

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
JANAÍNA LISOT

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS ISOLADOS DO PLANALTO
CATARINENSE PARA INOCULAÇÃO EM FEIJOEIRO - COMUM (*Phaseolus
vulgaris* L.)**

Curitibanos
2017

JANAÍNA LISOT

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS ISOLADOS DO PLANALTO
CATARINENSE PARA INOCULAÇÃO EM FEIJOEIRO - COMUM (*Phaseolus
vulgaris* L.)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito para avaliação no Curso de
Agronomia, da Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC) *campus* Curitibanos.
Orientadora: Profa. Dra. Glória Regina Botelho

Curitibanos
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Lisot, Janaina
PROSPECÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS EM SOLO VIRGEM DO
PLANALTO CATARINENSE PARA INOCULAÇÃO EM FEIJOEIRO - COMUM
(Phaseolus vulgaris L.) / Janaina Lisot ; orientadora,
Gloria Botelho, 2017.
35 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Agronomia, Curitibanos, 2017.

Inclui referências.

1. Agronomia. 2. Rizobactérias. 3. Curitibanos. 4.
Fixação biológica de N. 5. caracterização. I. Botelho,
Gloria. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Agronomia. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia
Rodovia Ulysses Guimarães km3
CP: 161 CEP: 89520-000 - Curitiba - SC
TELEFONE: (48) 3721-2178 E-mail: agronomia_cba@contato.ufsc.br.

JANAÍNA LISOT

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZÓBIOS ISOLADOS DO PLANALTO CATARINENSE PARA INOCULAÇÃO EM FEIJOEIRO - COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao
Colegiado do Curso de Agronomia, do Campus Curitibanos
da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito
para obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador (a): Profa. Dra. Glória Regina Botelho

Data da defesa:

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

Presidente e Orientador:
Titulação: Doutorado
Área de concentração em Biotecnologia Vegetal
Universidade Federal de Santa Catarina

Membro Titular: Ana Carolina L. Fioreze
Titulação: Doutorado
Área de concentração em *Agronomia*
Instituição *Universidade Federal de Santa Catarina*

Ana Carolina da Costa Lima

Membro Titular: Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares
Titulação: Doutorado
Área de concentração em *Ciência do Solo*
Instituição *UFSC*

Local: Universidade Federal de Santa Catarina
Campus de Curitibanos
Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades, pela saúde e força para superar todas as dificuldades e aproveitar os momentos de alegria, e não apenas na universidade, mas em todas as fases da minha vida.

A minha mãe, Célia Jaqueline Olbertz, minha guerreira e heroína, pois sem ela não teria chegado aonde estou hoje. Ela é minha base e alicerce, e apesar de todas as dificuldades, sempre esteve ao meu lado. Tudo que tenho e sou, devo a ela.

Ao meu pai, Rosan Marcos Lisot, por estar sempre ao meu lado e acreditar em mim, pois sem você eu também não seria quem eu sou.

A minha orientadora Gloria Regina Botelho, por me ensinar e pela paciência todo esse tempo, aprendi muita coisa que levarei comigo por onde for.

A cada momento que pude crescer profissional e pessoalmente, que aprendi com meus professores e colegas.

Muito Obrigada a Todos!

RESUMO

O uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em lavouras de feijão é pouco aplicado por produtores da mesorregião de Curitiba, devido a fatores como falta de conhecimento e incentivo. Os inoculantes existentes no mercado não apresentam eficiência significativa no cultivo de feijão da região, sugerindo que as condições edafoclimáticas marcantes interferem no processo simbiótico. Isto pode ser um fator determinante para a baixa eficiência da inoculação e a pouca procura pelos agricultores. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi isolar e selecionar rizóbios de solos virgens do Planalto Catarinense, mesorregião de Curitiba, para testar a viabilidade desses no cultivo de feijão e sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio. O trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Curitiba. O solo virgem, foi coletado na localidade de Horizolândia, em Curitiba e foi submetido a diluição seriada e inoculado em sementes de feijão, previamente desinfestadas e semeadas em vasos contendo substrato esterilizado, onde as plantas ficaram até o surgimento dos nódulos. Esses foram desinfestados, macerados e a suspensão estriada em placas contendo meio YMA (Yeast Manitol Agar) vermelho congo. As colônias obtidas foram isoladas, purificadas e estocadas em criotubos a -50°C. Cada isolado foi caracterizado fenotipicamente (tipo de borda, elasticidade, coloração, crescimento, alteração de pH e fermentação) e testado quanto à capacidade de solubilização de fosfatos. Obteve-se um total de 36 isolados. Todos os isolados mostraram ser Gram-negativos e com velocidade de crescimento rápida (menos de 72 horas). Metade desses apresentaram reação de pH ácida e a outra metade, básica. Quanto à fermentação, vinte e sete isolados fermentaram tanto a glicose, quanto a sacarose. Vinte e três foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio e dezoito apresentaram produção de AIA. Na análise em planta, constatou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao peso de nódulos. Sete isolados se destacaram quando comparados a estirpe padrão. Esses foram CBSRZ13, CBSRZ15, CBSRZ16, CBSRZ33, CBSRZ03, CBSRZ14 e CBSRZ28. Para peso de raiz e de parte aérea, não se observou diferença significativa. Com os resultados obtidos pode-se afirmar que pelo menos 50% dos isolados são semelhantes a estirpe padrão CIAT 899 e que os isolados CBSRZ13, CBSRZ30 e CBSRZ15 mostraram grande potencial para Rizobactérias.

Palavras-chave: Isolamento, Rizobactérias, Fixação biológica de Nitrogênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS DE SOLOS DA REGIÃO DO PLANALTO CATARINENSE	11
2.2 AUTENTICAÇÃO DE ISOLADOS FORMADORES DE NÓDULOS	12
2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	13
2.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS	13
2.5 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE INDUÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	14
2.7 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS EM PLANTA	16
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS	17
3.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	20
3.3 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE INDUÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL	21
3.3.1 Solubilização de fosfatos	21
3.3.2 Produção de AIA	24
3.4 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS EM PLANTA	26
ABSTRACT	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais difundidas no mundo, por ser uma cultura com alto valor proteico que sustenta grande parte das populações menos desenvolvidas, principalmente países da África e América Latina. O Brasil, além de ser um grande consumidor, com 14,94 kg/hab/ano, é o terceiro maior produtor do grão, com 2,8 milhões de toneladas, perdendo apenas para Myanmar (maior produtor com cerca de 3,8 milhões de toneladas) e Índia (Conab, 2015).

Santa Catarina está em oitavo lugar na produção nacional de feijão, com 138,5 mil toneladas na safra de 2013/2014 (CONAB,2013), sendo a agricultura familiar, responsável por 67% do total desta produção. Segundo EPAGRI (2012), o município de Curitibanos-SC possui a maior produção de Santa Catarina, cerca de 48,8 mil toneladas (28,8 % da produção estadual). Embora o Planalto Catarinense esteja entre as principais regiões produtoras de feijão do estado, a produtividade ainda é limitada por fatores como, manejo inadequado do solo, sementes de baixa qualidade, baixa tecnologia e a deficiência de nitrogênio no solo (ALMEIDA; SANGOI, 1994). Além disso, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio em lavouras de feijão é pouco aplicado por produtores da mesorregião de Curitibanos, devido a fatores culturais, como falta de conhecimento, incentivo de órgãos competentes e a adaptabilidade das estirpes comerciais. Muitas vezes, o produtor deixa de utilizar o inoculante, porque, na primeira interação com o feijoeiro, não alcança resultado satisfatório que pode ocorrer por existir competitividade entre a comunidade de rizóbios estabelecida no solo e aqueles usados em inoculantes comerciais (MARTINS et al., 2012).

Atualmente, o inoculante comercial recomendado para o feijoeiro no Brasil é produzido com uma espécie de rizóbio adaptada aos solos tropicais, *Rhizobium tropici*, resistente a altas temperaturas, acidez do solo e ainda é altamente competitivo, sendo capaz de formar a maioria dos nódulos da planta, predominando sobre a população de rizóbio presente no solo (SOARES et al., 2006).

A eficiência da Fixação Biológica de Nitrogênio, entretanto, depende das condições fisiológicas da planta hospedeira que fornece a energia necessária para que a bactéria possa realizar eficientemente este processo (STRALIOTO; TEIXEIRA; MERCANTE, 2013).

Estudos mostram que o feijão demonstra uma excelente resposta à inoculação destas bactérias fixadoras de nitrogênio, aumentando expressivamente a produção. De acordo com Oliveira e Sbardelotto (2011), a produtividade do feijoeiro comum pode

chegar entre 2.500 Kg ha¹ a 3.000 Kg ha¹ com o auxílio de inoculantes. Estudos mostraram que a inoculação com rizóbio pode aumentar em até 900 kg ha⁻¹, o rendimento de grãos de feijão e os tratamentos que receberam doses completas de Nitrogênio obtiveram rendimento semelhante ao com inoculante (SOARES et al., 2006).

A introdução de bactérias fixadoras de nitrogênio vem crescendo cada vez mais no mercado, devido à ótima resposta que estas proporcionam às plantas cultivadas, a redução de custos com fertilizantes nitrogenados para os agricultores, além de não contaminar a água potável com nitratos. Pensando nesses parâmetros, iniciou-se um trabalho de isolamento e seleção de rizóbios provenientes de solos da microrregião de Curitiba, pois ainda não existem relatos sobre a comunidade dessas rizobactérias existentes nesta região.

O isolamento de bactérias provindas de solos da região pode ser uma alternativa para melhorar o rendimento em lavouras de feijão, uma vez que as aplicações de inoculantes comerciais não mostram bons resultados e este fator pode estar relacionado a adaptação a diferentes condições edafoclimáticas ou pela incapacidade de estabelecer uma nodulação efetiva na presença de rizóbios nativos. A qualidade na adaptação do inoculante está diretamente relacionada ao aumento na produtividade, retorno financeiro mais rápido, além de reduzir os custos com a adubação nitrogenada (MARTINS et al., 2012).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi isolar e selecionar rizóbios nativos de solos virgens do Planalto Catarinense, mesorregião de Curitiba para testar a viabilidade no cultivo de feijão na região e sua eficiência na fixação de nitrogênio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado entre os anos de 2015 e 2017, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Curitibanos, Segundo a Prefeitura de Curitibanos (2013), as coordenadas geográficas do município são 27° 16' 60" Sul para Latitude e 50° 35' 7" Oeste para Longitude.

2.1 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS DE SOLOS DA REGIÃO DO PLANALTO CATARINENSE

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação do Campus Curitibanos - UFSC, em área isolada com plástico transparente, prevenindo a contaminação.

O solo foi coletado da fazenda Dias, na localidade da Horizolândia, no município de Curitibanos. Foi classificado como Cambissolo associado à Nitossolo Bruno (Embrapa, 2004) e a coleta realizada seguindo os procedimentos descritos pela Comissão de Química e Fertilidade de Solo (2004).

Foi realizada a homogeneização e diluição seriada, onde 10g de solo foram misturados com 90mL de solução salina (NaCl) a 0,85% em um erlenmeyer e agitado por 30 min no vortex, desagregando as partículas do solo. Em seguida, foi utilizado 1mL da mistura para 9mL de solução salina 0,85% em tubos de ensaio estéril, para a realização de diluições seriadas até 10^{-8} (WOLLUM, 1982).

As sementes de feijão foram previamente desinfestadas por imersão em álcool 70% por 1 minuto, imersão em hipoclorito de sódio (NaOCl) a 3%, por 1,5 minutos e por fim, realizou-se a lavagem das sementes 10 vezes em água destilada esterilizada (CALAZANS et al, 2010). Posteriormente, as sementes foram pré-germinadas em papel absorvente umedecido com água destilada esterilizada e armazenadas em sacos plásticos limpos, ficando incubadas no escuro a uma temperatura de 28 °C.

Após 48 horas, as sementes foram transferidas para vasos de vidro esterilizados com capacidade para 500mL. Foi disposto papel absorvente em cada vaso, como suporte para o crescimento da planta e vertidos 300ml de solução nutritiva para crescimento de plantas (NORRIS; DATE, 1976). Seguindo a inoculação com 1mL por planta, foram utilizadas as diluições 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} . Cada tratamento possuía quatro repetições (exemplo; 10^{-3} foi inoculado em quatro plantas e assim sucessivamente). Foi utilizado o DIC como delineamento experimental.

Foram retirados cerca de oito a dez nódulos de cada planta, após o surgimento do terceiro trifólio. Os nódulos coletados foram desinfestados, como descrito por Calazans et al (2010). Após desinfecção, os nódulos foram cuidadosamente macerados em placa de Petri com um bastão de vidro e transferidos, com o auxílio de uma alça de platina, para placas de Petri contendo (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) vermelho congo com pH ajustado entre 6,8 a 7,0 (FREITAS et al, 2007). A incubação foi a 28 °C, até o crescimento das colônias. As colônias crescidas foram repicadas em meio de cultivo Y.M.A, até a purificação e isolamento das mesmas (ver figura 1).

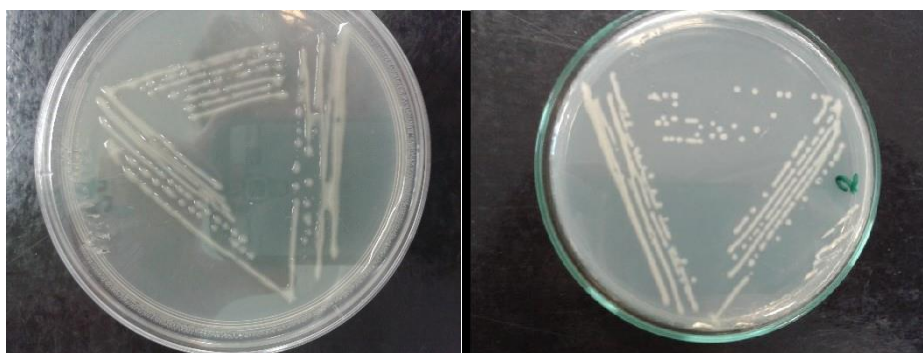


Figura 1- As imagens acima mostram o isolamento de colônias de bactérias, para posterior estocagem.

Após o isolamento e purificação das colônias, iniciou-se o processo de estocagem do material. As colônias foram transferidas com uma alça de platina e crescidas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio líquido Y.M.A com azul de bromotimol a 5%. Cada tubo foi inoculado com um dos isolados purificados e deixados em estufa por 72 horas a 28 °C. Após este período, foi transferido 1mL do meio crescido para os criotubos, e adicionado um ml de glicerol 80% esterilizado em cada um. O estoque foi mantido a temperatura de -20°C. Foram utilizadas três repetições por isolado. É importante salientar que todos os processos realizados em laboratório foram realizados em câmara de fluxo laminar, para não haver contaminação do material.

2.2 AUTENTICAÇÃO DE ISOLADOS FORMADORES DE NÓDULOS

Os isolados estocados foram crescidos em meio líquido e inoculados em sementes de feijão previamente desinfestadas. Estas foram semeadas em tubetes previamente desinfestados contendo vermiculita autoclavada. Estes permaneceram

em casa-de-vegetação da UFSC – Campus Curitibanos, até o surgimento do terceiro trifólio. As plântulas foram irrigadas diariamente com água destilada e esterilizada.

Após o surgimento do terceiro trifólio, os nódulos foram coletados, lavados, contados e estocados em frascos de vidro contendo sílica, em temperatura ambiente.

2.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

Foram avaliados o tempo de crescimento, tamanho de colônia, formato, elevação, bordadura, transparência, tipo de muco, coloração e elasticidade dos isolados estocados em criotubos (MARTINS et al, 1997).

Foi utilizado o *Rizobium tropici* estirpe CIAT 899 como padrão para a caracterização. A estirpe foi cedida pelo laboratório de Microbiologia do Solo MIP/CCB – UFSC Florianópolis.

2.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS

Inicialmente, para os testes de fermentação foram utilizados os meios de cultura de glicose e sacarose (HUNGRIA e ARAÚJO, 1994) (ver imagem 2). Foram depositados 10ml do meio em tubos de vidro contendo um tubo de Durham. Os tubos foram esterilizados e inoculados com três repetições por isolado. Após 72 horas de crescimento bacteriano, foi avaliada a produção de gás nos tubos de Durham e a coloração dos dois meios de cultura.

Os testes para a avaliação da produção de ácido ou bases e tempo de crescimento foram realizados a partir do cultivo em meio Y.M (sólido para tempo de crescimento e líquido para pH) com azul de bromotimol, como descrito por Campos et al., 2010. Cada isolado foi inoculado em tubo contendo o meio e então incubados por 72 horas. Após o período descrito, as amostras foram observadas visualmente. Os rizóbios com potencial acidificante produziram coloração amarelada no meio, os rizóbios com potencial básico, coloração azulada e aqueles que não apresentaram alteração de pH, não alteraram a coloração esverdeada do meio. Quanto ao tempo de crescimento, os isolados que cresceram até 72horas após a inoculação foram considerados de crescimento rápido. Os que cresceram entre quatro e cinco dias foram considerados de crescimento intermediário e aqueles com mais de seis dias, de crescimento lento (BARAÚNA et al, 2014).

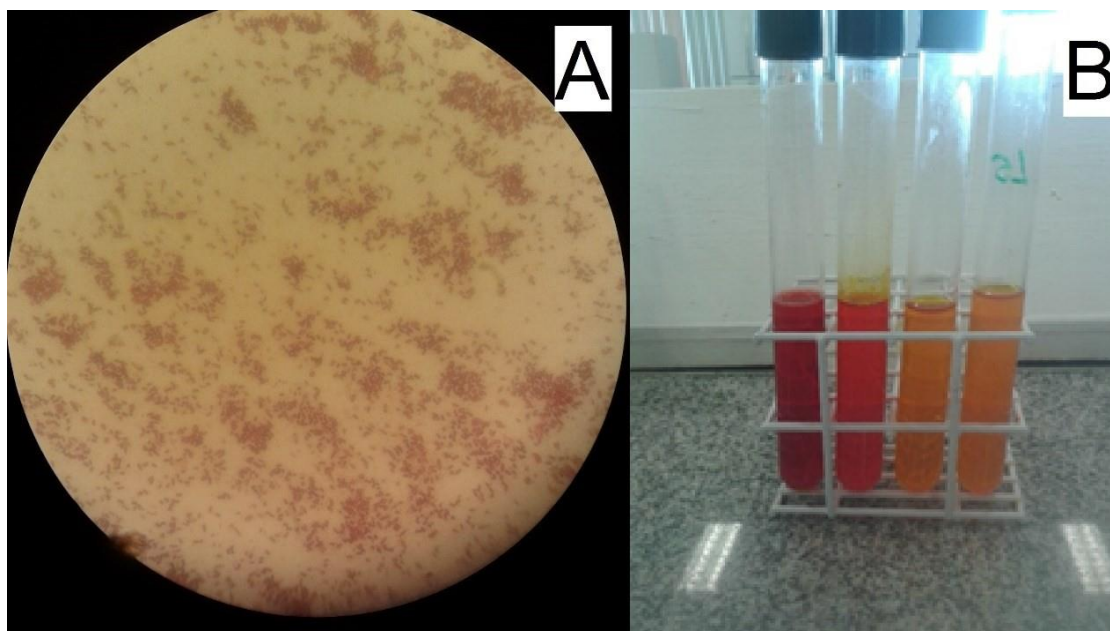


Figura 2- (A) visualização microscópica dos isolados Gram negativos e (B) análise de fermentação em glicose e sacarose para os isolados obtidos.

2.5 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE INDUÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Foram testados dois mecanismos de indução de crescimento dos isolados: a solubilização de Fosfatos e a produção de Ácido Indol Acético (AIA).

Quanto à capacidade de solubilização de fosfatos, foi determinada a solubilização de fosfato de Cálcio de acordo com a metodologia descrita por Junior et al (2010).

Os isolados foram crescidos em meio Y.M líquido com azul de bromotimol (pH 6,8) e incubados durante 72 horas. Após o crescimento, 10 μ L do crescimento de cada isolado foram transferidos com o auxílio de uma pipeta automática para as placas contendo o meio de solubilização. Cada placa foi inoculada em quatro pontos equidistantes, sendo quatro isolados distintos, contendo (ver figura 3). Após o período de incubação, foram realizadas as medições dos diâmetros dos halos de solubilização e do diâmetro das colônias.

Através da fórmula do Índice de Solubilização, $IS = \frac{\text{Ø halo}}{\text{Ø colônia}}$, foram obtidos os resultados equivalentes do tamanho do halo de cada colônia. Os parâmetros a seguir foram usados para determinar a taxa de solubilização de cada isolado: baixa solubilização < 2 média > 2 e < 4 e alta solubilização > 4 (JUNIOR et al., 2010). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. Foi utilizada análise de variância e teste de médias Scott-Knott com 5% significância, utilizando o sistema RStudio.



Figura 3- Halos de solubilização de fosfato de cálcio produzidos pelos isolados selecionados.

Para os testes de produção de Ácido Indolacético (AIA), os isolados foram crescidos em meio de cultura LB líquido (DÖBEREINER, ANDRADE e BALDANI, 1999) por 48 horas a 28 °C. Após o período, 10µL do pré-inóculo foram transferidos para tubos contendo 5mL meio LB com a adição de 100µL/mL de Triptofano (0,005g/mL). Foram usadas quatro repetições por isolado. Os tubos foram mantidos sob a temperatura de 28 °C durante 48 horas.

Para o teste de AIA qualitativo foram utilizados 500µL do meio com crescimento bacteriano e 500µL do reagente de Salkowski (0,5M solução de FeCl₃ em 7,9M de H₂SO₄), esses permaneceram a ausência de luz durante 30 minutos. O desenvolvimento da cor rosa nas amostras indicou produção de AIA (MARCHIORO, 2005).

Para o AIA quantitativo, os isolados que mostraram ser positivos no teste anterior, foram submetidos a espectrofotometria com uma densidade ótica de 540nm.

Foi utilizado como padrão, o AIA nas concentrações de 2 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 500 µg/ml, 800 µg/ml e 1000 µg/ml para a realização da curva padrão.

Antes da leitura do AIA padrão, o espectrofotômetro foi calibrado com uma solução de AIA padrão, reagente de Salkowski (0,5M solução de FeCl₃ em 7,9M de H₂SO₄) e água destilada, nas proporções de 1:1:1.

Para realizar a leitura das amostras positivas ao teste de AIA qualitativo, foram usadas as proporções 2ml de meio com crescimento bacteriano (enriquecido com Triptofano 0,005g/ml) e 2ml de reagente de Salkowski. As amostras foram colocadas nas cubetas e realizada a leitura usando a densidade ótica descrita anteriormente.

2.7 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS EM PLANTA

Cada isolado foi crescido em 50ml de meio azul de bromotimol líquido por um período de 72 horas e inoculados em sementes de feijão por 40 minutos. Foi usado como substrato vermiculita e areia na proporção 2:1. Estas foram colocadas em vasos com capacidade para 3 litros. As sementes inoculadas foram semeadas e deixadas até o surgimento do terceiro trifólio, onde as plantas foram colhidas e realizada a pesagem da parte aérea, raiz e nódulos. O delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições. Utilizou-se o teste de Scott-Knott com 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

As características morfológicas e culturais são os primeiros passos para a identificação de diferentes grupos taxonômicos. Segundo STROSCHEIN (2007), as colônias de rizóbios podem possuir diferentes colorações, variando de incolor, branco, creme a amarelo e ainda possuir ou não mucosidade. O autor ainda cita que colônias com tamanho igual ou menor a 1mm, geralmente possuem menor quantidade muco, quando comparadas as colônias de tamanho superior.

Obteve-se um total de 36 isolados (tabela 1). Os isolados apresentaram a coloração variando de branco a amarelo e a transparência de brilhante a opaca. A elasticidade variou de 1 a 3, sendo considerado 1, os isolados que não apresentaram elasticidade, 2, aqueles com média elasticidade e 3, os isolados com muita elasticidade ou muco. Pode-se observar com estes parâmetros que todos apresentam características morfológicas semelhantes ao padrão CIAT 899. A confirmação só será dada após a caracterização genética.

Tabela 01- Caracterização morfológica dos isolados obtidos.

Nº isolado	Coloração	Aparência	Elasticidade	Diâmetro	Borda	Elevação	Transparência
CIAT 899	Creme	Circular	3	2mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ01	Creme	Circular	3	2mm	Lisa	Convexa	Brilhante mas não translúcida
CBSRZ02	Creme amarelado	Circular	2	1mm	Lisa	Convexa	Translúcida
CBSRZ03	Creme esverdeado	Circular	1	1mm	Lisa	Convexa	Translúcida
CBSRZ04	Branca	Circular com margem ondulada	1	5mm	Irregular	Plana	Opaca
CBSRZ05	Branca	Circular com margem ondulada	3	4mm	Irregular	Plana	Opaca
CBSRZ06	Roseada	Circular	3	1mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ07	Creme	Circular espalhada	2	5mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ08	Creme	Espalhada	2	2mm	Lisa	Convexa	Translúcida
CBSRZ09	Creme	Circular	3	2,5mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ10	Creme	Circular espalhada	1	4mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ11	Amarela	Circular	3	1mm	Lisa	Plana	Brilhante
CBSRZ12	Creme	Circular	2	4mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ13	Creme	Circular	1	2mm	Lisa	Plana	Brilhante
CBSRZ14	Creme	Circular	2	1.5mm	Lisa	Plana	Pouco brilho
CBSRZ15	Creme	Circular	2	2.5mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ16	Branca	Circular	3	3mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ17	Branca	Espalhada	3	2mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ18	Amarela	Circular	1	2mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ19	Branca	Espalhada	3	3mm	Lisa	Convexa	Translúcida

Continuação

CBSRZ20	Creme	Circular	1	1mm	Lisa	Convexa	Translúcida
CBSRZ21	Creme	Circular	1	1mm	Lisa	Convexa	Translúcida
CBSRZ22	Amarela	Circular	1	1.5mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ23	Creme	Circular	1	1mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ24	Creme	Circular	2	2mm	Lisa	Convexa	Translúcida
CBSRZ25	Branca	Circular	1	1,5mm	Lisa	Gota	Brilhante
CBSRZ26	Creme	Circular	2	2mm	Lisa	Crateriforme	Brilhante
CBSRZ27	Creme	Circular	2	0.1mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ28	Amarela	Circular	2	1mm	Ondulada	Plana	Brilhante
CBSRZ29	Creme	Irregular	1	1mm	Ondulada	Plana	Brilhante
CBSRZ30	Creme	Circular	1	3mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ31	Creme	Circular	2	2mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ32	Branca	Circular	2	4mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ33	Creme	Circular	1	2mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ34	Amarela	Circular	1	1mm	Lisa	Convexa	Brilhante
CBSRZ35	Creme	Filiforme	1	1mm	Ciliado	Convexa	Translúcida
CBSRZ36	Amarela	Circular	2	1mm	Irregular	Convexa	Translúcida

3.2 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

Metade dos isolados ocasionaram acidificação do meio de cultura, mostrando assim, que 50% dos isolados assemelharam-se ao pH ácido do rizóbio padrão CIAT 899.

Segundo PINHEIRO et al. (2014), o tempo de crescimento de bactérias que nodulam leguminosas é de três dias para crescimento rápido e acima de seis dias para crescimento lento. Com isso, é possível afirmar que todos os isolados selecionados têm características semelhantes a estirpe padrão CIAT 899, pois apresentaram tempo de crescimento rápido.

O teste de Gram é um método simples, o qual usa os corantes cristal violeta e safranina para determinar diferenças nas estruturas da parede celular de bactérias, basicamente a espessura de peptidoglicano que compõe a parede celular. Os rizóbios são Gram-negativas e absorvem o corante cristal violeta (HUNGRIA & ARAÚJO, 1994). No teste de Gram realizado, todos os isolados apontaram ser Gram-negativos, assim como o padrão usado CIAT 899.

As bactérias do gênero *Rhizobium* são capazes de utilizar vários produtos como fontes de carbono para a produção de biopolímeros, e entre todos, os de mais fácil obtenção são a glicose e a sacarose. Vinte e sete isolados fermentaram glicose e a sacarose, assim como o CIAT 899, cerca de 75% do total de bactérias isoladas. A capacidade de fermentar fontes de carbono são características comumente observadas em rizóbios (BARRETO, 2008).

Tabela 2- Tempo de crescimento, reação de pH, teste de Gram e fermentação em glicose e sacarose dos Isolados.

Nº isolado	Tempo crescimento.	pH	Gram	Sacarose	Glicose
CIAT 899	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ01	Rápido	Base	Negativo	(+)	(-)
CBSRZ02	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ03	Rápido	Base	Negativo	(-)	(-)
CBSRZ04	Rápido	Ácido	Negativo	(-)	(-)
CBSRZ05	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ06	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ07	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ08	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ09	Rápido	Base	Negativo	(-)	(+)
CBSRZ10	Rápido	Ácido	Negativo	(-)	(-)

CBSRZ11	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ12	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ13	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ14	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ15	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ16	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ17	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ18	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ19	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ20	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ21	Rápido	Ácido	Negativo	(-)	(+)
CBSRZ22	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ23	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ24	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ25	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ26	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ27	Rápido	Base	Negativo	(-)	(-)
CBSRZ28	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ29	Rápido	Ácido	Negativo	(-)	(-)
CBSRZ30	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ31	Rápido	Ácido	Negativo	(-)	(-)
CBSRZ32	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ33	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ34	Rápido	Ácido	Negativo	(+)	(+)
CBSRZ35	Rápido	Base	Negativo	(-)	(-)
CBSRZ36	Rápido	Base	Negativo	(+)	(+)

3.3 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE INDUÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

3.3.1 Solubilização de fosfatos

O fósforo é um dos três macronutrientes mais importantes para uma planta, e a sua falta resulta imediatamente na limitação do crescimento e, conseqüentemente, queda na produção (JUNIOR et al, 2010).

O (P) possui difusão lenta no solo, o que o torna menos disponível para as plantas. Esta retenção ocorre devido a precipitação e adsorção deste nutriente nas camadas de solo, transformando o “P” disponibilizado nas adubações, em fosfato inorgânico insolúvel. Esta alteração torna o nutriente menos disponível a planta e diminui a eficácia do adubo. As bactérias capazes de solubilizar fosfato inorgânico ajudam a aumentar a disponibilidade de fosforo na solução de solo e, conseqüentemente para a planta (MARRA, 2012).

Vinte e três isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio, cerca de 64% do total. A partir dos dados obtidos, pode-se afirmar que a maior taxa de crescimento do halo de solubilização, foi observada até o sexto dia, e que os isolados que tiveram maior crescimento, inclusive sobre o padrão CIAT 899, foram o CBSRZ10 e o CBSRZ29. Além disso, todos os vinte e três isolados apresentaram início da solubilização precoce (até três dias). Com estes dados, pode-se indicar que estes dois isolados (CBSRZ10 e CBSRZ29) têm alta capacidade para solubilizar fosfatos inorgânicos, favorecendo o crescimento da planta e diminuindo a aplicação de fertilizantes fosfatados, devido ao melhor aproveitamento.

Tabela 3 - Capacidade de solubilização de fosfato de Cálcio.

Nº Isolado	1ª mediação (3 dias)	2ª mediação (6 dias)	3ª mediação (9 dias)
	Ø halo/ Ø colônia (mm)	Ø halo/ Ø colônia (mm)	Ø halo/ Ø colônia (mm)
CIAT 899	1,5	1,4	1,3
CIAT 899	2,1	1,8	1,8
CIAT 899	1,7	1,7	1,4
CBSRZ01	1,5	1,3	1,2
CBSRZ01	1,5	1,4	1,8
CBSRZ01	2,3	2,0	1,8
CBSRZ02	1,5	1,3	1,2
CBSRZ02	1,4	1,4	1,4
CBSRZ02	2,0	1,8	1,8
CBSRZ03	1,5	1,8	1,6
CBSRZ03	1,5	1,6	1,4
CBSRZ03	1,5	1,6	1,4
CBSRZ06	1,3	1,5	1,4
CBSRZ06	1,4	1,3	1,3
CBSRZ06	1,3	1,5	1,3
CBSRZ07	2,1	2,0	2,0
CBSRZ07	1,5	1,2	1,2
CBSRZ07	1,8	1,8	1,8
CBSRZ08	2,0	2,0	1,8
CBSRZ08	2,3	1,6	1,4
CBSRZ08	2,0	1,5	1,7
CBSRZ10	2,0	3,0	1,6
CBSRZ10	1,7	1,6	1,4
CBSRZ10	1,7	1,5	1,7
CBSRZ11	1,6	1,5	1,5
CBSRZ11	2,0	1,8	1,6
CBSRZ11	1,6	1,5	1,5
CBSRZ12	1,5	1,3	1,2

CBSRZ12	1,5	1,5	1,5
CBSRZ12	2,3	1,8	1,4
CBSRZ13	1,5	1,3	1,2
CBSRZ13	1,5	1,2	1,2
CBSRZ13	1,4	1,6	1,6
CBSRZ14	1,7	1,2	1,2
CBSRZ14	1,5	1,2	1,2
CBSRZ14	2,0	2,5	1,8
CBSRZ15	2,0	2,0	2,2
CBSRZ15	2,3	2,0	2,2
CBSRZ15	2,3	1,8	2,2
CBSRZ18	1,3	1,2	1,4
CBSRZ18	1,2	1,1	1,1
CBSRZ18	1,2	1,2	1,4
CBSRZ21	1,5	1,2	1,3
CBSRZ21	1,5	1,2	1,2
CBSRZ21	1,5	1,1	1,1
CBSRZ24	1,3	1,2	1,5
CBSRZ24	2,0	1,3	1,2
CBSRZ24	1,6	1,2	1,2
CBSRZ25	1,6	1,3	1,2
CBSRZ25	1,6	1,3	1,5
CBSRZ25	1,6	1,3	1,2
CBSRZ28	1,4	1,5	1,5
CBSRZ28	2,0	1,6	1,5
CBSRZ28	1,7	1,8	1,8
CBSRZ29	1,6	1,4	1,5
CBSRZ29	1,6	2,0	1,4
CBSRZ29	1,6	1,3	1,8
CBSRZ30	1,7	1,3	1,3
CBSRZ30	1,5	1,3	1,4
CBSRZ30	1,5	1,2	1,4
CBSRZ31	1,7	1,3	1,3
CBSRZ31	2,0	1,4	1,5
CBSRZ31	2,0	2,2	2,2
CBSRZ32	1,6	1,3	1,5
CBSRZ32	1,5	1,2	1,6
CBSRZ32	1,5	1,3	1,3
CBSRZ33	1,4	1,2	1,2
CBSRZ33	1,5	1,2	1,4
CBSRZ33	1,5	1,2	1,5

Observação: Os isolados CBSRZ04, CBSRZ05, CBSRZ09, CBSRZ16, CBSRZ17, CBSRZ19, CBSRZ20, CBSRZ22, CBSRZ23, CBSRZ26, CBSRZ27, CBSRZ34, CBSRZ35 e CBSRZ36 não estão dispostos na tabela acima, pois não solubilizaram o fosfato de cálcio.

3.3.2 Produção de AIA

Dezoito isolados da coleção (50% dos isolados) produziram Ácido Indolacético qualitativa e quantitativamente, indicando o poder de induzir ou regular o crescimento de plantas. O Ácido Indolacético é um hormônio que regula o crescimento e enraizamento vegetal, ou seja, promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (MARCHIORO, 2005). Este crescimento radicular influencia diretamente na quantidade de nódulos e de N atmosférico fixado pela planta. Algumas bactérias diazotróficas que habitam a rizosfera são capazes de produzir esse hormônio, influenciando diretamente o crescimento e, conseqüentemente, na produtividade (KARNWAL, 2009).

Dos dezoitos isolados que apresentaram produção de AIA, cinco produziram de 800 a 1000µg de AIA/ml e os demais com produção variando de 800µg a 80 µg de AIA/ml. Isto indica que os isolados CBSRZ29, CBSRZ30, CBSRZ31, CBSRZ32 e CBSRZ33 foram os que mais produziram AIA, assemelhando-se ao *Rhizobium* padrão CIAT 899.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey com 5%, significância, utilizando o programa RStudio.

Tabela 4 – Análise de produção de AIA qualitativo.

Teste qualitativo de AIA	
Isolado	Reação
CIAT 899	Rosa
CBSRZ01	Rosa
CBSRZ02	Laranja
CBSRZ03	Laranja
CBSRZ04	Laranja
CBSRZ05	Laranja
CBSRZ06	Laranja
CBSRZ07	Rosa
CBSRZ08	Rosa
CBSRZ09	Laranja
CBSRZ10	Laranja
CBSRZ11	Laranja
CBSRZ12	Rosa
CBSRZ13	Rosa
CBSRZ14	Rosa
CBSRZ15	Rosa
CBSRZ16	Laranja
CBSRZ17	Laranja

Continuação...

CBSRZ18	Rosa
CBSRZ19	Laranja
CBSRZ20	Rosa
CBSRZ21	Rosa
CBSRZ22	Laranja
CBSRZ23	Laranja
CBSRZ24	Rosa
CBSRZ25	Laranja
CBSRZ26	Laranja
CBSRZ27	Laranja
CBSRZ28	Rosa
CBSRZ29	Rosa
CBSRZ30	Rosa
CBSRZ31	Rosa
CBSRZ32	Rosa
CBSRZ33	Rosa
CBSRZ34	Laranja
CBSRZ35	Laranja
CBSRZ36	Laranja

Tabela 5- Teste de Tukey referente a análise de AIA quantitativo. Os dados que apresentaram a letra “a” mostraram maior produção de AIA. As médias foram obtidas a partir da transmitância, por isso os isolados com maior produção de AIA possuem menor média.

Grupos	Tratamentos	Medias
a	CIAT 899	0.3
a	CBSRZ33	0.3
a	CBSRZ32	0.3
a	CBSRZ31	0.3
a	CBSRZ29	0.3
ab	CBSRZ30	0.4
ab	CBSRZ15	0.5
ab	CBSRZ14	0.5
abc	CBSRZ28	0.6
abc	CBSRZ21	0.6
abc	CBSRZ13	0.6
bc	CBSRZ24	0.7
cd	CBSRZ07	0.9
cd	CBSRZ01	0.9
de	CBSRZ12	1.1
e	CBSRZ08	1.4
f	CBSRZ18	2.9
f	CBSRZ20	3.1

3.4 AVALIAÇÃO DOS ISOLADOS EM PLANTA

Constatou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao peso de nódulos. Sete isolados se destacaram quando comparados a estirpe padrão CIAT 899. Esses foram CBSRZ13, CBSRZ15, CBSRZ16, CBSRZ33, CBSRZ03, CBSRZ14 e CBSRZ28. Para peso de raiz e de parte aérea, não se observou diferença significativa.

Os resultados abaixo mostraram que apenas o peso úmido de nódulos e de raiz mostrou diferença. O peso úmido da parte aérea e o peso seco para as três amostras, se mostraram não significativos. Nenhum teste foi significativo para o teste de Tukey.

Tabela 06- Testes de médias obtidos a partir de Scott-Knott a 5% de significância.

Isolado	Médias de nódulos		Médias da raiz	
CBSRZ13	0.49375	a	2.67775	a
CBSRZ15	0.47075	a	2.56925	a
CBSRZ16	0.39600	a	2.21075	a
CBSRZ33	0.36300	a	1.33450	b
CBSRZ03	0.34375	a	2.48875	a
CBSRZ14	0.31825	a	3.20425	a
CBSRZ28	0.28750	a	2.14950	a

4 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos em testes morfológicos e bioquímicos, pode-se notar que os isolados CBSRZ13 e CBSRZ30 apresentaram características semelhantes ao padrão CIAT 899 e mostraram resultados positivos em todas as análises descritas acima (solubilização de fosfato, produção de AIA, pH acidificante, fermentação em glicose e sacarose, Gram- negativas e nodulíferas).

O isolado CBSRZ15 exibiu todos os requisitos citados acima, menos o desenvolvimento de solubilização de fosfato.

Alguns outros isolados apresentaram ótimo desempenho nas provas bioquímicas, mas no teste de nodulação não passaram, estes são CBSRZ29, CBSRZ31, CBSRZ32 e CBSRZ33.

Apesar dos resultados acima indicarem possíveis Rizóbios, a comprovação só será dada após a caracterização genética dos isolados.

ABSTRACT

The use of nitrogen-fixing bacteria in bean crops is little applied by producers of the Curitiba mesoregion due to factors such as lack of knowledge and incentive. The inoculants present in the market do not present significant efficiency in the bean cultivation of the region, suggesting that the marked edaphoclimatic conditions interfere in the symbiotic process. This can be a determining factor for low inoculation efficiency and low demand for farmers. In this context, the objective of this study was to isolate and select rhizobia from virgin soils of Planalto Catarinense, mesoregion of Curitiba, to test the viability of these in bean cultivation and its efficiency in the biological fixation of nitrogen. The work was carried out in the laboratory of Microbiology of the Federal University of Santa Catarina, Curitiba Center. The virgin soil was collected in the locality of Horizolândia, Curitiba and was submitted to serial dilution and inoculated in bean seeds, previously disinfested and sown in pots containing sterilized substrate, where the plants remained until the nodules appeared. These were disinfested, macerated and the slurry suspension on plates containing red congo YMA (Yeast Manitol Agar) medium. The colonies obtained were isolated, purified and stored in cryotubes at -50 ° C. Each isolate was phenotypically characterized (border type, elasticity, staining, growth, pH change and fermentation) and tested for phosphate solubilization capacity. A total of 36 isolates were obtained. All isolates were Gram-negative and fast-growing (less than 72 hours). Half of them had acid pH and the other half had a basic reaction. As for the fermentation, twenty-seven isolates fermented both glucose and sucrose. Twenty-three were able to solubilize calcium phosphate and eighteen presented EIA production. In the plant analysis, it was verified that there was a significant difference between the treatments in relation to the weight of nodules. Seven isolates stood out when compared to the standard strain. These were CBSRZ13, CBSRZ15, CBSRZ16, CBSRZ33, CBSRZ03, CBSRZ14 and CBSRZ28. For root and shoot weight, no significant difference was observed. With the results obtained it can be stated that at least 50% of the isolates are similar to the standard strain CIAT 899 and that the isolates CBSRZ13, CBSRZ30 and CBSRZ15 showed great potential for Rizobacteria.

Key words: Insulation, Rizobacteria, Biological fixation of Nitrogen

REFERÊNCIAS

AIDAR, H (Ed.). **Cultivo do Feijoeiro Comum: Características da Cultura**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivodofeijoeiro/>: Acesso em: 13.jun.2015.

ALMEIDA, M.L. de, SANGOI, L. Manejo de cultivares de feijão de diferentes hábitos de crescimento no planalto catarinense. I Rendimento de grãos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 513-517. 1994.

ARAÚJO A.S.F., et al. 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**, Santa Maria, 2009.

ARAÚJO, F.F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *bacillus subtilis* e *bradyrhizobium japonicum* / *bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1633-1643, 1999.

BARAÚNA et al. Rizóbios Associados às Raízes de Pau-Rainha (*Centrolobium paraense* TUL.) em Solos de Roraima. Embrapa: Roraima, Boa Vista, RR, 2014.

BARRETO M. C. S. **Inovação tecnológica baseada na produção de biopolímero com viabilidade para inoculante rizobiano**. Recife, 2008.

BURRIS, R.H. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. **Plant Physiol.**, v.53, p.443-449, 1974.

CALAZANS, Giovanna M.; et al. **Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio da *Cratylia argentea***. Sete Lagoas - Mg: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/865836/1/04_36.pdf>. Acesso em: 30. set. 2015.

CAMPOS L.L., et al. Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.* **Scientia Agraria Paranaensis**. Volume 9, número 3 - 2010, p 75-84.

Comissão de Química e Fertilidade do Solo - RS/SC. Manual de adubação e de calagem. Porto Alegre, 2004.

Conab. Perspectivas para a agropecuária, Volume 3 – Safra 2015/2016
COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: V.1-safra 2013/2014. 5. ed. Brasília: Conab, 2013. 1-72 p.

DÖBEREINER, J., ANDRADE, V.O., BALDANI, V.L.D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Embrapa: Seropédica, RJ. 1999.

Embrapa. Solos do estado de Santa Catarina. Dez, 2004.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H.J. ed. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman & Hall, 1992. p. 1-42

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, ago. 2003.

FREITAS, Ana Dolores Santiago; VIEIRA, Carolina Lucena; SANTOS, Carolina Etiene de Rosália e Silva; STAMFORD, Newton Pereira; LYRA, Maria do Carmo Catanho Pereira. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantina*, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. Londrina: Embrapa Soja, 2001.

HUNGRIA, M; ARAUJO, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília, DF: **Embrapa**, 1994. 542 p.

HUNGRIA, Mariangela; CHUEIRE, Ligia Maria O; MENNA, Pâmela; BANGEL, Eliane Villamil. Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR. **Embrapa**. Dez. 2008, Londrina-PR, p-12.

IX REUNIÃO DA ORDINÁRIA DA COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO (CTCBF), 2010, Florianópolis. **Epagri**. Gerência de Marketing e Comunicação (GMC), 2012. 157 p. Disponível em: <http://www.epagri.sc.gov.br/wp-content/uploads/2013/10/informacoes_tecnicas_cultivo_feijao.pdf>. Acesso em: 30.jun 2015.

JUNIOR, C. F. A. et al. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

KARNWAL A. Production of Indole Acetic Acid by Fluorescent Pseudomonas in the Presence of L-Tryptophan and Rice Root Exudates. Bhojia Institute of Life Sciences, India. *Journal of Plant Pathology*, 2009.

LEONCIO M. **Isolamento e caracterização de rizobactérias do alho (*Allium sativum*) e promoção de crescimento do milho (*Zea mays*)**. Curitiba, 2015.

MARCHIORO L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por Bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba, 2005. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/1953/Disserta%E7%E3o%20Mestrado%20Lui%20Eduardo%20Tedesco%20Marchioro.pdf;jsessionid=86F7C229B369BBF60B6BB6F9E333CD25?sequence=1>. Acesso em: 02 jun. 2017.

MARRA, L. Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas. Lavras, 2012.

MARTINS N.M., et al. Eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos de Mato Grosso do Sul, inoculados em guandu. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/68495/1/053-Eficiencia-simbiotica-de-isolados-de-rizobios-nativos.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2017.

MARTINS, L.M.V et al. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio para caupi: uma estratégia para melhorar a produção de grãos na região semi-árida do Brasil. **Biologia e Fertilidade**. Solos, 1997.

MICHELS, A. F. **Qualidade fisiológica de sementes de feijão crioulo produzidas no oeste e planalto catarinense associada ao potencial agrônomo**. 2011. 80 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Udesc, Lages, Sc, 2012.

NORRIS, D.O. & DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H., BRYAN, W.W. (Eds.) **Tropical pasture research - principles and methods**. Brisbane: CAB. 1976. p.134-173.

OLIVEIRA, Dâmiany Pádua. Adubação nitrogenada, inoculação com estirpes de rizóbio e tratamentos fungicidas de sementes em feijoeiro-comum cv. BRSMG Madrepérola. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras - Mg, 2013.

OLIVEIRA, R. C.; SBARDELOTTO, J. M. Nodulação em diferentes variedades de feijão inoculadas com *Rhizobium tropici*. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 4, p. 46-52, 2011.

PINHEIRO M.S. **Isolamento e seleção de estirpes de rizóbios nativas do semiárido tolerantes a estresses ambientais**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p. 2071, 2014.

ROBERTO.pdf. Acesso em: 24 mai. 2017.

SCHLINDWEIN, Gilson. et al. **Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface**. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, 2008.

SCHUH, Carlos Alberto. **BIOPOLÍMEROS COMO SUPORTE PARA INOCULANTES**. 2005. 81 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-rs, 2005.

SOARES, André Luis de Lima et al. **Eficiência agrônoma de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – feijoeiro**. **Revista brasileira de ciência do solo**. Viçosa, v. 30, n. 5, out. 2006.

STRALIOTTO, R; TEIXEIRA, M. G; MERCANTE, F. M. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Embrapa. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm>>. Acesso em: 30 jun. 2015.

STROSCHEIN, M. R.D. **Caracterização de Bactéria Fixadora de Nitrogênio em *Lupinus albus***. Santa Maria, 2007. Disponível em: <http://w3.ufsm.br/ppgcs/images/Dissertacoes/MARCOS->

TORDIN C. Seminário mostra a importância do *Bacillus subtilis*. Cultivar, 2010. Disponível em: <http://www.grupocultivar.com.br/noticias/seminario-mostra-a-importancia-do-bacillus-subtilis>. Acesso em: 02 jun. 2017.

WILSON, P. W. **The Biochemistry symbiotic fixation**. Madison: The University of Wisconsin Press, 1940.

WOLLUM, A.G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Ed.). **Methods of soil analysis**. Madison: Soil Science Society of America, 1982. p - 781-802.

