p. 433-439, 1980)

Batata cozida	200 g
Ácido málico	2,5 g
Açúcar cristal	2,5 g
Solução de micronutrientes	2 ml
Solução de vitaminas	1 ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente, adicionar o ácido málico em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol solução a 0,5% em 0,2 N de KOH. Adicionar o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina e ajustar o pH com KOH ate atingir pH 6,8 – 7,0. Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml. Adicionar 1,84 g l-1 de agar para semi-sólido e 15 g l-1 de agar para sólido.

Meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999)

Glicose	10 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 g

Ajustar o pH para 7

Para a formação do precipitado adicionar 100 ml K₂HPO₄ (10%),
50 ml CaCl₂ (10%) ou 5g l⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂.

Adicionar 15g l⁻¹ de agar para meio sólido.

Completar com água destilada para 1000 ml.

Meio 79-YMA (FRED & WAKSMAN, Laboratory manual of general microbiology. New York: McGraw Hill, 1928. 145 p.)

Manitol.....	10 g
K ₂ HPO ₄ Sol. 10 %	1 ml
KH ₂ PO ₄ Sol. 10 %	4 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O Sol. 10 %.....	2 ml
NaCl Sol. 10 %	1 ml
Extrato de levedura	0,4 g
Azul de bromotimol Sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH.....	5 ml
FeEDTA Sol. 1,64 %	4 ml
Vitamina para meio de cultura	1 ml

Ajustar pH para 6,8 – 7,0 com solução de KOH a 10 %

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Adicionar 1,0 g l⁻¹ de agar para semi-sólido e 15 g l⁻¹ para sólido.