

**PROCESSOS PROMOTORES DE
CRESCIMENTO VEGETAL POR BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE OU
SIMBIÓTICAS DE FEIJÃO COMUM, CAUPI
E SIRATRO**

SILVIA MARIA DE OLIVEIRA

2009

SILVIA MARIA DE OLIVEIRA

**PROCESSOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL POR
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE OU SIMBIÓTICAS
DE FEIJÃO COMUM, CAUPI E SIRATRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora
Profa. Dra. Fátima M. S. Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Oliveira, Silvia Maria de.

Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro / Silvia Maria de Oliveira. – Lavras : UFLA, 2009.

66 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. FBN. 2. Solubilização de fosfato. 3. Hormônios de crescimento vegetal. 4. Resistência a antibióticos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 579.163

– 631.52

**PROCESSOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO VEGETAL POR
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE VIDA LIVRE OU SIMBIÓTICAS
DE FEIJÃO COMUM, CAUPI E SIRATRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. Messias José Bastos de Andrade

UFLA

Prof. Dr. Romildo da Silva

UFLA

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Unilavras

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

*“O grande desafio humano é resistir à sedução do repouso,
pois nascemos para caminhar e nunca para nos satisfazer com as
coisas como estão.*

*A insatisfação é um elemento indispensável para quem, mais
do que repetir, deseja criar, inovar, refazer, modificar,
aperfeiçoar.”*

(Mário Sérgio Cortella)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser minha fonte inesgotável;

À professora Fátima M. S. Moreira pela orientação, incentivo e, principalmente, pela oportunidade e confiança depositada na realização do trabalho;

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia agrícola, professores, colegas e técnicos.

A CAPES, pelo auxílio financeiro e por proporcionar um ensino de Pós-graduação de qualidade.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Messias José Bastos de Andrade, Dr. Romildo da Silva e Dr. Disney Ribeiro Dias, e ao professor Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares pelas sugestões.

A Marlene e ao Manuel pela amizade, incentivo e apoio sempre prestados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo: Ana Paula, Bruno, Éderson, Jaqueline, Jessé, Karina, Márcia, Maryeimy, Mauricio, Michele Aparecida, Michele Rocha, Paula, Paulo, Pedro, Plínio, Rogério, Teotônio e, em especial a Amanda, Candido, Cleide, Ligiane, Maíra, Leandro e Jerusa, cada um por seu toque especial em minha vida.

A Gláucia e Krisle pela amizade, pela paciência e pelo companheirismo desenvolvido durante o período de república.

Às Pesquisadoras Rosângela Stralotto, Rosa Maria Pitard e Liamara Perin pela iniciação em Microbiologia do Solo e pela grande amizade.

Aos meus pais, Raimundo Nonato de Oliveira e Maria da Silva Oliveira pelo amor e apoio dado durante toda minha vida, principalmente na vida acadêmica. Sem este apoio, certamente não teria chegado onde estou. Aos meus irmãos Eliana, Ângela, Zé Raimundo, Isabel, Luiz e Sérgio, e em especial a João Ricardo, que se tornou símbolo de incentivo para meus estudos;

A todos vocês, obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
RESUMO GERAL	ii
GENERAL ABSTRACT	iii
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	2
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Fixação biológica do nitrogênio (FBN)	4
2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)	6
2.3 Produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (SRCP) ou hormônios de crescimento vegetal	8
2.4 Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio.....	11
2.5 Produção de compostos antifúngicos	13
2.6 Microrganismo e degradação de poluentes.....	14
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 2 - Promoção de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro	26
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Estirpes estudadas	31
2.2 Atividade antifúngica	34
2.3 Fixação do nitrogênio em vida livre	34
2.4 Solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e de alumínio (P-Al)	35
2.5 Produção de substâncias reguladoras de crescimento - auxina e etileno	36

2.6 Crescimento em meio contendo diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono	37
2.7 Resistência bacteriana aos antibióticos.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1 Atividade antifúngica	39
3.2 Fixação do nitrogênio em vida livre.....	39
3.3 Solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e de alumínio (P-Al)	40
3.4 Produção de substâncias reguladoras de crescimento - auxina e etileno	44
3.5 Utilização de fenol como única fonte de carbono	48
3.6 Resistência bacteriana aos antibióticos.....	49
3.7 Relações entre os diferentes processos promotores de crescimento vegetal.	52
4 CONCLUSÕES	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Estirpes bacterianas selecionadas de experimentos realizados com feijão comum.....	32
TABELA 2	Estirpes bacterianas selecionadas de experimentos realizados com feijão caupi.....	33
TABELA 3	Formação de películas por estirpes de bactérias sobre a superfície do meio LO na presença de lactato e manitol como fonte de carbono.....	40
TABELA 4	Início e índice da solubilização de fosfato de cálcio das estirpes crescidas em meio GES com glicose.....	41
TABELA 5	Início e índice da solubilização de fosfato de Alumínio das estirpes crescidas em meio Ges com glicose.....	42
TABELA 6	Início e índice da solubilização de fosfato de cálcio das estirpes crescidas em meio GES onde a glicose foi substituída por manitol.....	43
TABELA 7	Produção de auxina (AIA) pelas estirpes em meio Digs na ausência de L-triptofano.....	45
TABELA 8	Produção de auxina (AIA) pelas estirpes crescidas em meio Digs na presença de L-triptofano (100mg L ⁻¹).....	45
TABELA 9	Produção de etileno e capacidade de crescimento em meio contendo diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono.....	48
TABELA 10	Resultados do teste de resistência antimicrobianos por disco-difusão.....	50
TABELA 11	Síntese dos processos promotores de crescimento vegetal e características adaptativas das estirpes altamente eficientes na FBN em feijão comum.....	53
TABELA 12	Síntese dos processos promotores de crescimento vegetal e características adaptativas das estirpes altamente eficientes na FBN em caupi.....	53
ANEXO TABELA 1	Síntese das principais características das estirpes selecionadas de experimentos realizados com feijão comum.....	65
ANEXO TABELA 2	Síntese das principais características das estirpes selecionadas de experimentos realizados com feijão caupi.....	66

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Silvia Maria de. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro.** 2009. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, MG¹

O solo é um ambiente complexo, heterogêneo e dinâmico que abriga diversos processos importantes mediados por microrganismos que podem contribuir para a promoção do crescimento vegetal. Esses processos são realizados pelas bactérias denominadas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV), as quais se caracterizam por viver no ambiente rizosférico interferindo no crescimento vegetal. Entre os processos realizados pelas RPCV existem aquelas que atuam diretamente na promoção do crescimento vegetal, pela produção de compostos ou por facilitarem a absorção de certos nutrientes, como a fixação biológica de nitrogênio atmosférico e a solubilização de fosfato inorgânico, e pela produção de hormônios de crescimento vegetal, entre outros. A fixação biológica de nitrogênio é o processo de promoção de crescimento vegetal mais bem estudado nas bactérias associativas e endofíticas, já sendo bastante conhecida a contribuição de bactérias nodulíferas para a nutrição de leguminosas. Através da liberação de ácidos orgânicos e de outros mecanismos bactérias atuam na solubilização de fosfato inorgânico liberando o fósforo tanto para a planta quanto para si mesmo. Os hormônios de crescimento vegetal são reguladores naturais que influenciam os processos fisiológicos em baixas concentrações, controlando o crescimento da planta. As bactérias também podem contribuir de forma indireta para o crescimento vegetal, diminuindo ou prevenindo os efeitos deletérios de microrganismo fitopatogênicos. A capacidade das bactérias em realizar tais processos biológicos na rizosfera poderá contribuir para o incremento no efeito de inoculantes, com maiores benefícios para os agricultores, diminuindo a utilização de fertilizantes industriais e promovendo o aumento da produção agrícola com custos reduzidos. Além disso, há possibilidade de uso dessas bactérias em culturas leguminosas e não leguminosas.

¹ Orientadora: Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Silvia Maria de. **Plant growth promoting processes mediated by diazotrophic bacteria free-living or symbiotic with common, siratro or cowpea.** 2009. 66p. Dissertation – (Master program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil²

Soil environment is complex, heterogeneous and dynamic. It harbors several processes mediated by microorganisms which can contribute to enhance plant growth. These processes are mediated by bacteria named plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) which live in the rhizosphere. Among processes mediated by PGPR, some act directly on plant growth promotion, by producing specific compounds or enhancing nutrient absorption by roots, like nitrogen fixation, phosphate solubilization or growth hormones. Biological nitrogen fixation is the plant growth promoting process most studied among associative and endophytic bacteria. It is well known the significant contribution of nodulating bacteria for Leguminosae nutrition. By excreting organic acids as well as by other mechanisms bacteria solubilize inorganic phosphate liberating phosphorus for the plant and other organisms. Plant growth promoting hormones are natural regulators that, in low concentrations, can influence physiological processes, hence controlling plant growth. Bacteria can also contribute indirectly for plant growth, decreasing or preventing deleterious effects of phytopathogenic microorganisms. The ability of bacteria to mediate these processes in the rhizosphere can contribute for increasing the effect of inoculants with greater benefits for farmers, decreasing the amount of chemical fertilizers applied and promoting yields increase with low costs. Furthermore, there is the possibility of using these bacteria both in legume and non legumes.

² Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

Numerosos estudos objetivando a seleção de estirpes, visando à maximização da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.), têm revelado grande diversidade de estirpes capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-lo à planta, nutrindo-a adequadamente, possibilitando, assim, que essa biotecnologia de baixíssimo custo possa ser levada principalmente aos pequenos agricultores, que cultivam essas leguminosas para sua subsistência.

Bactérias que fixam nitrogênio e nodulam leguminosas (BFNNL) são organismos que se caracterizam pela associação íntima com a planta hospedeira, despertando grande interesse agrônomo. Possuem características de sobrevivência fora do ambiente simbiótico e, assim como bactérias que não infectam a planta e vivem no ambiente rizosférico, podem contribuir para a nutrição vegetal como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) (Moreira & Siqueira, 2006).

“Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas” (PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) são bactérias que vivem na rizosfera e são capazes de interferir na nutrição das plantas, promover controle biológico de fitopatógenos e produzir substâncias promotoras de crescimento vegetal por meio de vários processos (Kloepper & Schroth, 1978).

Além da capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, é de interesse agrônomo identificar, entre essas bactérias que nodulam, outros processos importantes que possam promover, por ação direta ou indireta, o crescimento vegetal. Entre esses processos podem-se destacar: solubilização de fosfatos inorgânicos, disponibilizando o fósforo para a planta e para si mesmo (Chabot et al., 1998); produção de hormônio de crescimento vegetal, que faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais, podendo

ser considerados agentes causais da alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (Bashan & Holguim, 1997), como auxina, citocinina e etileno; antagonismo a fitopatógenos devido à produção de enzimas, antibióticos e ácidos cianídricos; produção de sideróforos e degradação de compostos poluentes, o que poderá despertar grande interesse da pesquisa para futuras aplicações em áreas contaminadas. Portanto, bactérias fixadoras de nitrogênio que realizam outro (s) processo(s) podem contribuir mais efetivamente para o crescimento vegetal de leguminosas, assim como de não leguminosas.

Neste sentido, a capacidade destas bactérias em realizar tais processos biológicos na rizosfera poderá contribuir para o incremento no efeito de inoculantes, com maiores benefícios para os agricultores, diminuindo a utilização de fertilizantes industriais e promovendo o aumento da produção agrícola com redução de custos. Além disso, há possibilidade de se expandir o uso dessas bactérias em outras culturas além das leguminosas.

Considerando-se essas informações, os objetivos desse trabalho foram verificar a existência e potencialidade em estirpes bacterianas, sendo a maioria simbiótica de feijão caupi e feijão comum, em realizar processos promotores de crescimento vegetal, como:

- Fixação biológica do N₂ atmosférico em vida livre,
- Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio,
- Síntese de hormônios de crescimento vegetal (auxina e etileno),
- Atividade antagonista contra *Fusarium oxysporum* fsp. *phaseoli*,
- A potencialidade destas estirpes em utilizarem fenol como única fonte de carbono
- E a resistência frente a diversos antibióticos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fixação biológica do nitrogênio (FBN)

O desenvolvimento vegetal é influenciado por processos desenvolvidos por determinados grupos de microrganismos. A fixação biológica de nitrogênio é o processo de promoção de crescimento vegetal mais bem estudado nas bactérias associativas e endofíticas, já sendo bastante conhecida a contribuição de bactérias nodulíferas para a nutrição de leguminosas. Nestas simbioses, as bactérias que fixam nitrogênio e nodulam leguminosas (BFNNL) colonizam tecidos vegetais internos, como as raízes e, excepcionalmente, os caules, causando o desenvolvimento de estruturas altamente especializadas, denominadas nódulos. Uma vez formados os nódulos funcionais, esses fixam o nitrogênio atmosférico, que é transferido para a planta hospedeira em troca de fotoassimilados (Moreira & Siqueira, 2006).

O feijão comum e o feijão caupi são espécies de leguminosas privilegiadas com os benefícios das BFNNL. Essas leguminosas são utilizadas como alimento básico para a população brasileira, constituindo sua principal fonte de proteína vegetal. Graças às suas amplas adaptações edafoclimáticas, fazem parte da maioria dos sistemas de produção dos pequenos e médios produtores rurais, os quais utilizam a produção para o consumo familiar e geração de renda.

A tecnologia de inoculação para estas culturas com BFNNL é capaz de substituir total ou, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em diminuição nos custos de produção e beneficiando a maioria dos agricultores que geralmente são de baixo poder aquisitivo. Também é uma alternativa para economizar combustíveis fósseis utilizados na fabricação de fertilizantes nitrogenados.

Experimentos com feijão comum e feijão caupi, implantados no município de Perdões (MG), indicam ser possível que essas culturas se beneficiem, em condições de campo do processo de FBN, podendo alcançar níveis de produtividade semelhantes aos da adubação nitrogenada (Soares et al., 2006a,b). Feijão comum inoculado com estirpes de *Rhizobium tropici* confirma que a simbiose feijoeiro-rizóbio é capaz de fixar N atmosférico e suprir as necessidades das plantas, proporcionando desenvolvimento semelhante ao daquelas que receberam adubação nitrogenada (Ferreira et al., 2000).

Pesquisas realizadas com feijão caupi são um exemplo bem claro de que as investigações por estirpes cada vez mais eficientes na FBN não param, trabalhando sempre em busca de estirpes mais eficientes (Lacerda et al., 2004). Os efeitos das estirpes de rizóbios na fixação biológica do nitrogênio são tão evidentes no feijão comum e feijão caupi que estirpes altamente eficientes são recomendadas pela RELARE (Rede de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola). No entanto, estudos sobre estas bactérias geralmente estão voltados somente à eficiência quanto à FBN, e não têm considerado outros processos, benéficos às plantas, que elas possam proporcionar.

Resultados obtidos com espécies de *Rhizobium* e de *Bradyrhizobium* revelam que, além do potencial da FBN em leguminosas, bactérias desses gêneros podem ter um excelente potencial para serem usadas como rizobactérias capazes de promover o crescimento vegetal em não leguminosas, envolvendo processos como produção de fitormônios, solubilizadores de fosfatos e produção de sideróforos (Antoun et al., 1998). No entanto, é necessário um esforço da pesquisa visando investigar como essas bactérias poderiam beneficiar estes produtores além do processo da FBN.

2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), conhecidas na literatura como “plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR), são aquelas que podem afetar o crescimento das plantas de vários modos. Elas podem ser tanto de vida livre, associadas à rizosfera (associativa) ou endofíticas.

Bactérias endofíticas são aquelas que, durante todo ou parte de seu ciclo de vida, invadem tecidos de plantas vivas através de infecção não aparente e sem causar sintomas de doenças (Wilson, 1995). O habitat endofítico possui características mais favoráveis à expressão de genes promotores do crescimento vegetal do que a rizosfera, apresentando alta disponibilidade energética e baixa competitividade com outras espécies, o que possibilita menor influência de fatores ambientais na expressão dos genes associados à promoção do crescimento da planta hospedeira ao longo do ciclo da cultura.

Os microrganismos influenciam o crescimento da planta por processos de ação direta e indireta. A promoção direta do crescimento vegetal ocorre quando um composto é sintetizado pela bactéria ou quando ela facilita a absorção de certos nutrientes do ambiente, como a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, a solubilização de fosfato inorgânico e a produção de hormônios de crescimento vegetal. A promoção indireta ocorre com a diminuição ou prevenção de efeitos deletérios de microrganismos fitopatogênicos (Glick & Bashan, 1997).

Como diazotróficos de vida livre, as bactérias rizosféricas colonizam preferencialmente o rizoplano e a rizosfera onde exsudados, principalmente açúcares, estão envolvidos nesta associação. Além da FBN, estas bactérias podem produzir hormônios de crescimento vegetal e solubilizar fosfatos inorgânicos (Vessey, 2003; Hara & Oliveira, 2004), ou seja, promovem o crescimento das plantas diretamente pela produção de metabólitos. A síntese de antibióticos pelos microrganismos é uma forma indireta de promoção do

crescimento, pois BPCV que excretam esses compostos podem diminuir os efeitos deletérios dos microrganismos fitopatogênicos. Essas bactérias também podem atuar diminuindo fator de estresse como o etileno endógeno em vegetais sensíveis a esse hormônio.

Diversos gêneros de bactérias como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e outras espécies são conhecidas por promoverem o crescimento vegetal (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). A capacidade de colonização de tecidos vegetais por estes microrganismos é relacionada a diversos fatores, sendo o principal a interação entre os genótipos do vegetal e do microrganismo (Dong et al., 1995, Mahaffee et al., 1997).

As bactérias endofíticas contribuem mais com o nitrogênio fixado do que as associativas. Além disso, efeitos benéficos das endófitas ou associativas nas plantas ocorrem por mecanismos similares aos já descritos para os rizóbios, uma vez que estes microrganismos, em geral, são capazes de viver como habitantes da rizosfera. Recentemente, bactérias endofíticas têm sido relatadas no interior dos nódulos de leguminosas, não causando danos visíveis às plantas. De fato, estudos relatam que a nodulação e o crescimento da soja não foram afetados pelos endofíticos isolados da própria cultura (Li et al., 2008). Do mesmo modo, foi relatado potencial para promoção de crescimento pela produção de auxina, solubilização de fosfato mineral e fixação de nitrogênio em bactérias endofíticas e epifíticas de soja (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

As bactérias que nodulam leguminosas (BNL), além de promoverem o crescimento por meio da FBN, podem auxiliar também o crescimento dos vegetais pelos mesmos processos que outras rizobactérias. Esse fato pode ser verificado mais recentemente em estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* produtoras de hormônios, no entanto, essas estirpes não foram capazes de atuar na solubilização de fosfato e nem produzir sideróforos (Boieiro et al., 2007). Já

Antoun et al. (1998) observaram estirpes da mesma espécie produzindo sideróforos, solubilizando fosfato e produzindo hormônio (AIA), além do gênero *Rhizobium*.

2.3 Produção de substâncias reguladoras do crescimento de plantas (SRCP) ou hormônios de crescimento vegetal

Substâncias reguladoras do crescimento de planta (SRCP) são reguladores naturais que influenciam os processos fisiológicos em baixas concentrações, controlando o crescimento da planta. Podem ser classificadas como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abscísico. Quando produzidos pela própria planta, também são denominados de fitormônios.

Auxinas

O mecanismo mais frequentemente citado para explicar os efeitos das bactérias promotoras de crescimento vegetal em plantas é a produção de hormônios de crescimento vegetal, principalmente auxinas (Patten & Glick, 1996). Dentre os hormônios produzidos pelas bactérias, o ácido 3-indol-acético (AIA) é auxina mais abordada na literatura, o que pode ser devido ao AIA ser a principal auxina de ocorrência natural nas plantas. Existe ampla evidência de que numerosos microrganismos do solo estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas em meio de cultura e no solo (Antoun et al., 1998; Biswas et al., 2000; Radwan et al., 2002; Vega-Hernández et al., 2002; Hameed et al., 2004; Khalid et al., 2004; Thakuria et al., 2004) e diferentes vias metabólicas para a biossíntese do AIA bacteriano já foram descritas (Theunis et al., 2004; Spaepen et al., 2007). Essa substância afeta a morfologia das raízes aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares, aumentando, assim, a área de entrada de nutrientes e exsudação radicular. Experimentos com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas da rizosfera de Mostarda (*Brassica juncea* L.) e trigo revelaram diversidade de bactérias, com eficiência variável

para produção de auxina *in vitro* e, quando inoculados nessas plantas, promoveram maior crescimento vegetal em relação aos tratamentos controle (Asghar et al., 2002; Khalid et al., 2004). No entanto, também foi relatados que isolados de rizobactérias têm efeito variável (ambos, negativo e positivo) no alongamento e peso das raízes em diferentes cultivares de trigo (Khalid et al., 2004). Isolado de rizóbio crescido na presença de triptofano foi deletério às plântulas de alface, provocando perdas no vigor das sementes e formação de plântulas anormais (Schlindwein et al., 2008).

Em leguminosas, a fixação biológica de nitrogênio nos nódulos é vista como primeira função da simbiose e a segunda seria a produção de AIA, ambas suprindo a planta hospedeira na simbiose rizóbio-leguminosas (Ghosh & Basu, 2006). Mudanças no balanço de auxina na planta hospedeira são pré-requisitos para organogênese do nódulo (Mathesius et al., 1998) e o seu metabolismo pode ser importante para a persistência de um nódulo funcional na raiz (Badenoch-Jones et al., 1983).

Citocinina

Citocinina é um hormônio que está diretamente relacionado ao crescimento e divisão celular. É produzido nas raízes e transportado através do xilema para todas as partes das plantas. Embriões e frutos também produzem citocininas (Demason, 2005). O isolamento e a quantificação de citocininas produzidas por bactérias diazotróficas têm sido pouco estudados, pois as citocininas compreendem um grupo de compostos presentes em pequenas quantidades em amostras biológicas, dificultando sua identificação e quantificação. São conhecidas 89 giberelinas (GA – ácido giberélico) que são numeradas de GA₁ até GA₈₉, na ordem em que foram descobertas (Arshad & Frankenberger, 1998). A giberelina mais conhecida é a GA₃ e a mais ativa em planta é a GA₁, responsável pelo alongamento do caule. Estudos têm demonstrado a produção de GA por *Rhizobium* em culturas e sua ocorrência em

nódulos (Williams & Sicardi de Mallorca, 1982), embora seu envolvimento com o processo de nodulação e fixação de nitrogênio tenha sido pouco estudado. De acordo com Atzorn et al. (1988), estirpes de *Rhizobium phaseoli* excretaram mais as giberelina GA1 e GA4 em meio de cultura.

Etileno

O etileno é o único hormônio na forma de gás, que é produzido em quase todas as partes da planta e difunde-se no ar existente entre as células. Em alguns casos, o etileno é estimulador do desenvolvimento vegetal, enquanto em outros, ele atua como inibidor. Ele está envolvido na germinação de sementes, diferenciação dos tecidos, formação e alongamento das raízes, desenvolvimento de gemas laterais, início da floração, abscisão de folhas e frutos, produção de compostos voláteis e resposta das plantas ao estresse biótico e abiótico (Arshad & Frankenberger, 2002). Quando as células vegetais percebem as moléculas de etileno, desencadeiam processos de resposta ao estresse, levando à senescência as células próximas ao sítio de produção de etileno. BPCV sintetizam uma enzima, a 1- aminociclopropano - 1 - ácido carboxílico desaminase (ACC desaminase), que pode estimular o crescimento vegetal, garantindo que o aumento dos níveis de etileno sejam menores em plantas em desenvolvimento ou estressadas (Lugtenberg et al., 2002). *Azospirillum* sp. promovem desenvolvimento em plantas de tomate através de mecanismo que envolve o etileno (Ribaud et al., 2006); já em plantas leguminosas com nódulos determinados o etileno funciona como um inibidor da nodulação (Nukui et al., 2000; Tamimi & Timko, 2003). Estirpes de BNL (*Bradyrhizobium japonicum*) foram relatadas com potencial para ter importante contribuição tecnológica em leguminosas e não leguminosas, devido a apresentarem diferentes potenciais de síntese de diferentes hormônios (AIA, giberelina e ácido abscísico) (Boieiro et al., 2007). Foi observado também aumento do nível de etileno quando essas

estirpes foram crescidas em meio de cultura YMA com L-metionina, indicando diferentes vias de síntese para esse hormônio.

2.4 Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais limitantes ao desenvolvimento vegetal. Seus teores nos solos são relativamente elevados, no entanto, a concentração do P solúvel disponível para a assimilação pelas raízes vegetais é muito baixa, normalmente 1 mg/kg de solo ou menos (Malavolta, 1980; Goedert, et al. 1985). Essa baixa disponibilidade do fósforo é devido à alta reatividade do P solúvel com Ca, Fe e Al, formando fosfatos insolúveis, o que implica na necessidade de grandes aplicações de fosfatos solúveis no solo para que as culturas alcancem alta produtividade. Em solos alcalinos, fosfato de cálcio é a forma predominante de P, e nos solos ácidos, como é o caso dos solos brasileiros, é predominante a forma insolúvel em virtude da abundância de oxidríxidos de alumínio e ferro, formando fosfatos inorgânicos.

A maior reserva de P são as rochas e outros depósitos, como as apatitas e outros minerais primários formados durante a era geológica (Rodriguez & Fraga, 1999). Esse elemento é abundante no solo, tanto na forma inorgânica como orgânica. Na forma orgânica o fósforo se apresentam como componentes de proteínas e ácido graxos que devem ser mineralizados para serem absorvidos pelas plantas, enquanto que o fósforo inorgânico pode ser solubilizado por atividade das raízes das plantas ou microrganismos do solo.

A solubilização de fosfato inorgânico está relacionada a fatores ambientais, como níveis nutricionais e interação com outros microrganismos do ambiente (Vessey, 2003). O principal mecanismo de ação na solubilização de fósforo inorgânico são os ácidos orgânicos sintetizados por diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos (Silva Filho & Vidor, 2000), promovendo acidificação da célula microbiana e o ambiente ao seu redor.

O ácido mais frequentemente observado entre os solubilizadores de fosfato é o ácido glucônico, mas outros ácidos também estão envolvidos na solubilização de fosfato, como os ácidos 2-cetoglucônico, láctico, isovalérico, isobutírico, acético glicólico, malônico e succínico, em diferentes espécies de bactérias (revisado por Rodríguez & Fraga, 1999).

O uso de BFNNL capazes de solubilizar o fosfato inorgânico pode ajudar a aumentar a disponibilidade de fósforos para o crescimento das plantas leguminosas e não leguminosas (Antoun et al., 1998; Peix et al., 2001; Vessey, 2003). Plantas de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas com *Rhizobium etli* reduziram sua nodulação em mais de 50 % quando submetida à baixa condição de fósforo (Remans et al., 2007), confirmando assim, a interferência da disponibilidade de fósforo na associação Rizóbio-leguminosa. Estirpes de *Rhizobium* têm sido relatadas solubilizando diferentes quantidades de fosfato em meio de cultura líquido (Chabot et al., 1998; Bano & Musarrat, 2003) e de *R. leguminosarum* promovendo o crescimento do milho (Chabot et al., 1998)

Essas bactérias, quando envolvidas na solubilização do fósforo, podem aumentar o crescimento vegetal pelo aumento da eficiência da fixação biológica do nitrogênio em leguminosas.

A capacidade de BNL em solubilizar fosfatos pouco solúveis pode ser visualizada e estimada quantitativamente usando métodos em placa de Petri com meio de cultura para solubilizadores contendo fosfato insolúvel como única fonte de fósforo, no qual forma-se uma zona (halo) translúcida ao redor da colônia (Sylvester-Bradley et al., 1982; Peix et al., 2001; Hara & Oliveira, 2004) e resultados indicam que a mobilização do fósforo para as plantas foi diretamente relacionada com a capacidade de solubilização em meio de cultura sólido (Rivas et al., 2006).

A inoculação de BNL eficientes na fixação do nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfato no solo podem ser utilizadas como forma de substituir

ou diminuir não só os fertilizantes nitrogenados, mas também os fertilizantes fosfatados solúveis, aproveitando, assim, os fosfatos naturais existentes ou as formas insolúveis.

2.5 Produção de compostos antifúngicos

Bactérias do solo, especificamente bactérias rizosféricas, podem ser eficientes no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos. Esta eficiência pode ser dada pela produção de compostos metabólicos de baixo peso molecular e/ou por algumas enzimas, que atuam na lise de células fúngicas, produzidas por bactérias do tipo BPCV (Lim et al., 1991).

A produção de cianeto de hidrogênio (HCN), antibióticos e enzimas como quitinase (β -1-3 glucanase), protease e lipase são alguns destes compostos que têm sido apontados como inibidores de microrganismos fitopatogênicos. Certas *Pseudomonas* são capazes de inibir fungos fitopatogênicos através da produção de cianeto. Entretanto, há relatos de efeitos deletérios de HCN em plantas (Bakker & Schipperes, 1987). Porém, observa-se que essa resposta na rizosfera é variável para cada tipo de planta, pois, de acordo com Luz (1996), a produção de HCN também pode promover o crescimento das plantas diretamente pelo aumento do desenvolvimento dos pêlos radiculares.

Além dos diversos compostos metabólicos que atuam como antifúngicos, algumas bactérias também têm habilidade de decomposição ou detoxicação do ácido fusárico, produzido durante a infecção de tecidos vegetais suscetíveis a fungos produtores do ácido. *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas solanacearum*, são bactérias com habilidade de hidrolisar o ácido prevenindo danos causados por diversas espécies do fungo *Fusarium* (Toyoda & Utsumi, 1991).

Lim et al. (1991) demonstraram que estirpe de *Pseudomonas stutzeri* produzia quitinase e laminarase (β -1,3-glucanase), enzimas que podem digerir e

lisar células de *F. solani*. Bactérias endofíticas foram eficientes no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em algodão (Chen et al., 1995), *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em colza e tomate (Nejad & Johnson, 2000). Entre quinze estirpes de *Rhizobium* testadas, duas reduziram significativamente a podridão das raízes de feijão crescidas em solo infestado artificialmente com *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (Buonassisi et al., 1986). *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* apresentou alta atividade antagônica, reduzindo significativamente a massa seca micelial de 10 isolados de fungos, incluindo *Fusarium oxysporum* (Chao, 1990). Experimentos *in vitro* realizados com 266 estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* mostraram que somente oito (3%) das estirpes testadas produziram HCN (Antoun et al., 1998). Estirpes de *Burkholderia cepacia* apresentaram atividade antibiótica contra duas espécies de fungos que provocam doenças em *Phaseolus vulgaris*: *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* e *F. solani* (Peix et al., 2001a).

2.6 Microrganismos e degradação de poluentes

Hidrocarbonetos aromáticos produzidos pela indústria química têm sido inevitavelmente liberados e acumulados no ambiente. A preocupação existente quanto aos solos contaminados com estes compostos decorre, principalmente, do fato de vários destes compostos produzirem efeitos tóxicos, mutagênicos e cancerígenos (Samanta et al., 2002), representando sérios riscos ao meio ambiente e à saúde pública.

Vários hidrocarbonetos derivados do petróleo são causadores de contaminação ambiental, assim como são vários os compartimentos ambientais passíveis de serem afetados por estes compostos. Muitas dessas contaminações ocorrem devido a acidentes, vazamentos, ou mesmo ao uso indiscriminado de defensivos agrícolas em plantações (Sun & Pignatello, 1992).

O benzeno é um hidrocarboneto aromático produzido industrialmente a partir da destilação do petróleo bruto, da destilação de hulha (carvão mineral), da produção de coque (combustível originado do carvão betuminoso) e por síntese química a partir de hidrocarbonetos lineares. É utilizado como matéria-prima para síntese de outros compostos orgânicos (estireno, fenóis, ciclohexano entre outros) e como aditivos nos combustíveis para veículos, substituindo, em parte, o chumbo. No passado, o benzeno foi utilizado como solvente em tintas, colas e semelhantes, limpeza a seco, entre outros processos. Em decorrência de seus efeitos na saúde, foi substituído por outros produtos para este tipo de utilização.

A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos com diferentes graus de volatilização, como compostos alifáticos (alcanos, cicloalcanos e alquenos), aromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - BTEX) e aditivos, com cadeias carbônicas compreendidas na faixa de 5 a 10 carbonos por moléculas (Silva, 2002). Os hidrocarbonetos monoaromáticos, como BTXEs e fenol, têm maior solubilidade em água e, portanto, são os poluentes que primeiro irão atingir o lençol freático.

No solo e na água, o benzeno é biodegradado por diversos tipos de microrganismos, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas, pois os microrganismos necessitam de fontes de carbono e energia para o seu desenvolvimento. Assim, com a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo por estes microrganismos, os poluentes são eliminados do ambiente.

O fenol é um derivado oxigenado do benzeno, que é obtido principalmente através da extração de óleos a partir do alcatrão da hulha, sendo frequentemente utilizado como desinfetante industrial, na produção de resinas fenólicas, intermediários têxteis, intermediários orgânicos, tensoativos, defensivos agrícolas e taninos sintéticos. Fenóis e clorofenóis representam uma classe de agentes tóxico muito comum no meio ambiente e se originados principalmente do uso frequente do biocida na indústria e na agricultura.

Entre os herbicidas pode-se citar a classe dos organoclorados fenólicos como o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), um dos mais empregados para o controle de plantas daninhas de folha largas, e que, quando atacado por *Alcaligenes eutrophus* (JMP 134), é transformado em ácido glioxílico e 2,4-diclorofenol (2,4-DCF), os quais, por várias reações que rompem o anel aromático, convertem o 2,4 DCF em succinato e acetil-CoA (Moreira & Siqueira, 2006). Como estes diversos compostos fenólicos são contribuintes para contaminação do solo, bactérias com esse potencial de degradação poderão contribuir para minimizar os efeitos destes contaminantes no solo, os quais também podem ter efeitos deletérios no próprio desenvolvimento das plantas.

São conhecidos cerca de 60 gêneros de bactérias e pelo menos 80 gêneros de fungos que contêm espécies capazes de degradar hidrocarbonetos e, de acordo com Prince & Drake (1999), essa diversidade pode ser muito maior. *Arthrobater*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* são alguns desses gêneros que têm espécies com essa capacidade. Estudo com *Acinetobacter baumannii* isolada de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo mostrou grande potencial para degradar gasolina (Morais & Tauk-Tornisielo, 2004). Estirpe de *Burkholderia tropicalis*, além de fixar o nitrogênio atmosférico, também degradam benzeno, tolueno, xileno e compostos fenólicos como diclorofenol (2,6-DCP), além de biotransformar 2-clorofenol, 4-clorofenol e 2,4 diclorofenol (Estrada-de-los-Santos et al., 2001). Bactérias com potencial para degradar o fenol também são relatadas por Koutny et al. (2003), os quais ainda sustentam a idéia que ambientes não contaminados podem servir de fonte para fins de seleção de microrganismos com potencial para biorremediação. O gênero *Rhizobium* também é reportado como eficiente na habilidade de utilizar o fenol como única fonte de carbono (Wei et al., 2008).

Certas bactérias possuem a habilidade de decompor substâncias naturais tóxicas, substâncias sintéticas como petróleo, pesticidas e corantes, podendo

conduzir à difusão de seu uso na limpeza de derramamentos perigosos e depósitos tóxicos (Raven et al., 2001).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.204, p.57-67, 1998.

ARSAHAD, M.; FRANKENBERGER, T.W. **Ethylene**: agricultural sources and applications. New York: Kluwer Academic, 2002. Disponível em: <http://books.google.com/books?id=7U-4TU0ryoAC&printsec=frontcover&hl=ptBR&source=gbs_summary_r&cad=0#PPA199,M1>. Acesso em: 24 jan. 2009.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W.T. Plant growth: regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.62, p.45-151, 1998.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, p.231-237, 2002.

ATZORN, R.; CROZIER, A.; WHEELER, C.; SANDBERG, G. Production of gibberellins and indole 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. **Planta**, Berlin, v.175, n.4, p.532-538, Oct. 1988.

BADENOCH-JONES, J.; ROLFE, B.G.; LETHAM, D.S. Phytohormones, *Rhizobium* mutants, and nodulation in legumes: III., auxin metabolism in effective and ineffective pea root nodules. **Plant Physiology**, Washington, v.73, p.347-352, 1983.

BAKKER, A.W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.19, p.451-457, 1987.

BANO, N.; MUSARRAT, J. Isolation and characterization of phorate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.36, p.349-353, 2003.

- BARSHAN, Y.; HOLGUIM, G. Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances: 1999-1996. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.103-121, 1997.
- BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, p.880-886, 2000.
- BOIEIRO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.74, n.4, p.874-880, Mar. 2007.
- BUONASSISI, A.J.; COPEMAN, R.J.; PEPIN, H.S.; EATON, G.W. Effect of *Rhizobium* spp. on *Fusarium* f.sp. phaseoli. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.8, n.2, p.140-146, 1986.
- CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOEPPER, J.W.; ANTOUN, H. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphatesolubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.30, n.12, p.1615-1618, 1998.
- CHAO, L.W. Antagonistic activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.10, n.5, p.213-215, 1990.
- CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZKABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, San Diego, v.5, n.1, p.83-91, 1995.
- DEMASON, D.A. Auxin-cytokinin and auxin-gibberellin interactions during morphogenesis of the compound leaves of pea (*Pisum sativum*). **Planta**, Berlin, v.32, p.1432-2048, 2005.
- DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNAD, K.; MCCULLY, M.E. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1843-1846, 1995.
- ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; BUSTILIOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated

nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Whashington, v.67, p.2790-2798, 2001.

FERREIRA, A.N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C.; ARAÚJO, R.S.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.3, p.507-512, jul./set. 2000.

GHOSH, S.; BASU, P.S. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. **Microbiological Research**, Jena, v.161, p.362-366, 2006.

GLICK, B.R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, Elmsford, v.15, n.2, p.353-378, 1997.

GOEDERT, W.J.; SOUZA, D.M.G. de; LOBATO, E. Fósforo. In: GOEDERT, W.J. (Ed.). **Solos dos cerrados: tecnologia e estratégias de manejo**. São Paulo: Nobel, 1985. p.129-163.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K.A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F.Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.39, p.179-185, 2004.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v.34, n.2, p.343-357, set. 2004.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p.473-480, 2004.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, n.6, p.642-644, June 1978.

KOUTNY, M.; RUZICKA, J.; CHLACHULA, J. Screening for phenol-degrading bacteria in the pristine soils of south Siberia. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.23, n.1, p.79-83, 2003.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of

soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, The Netherlands, v.6, p.1244-1251, 2004.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, n.293, p.67-82, 2004.

LI, J.H.; WANG, E.T.; CHEN, W.F.; CHEN, W.X. 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**, Elmsford, v.40, n.1, p.238-246, 2008.

LIM, H.S.; KIM, S.; KIM, D. Pseudomonas stutzeri YPL-1 genetic transformation and fungal mechanism against *Fusarium Solani*, an agent of plant root rot. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.510-516, 1991.

LUGTENBERG, B.J.J.; CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.81, n.1/4, p.373-383, Dec. 2002.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.1-50, 1996.

MAHAFFEE, W.F.; BAUSKE, E.M.; VUURDE, J.W.L. van; WOLF, J.M. van der; BRINK, M. van der; KLOPPER, J.W. Comparative analysis of antibiotic resistance, immunofluorescent colony staining and a transgenic marker (bioluminescence) for monitoring the environmental fate of a rhizobacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.4, p.1617-1622, 1997.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. 251p.

MATHESIUS, U.; SCHLAMMAN, H.R.M.; SPAINK, H.P.; SAUTTER, C.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC, M.A. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. **The Plant Journal**, v.14, n.1, p.23-34, 1998.

MORAIS, E.B.; TAUK-TORNISIELO, S.M. Crescimento de bactérias isoladas de solo em gasolina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, p.601-603, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

NEJAD, P.; JOHNSON, P.A. Endophytic bacteria induce growth promotion and wit disease suppression in oilseed rape and tomato. **Biological Control**, San Diego, v.18, p.208-215, 2000.

NUKUI, N.; EZURA, H.; YUHASHI, K.I.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in lotus japonicus and *Macrotium atropurpureum*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.41, n.7, p.893-897, 2000.

PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, n.3, p.207-220, 1996.

PEIX, A.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1927-1935, 2001.

PRINCE, R.C.; DRAKE, E.N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D.C.; BOLLAG, J.M.; FRANKBERGER JUNIOR, W.T.; SIMS, R.C. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: Soil Science Society of América, 1999. p.89-110. (Agronomy, 37).

RADWAN, T.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Phyladelphia, v.32, p.39-54, 2002.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. Tradução de Antônio Salatino. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.

REMANS, R.; CROONENBORGH, A.; TORRES, G.R.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.119, n.3, p.341- 351, Nov. 2007.

RIBAUDO, C.; KRUMPHOLZ, E.M.; CASSÁN, F.D.; BOTTINI, R.; CANTORE, M.L.; CURÁ, J.A. Azospirillum sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.25, n.2, p.175-185, June 2006.

RIVAS, R.; PEIX, A.; MATEOS, P.F.; TRUJILLO, M.E.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. **Plant and Soil**, The Hague, v.277, n.1/2, p.23-33, Sept. 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.17, p.319-339, Oct. 1999.

SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons p. environmental pollution and bioremediation. **Trends Biotechnology**, London, v.20, n.6, p.243-248, June 2002.

SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, maio/jun. 2008.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, n.2, p.311-329, mar./abr. 2000.

SILVA, J.A.F. **Sistematização e avaliação de técnicas de investigação aplicadas à caracterização e diagnóstico de área contaminada por hidrocarbonetos de petróleo**. 2002. 138p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativa nodulífera em Perdões (MG): II., feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.803-811, 2006a.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativa nodulífera em Perdões

(MG): I., Caupi. **Revista Brasileira de ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.795-802, 2006b.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v.31, n.4, p.425-448, July 2007.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, Haren, v.24, p.487-506, 2000.

SUN, Y.; PIGNATELLO, J.J. Chemical treatment of pesticide wastes: evaluation of iron (III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4-D at circumneutral pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.40, n.2, p.322-327, 1992.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHAES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.12, n.1 p.15-22, 1982.

TAMIMI, S.M.; TIMKO, M.P. Effects of ethylene and inhibitors of ethylene synthesis and action on nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.257, n.1, p.125-131, Nov. 2003.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N.C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R.C.; KHAN, M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, Columbus, v.86, n.7, p.978-985, Apr. 2004.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W.J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.17, p.1153-1161, Oct. 2004.

TOYODA, H.; UTSUMI, R. **Method for the prevention of Fusarium diseases and microorganisms used for the same**. U.S. patent 4,988,586. 1991.

Disponível em: <<http://www.patentstorm.us/patents/4988586/claims.html>>.
Acesso em: 25 jan. 2009.

VEGA-HERNÁNDEZ, M.C.; LEON-BARRIOS, M.; PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.34, n.5, p.665-668, 2002.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v.255, p.571-586, 2003.

WEI, G.; YU, J.; ZHU, Y.; CHEN, W.; WANG, L. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.151, n.1, p.111-117, Feb. 2008.

WILLIAMS, P.M.; SICARDI DE MALLORCA, M. Abscisic acid and gibberellin-Like substances em roots and nodules of *Glycine max*. **Plant and Soil**, The Hague, v.65, p.19-26, 1982.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and classification of its use and definition. **Oikos**, Copenhagen, v.73, p.274-276, 1995.

CAPÍTULO 2

**Promoção de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre
ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro**

RESUMO

O presente estudo tem como objetivo verificar *in vitro* a existência e potencialidades de processos promotores de crescimento vegetal em estirpes simbiótica de feijão comum, caupi e siratro e bactérias de vida livre. Os processos verificados foram: antagonismo a fungo fitopatogênico, avaliados em placa de Petri contendo meio BDA e disco micélias do fungo; fixação biológica do nitrogênio em vida livre utilizando meio semi-sólido LO – livre de nitrogênio; solubilização de fosfatos inorgânicos de cálcio e alumínio em meio sólido (GES); produção de auxina por ensaio colorimétrico e produção de etileno em meio YMA sem ou com adição do aminoácido precursor e capacidade de utilizar fenol como única fonte de carbono em meio sólido inorgânico de sais. A resistência a antibióticos através de disco de difusão também foi avaliada. Foram estudadas 51 estirpes, sendo 29 selecionadas de experimentos de eficiência simbiótica em feijão caupi e 18 em feijão comum e siratro, sendo algumas previamente selecionadas por sua superior capacidade de fixar nitrogênio em simbiose com essas espécies. Das 51 estirpes estudadas, nenhuma apresentou atividade antagônica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Praticamente todas as estirpes selecionadas de feijão comum fixaram nitrogênio em vida livre, o que não ocorreu com as estirpes selecionadas de caupi. As estirpes 88AC2, 88AB10a e BR 3267, simbióticas em caupi, e a J6-83-1-12, altamente eficiente na FBN em simbiose com feijão comum, foram as mais eficientes em realizar maior número de processos promotores de crescimento vegetal. Outras estirpes isoladas de nódulos de siratro, mas provavelmente endofíticas, apresentaram maior potencial para solubilização de fosfato de cálcio, destacando-se J4-53-1-2, J2-18-1-25 e J2-18-2-4. A maior síntese do AIA foi detectada em estirpes simbióticas, porém ineficiente na fixação biológica do nitrogênio: J6-96-1-3 (feijão comum) e UFLA04-0321(feijão caupi) quando na ausência e presença do L-triptofano, respectivamente. Bactérias simbióticas de feijão comum e caupi apresentam potencial para biodegradação de composto poluente como o fenol.

Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

ABSTRACT

This study aims to determine in vitro the existence and potential for promoting plant growth processes in symbiotic strains of common bean, cowpea and siratro as well as in free-living strains. The processes studied were: antagonism to phytopathogenic fungi evaluated in Petri dish containing PDA medium and disc of the fungus mycelium; free-living biological nitrogen fixation by using semi-solid LO - free of nitrogen; solubilization of inorganic phosphates, calcium and aluminum in solid medium (GES); production of auxin by colorimetric assay; ethylene production in medium YMA with or without addition of amino acid precursor and capability of using phenol as sole carbon source in solid medium with inorganic salts. The resistance to antibiotics by disk diffusion was also evaluated. We studied 51 strains, 29 of them were selected from previous experiments on the symbiotic efficiency in cowpea and common bean and 18 in siratro, for its superior ability to fix nitrogen in symbiosis with these species or nodulating them. Of the 51 strains studied, no one showed antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. Almost all the selected strains from common bean fixed nitrogen in the free-living state, as occurred with the selected strains from cowpea. The strains 88AC2, 88AB10a and BR 3267, symbiotic with cowpea and J6-83-1-12, highly efficient in the BNF when in symbiosis with common bean, were the most efficient in mediating highest number of processes for plant growth promotion. Other strains isolated from siratro nodules, probably endophytic, have the greatest potential for solubilization of calcium phosphate: J4-53-1-2, J2-18-1-25 and J2-18-2-4. The highest synthesis of EIA was detected in symbiotic inefficient strains: J6-96-1-3 (common bean) and UFLA04-0321 (cowpea) when in the absence and presence of L-tryptophan, respectively. Symbiotic bacteria in common bean and cowpea have potential for biodegradation of pollutants such as phenol compound.

Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O solo é um ambiente complexo, heterogêneo e dinâmico que abriga diversos processos importantes mediados por microrganismos que podem contribuir para o crescimento vegetal. Entre esses processos, a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) é mediada por uma pequena parcela dos procariotos e se destaca nos sistemas agrícolas, assim como nos ecossistemas naturais, por aumentar o teor de nitrogênio nestes ambientes.

Vários estudos têm sido desenvolvidos com objetivo de selecionar estirpes de bactérias que apresentem alta eficiência na FBN em feijão comum e feijão caupi, com a finalidade de aumentar os níveis de produtividade dessas culturas. Isto tem revelado uma grande diversidade de estirpes com potencial para uso como inoculantes nestas culturas (Ferreira et al., 2000; Lacerda et al., 2004, Soares et al., 2006a,b).

Além da capacidade de fixar o nitrogênio, é de interesse agrônomo identificar, entre essas bactérias outros processos importantes que possam promover por ação direta ou indireta, o crescimento vegetal de leguminosas e também de plantas não leguminosas. Entre estes processos destacam-se a solubilização de fosfatos inorgânicos, os antagonismos a fitopatógenos e produção de hormônios de crescimento vegetal.

Alguns trabalhos mostram que inoculação com *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* promove a solubilização de fosfato do solo, aumentando a produção de milho (*Zea mays* L.) e alface (*Lactuca sativa* L.) (Chabot et al. 1996). Grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) tiveram aumento de 100 e 125%, respectivamente, no teor de P quando inoculadas com *Mesorhizobium mediterraneum* solubilizadora de fosfato inorgânicos (Peix et al., 2001a).

O antagonismo a fungos fitopatogênicos também é um processo já reportado nas bactérias nodulíferas. Entre quinze estirpes de *Rhizobium* testadas, duas reduziram significativamente a podridão das raízes de feijão crescidas em solo infestado artificialmente com *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* (Buonassisi et al., 1986). Elas produzem compostos com ação antifúngica, restringindo, assim, o desenvolvimento de fungos patógenos na rizosfera. Além disso, estas bactérias estão ativamente envolvidas na síntese de hormônios de crescimento vegetal, o que foi confirmado em meio de cultura (Vega-Hernández et al., 2002; Hameed et al., 2004, Boeiro et al., 2007) e no solo, em rabanetes (*Raphanus sativus* L.) (Antoun et al., 1998); quando associadas ao vegetal, essas bactérias podem ser consideradas agentes causais da alteração do seu crescimento e desenvolvimento. A alta correlação significativa entre a produção de AIA derivada do triptofano *in vitro* e o rendimento de grãos em mostarda (*Brassica juncea* L.) também foram observados (Asghar et al., 2002).

Certas bactérias possuem, também, a habilidade de decompor substâncias naturais tóxicas e substâncias sintéticas como petróleo, pesticidas e corantes, podendo conduzir à difusão de seu uso na limpeza de derramamentos perigosos e depósitos tóxicos (Raven et al., 2001).

Neste sentido, a capacidade destas bactérias em realizar tais processos biológicos na rizosfera contribuirá para um maior efeito dos inoculantes produzidos no crescimento vegetal. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar *in vitro* a existência de processos promotores de crescimento vegetal e suas potencialidade em bactérias simbióticas ou não de feijão comum, feijão caupi e siratro, tais como fixação do nitrogênio atmosférico em vida livre, solubilização de fosfatos insolúveis de cálcio e alumínio, atividade antifúngica e produção de auxina e etileno, além da capacidade de crescimento em meio contendo fenol como única fonte de carbono e resistência a diversos antibióticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes estudadas

Foram estudadas 51 estirpes, sendo que 49 (inclusive duas das três estirpes recomendadas para o caupi) oriundas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras. Dessas, 18 (Tabela 1) foram selecionadas de experimentos realizados quanto à eficiência simbiótica em feijão comum, por Ferreira (2008) e siratro (Lima, 2007) em vasos Leonard. Elas foram isoladas de nódulos de siratro, planta utilizada como isca, inoculadas com suspensão de amostra de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental (Lima, 2007) e por Soares et al. (2006b).

As outras 29 estirpes (Tabela 2) foram selecionadas de experimentos realizados quanto à eficiência simbiótica em caupi, utilizando vasos Leonard e vasos com solo (Soares, 2009). Dentre essas, as estirpes identificadas com a inicial UFLA04 foram isoladas de nódulos de siratro por Pereira (2000) e estudadas quando seu perfil protéico e eficiência simbiótica em caupi por Lima et al. (2005). As identificadas com a inicial 88, 90 e 95 são provenientes de amostras de solos da Amazônia ocidental, do município de Benjamim Constant, e foram isoladas de nódulos de caupi por Nóbrega 2006, o qual as utilizou como planta isca. Essas estirpes foram estudadas quanto sua eficiência em fixar o nitrogênio atmosférico por Neves (2007), em caupi, utilizando garrafa de vidro do tipo long Neck. E as estirpes com inicial UFLA03, foram isoladas por Meloni et al. (2004), de amostras de solos em áreas revegetadas após mineração para extração de bauxitas, da região de Poços de Calda-MG, e estudadas quanto à eficiência simbiótica em caupi em vasos Leonard por Mota (2002).

Também foram estudadas as estirpes CIAT 899, recomendada como inoculante para feijão comum e UFLA 03-84, INPA 03-11B e BR 3267, recomendadas para o feijão caupi.

TABELA 1 Estirpes bacterianas selecionadas de experimentos realizados com feijão comum.

Estirpes	Nodula	Fixa N ₂ simbiot.	Origem/Local de coleta	Identificação	Características morfológicas				
					¹ T.C.	² pH	Cor	³ Abs. ind.	⁴ Ø (mm)
J6-81A-3-7*	Sim	Sim	AM/FA	<i>Rhizobium</i> sp.	R	ácido	amarela	sim	5
J3-40-1-7	Sim	Sim	AM/FP	<i>Rhizobium tropici</i>	R	ácido	creme	sim	5
J6-83-1-12*	Sim	Sim	AM/P	<i>Rhizobium tropici</i>	R	neutro	creme	sim	4
J2-21-2-10*	Sim	Sim	AM/AG	<i>Rhizobium</i> sp.	I	neutro	branca	não	2
J4-52-1-3	Não	----	AM/A	<i>Rhizobium tropici</i>	R	ácido	amarela	não	3
J6-81A-2-10	Não	----	AM/FA	<i>Burkholderia fungorum</i>	R	neutro	creme	não	5
J4-53-1-2	Não	----	AM/FI	<i>Burkholderia fungorum</i>	R	ácido	amarela	não	3
J2-27-1-3	Sim	----	AM/FP	NI	R	ácido	amarela	sim	5
J2-30-1-14	Não	----	AM/FI	<i>Rhizobium tropici</i>	R	ácido	amarela	sim	5
J6-96-1-3	Sim	----	AM/A	<i>Rhizobium</i> sp.	R	neutro	creme	não	3
J2-19A-1-1	Não	----	AM/A	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	R	ácido	amarela	não	4
J2-18-2-4	Não	----	AM/A	<i>Rhizobium tropici</i>	R	ácido	amarela	não	3
J2-18-1-25	Não	----	AM/AG	<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	R	neutro	amarela	sim	2
J3-34-1-3	Não	----	AM/FI	<i>Rhizobium</i> sp.	R	neutro	creme	não	3
UFLA4-21	Sim	Sim	AM/AG	<i>Burkholderia</i> sp.	R	ácido	amarela	sim	4
CIAT899*	Sim	Sim	Colômbia	<i>Rhizobium Tropici</i>	R	ácido	amarela	não	> 2
UFLA 02-86	Sim	----	Theobroma, RO/C	<i>R. etli</i> bv <i>phaseoli</i>	R	neutro	branca	sim	> 2
UFLA 02-68	Sim	----	Theobroma, RO/C	<i>R. etli</i> bv <i>mimosae</i>	R	neutro	branca	sim	> 2
UFLA 02-100	Sim	----	Theobroma, RO/C	<i>Rhizobium etli</i>	R	neutro	branca	sim	>2

Obs: Todas as estirpes oriundas dos solos da Amazônia Ocidental (AM) estão vinculadas ao projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”. Floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA), Agricultura (AG), Floresta primária (FP), Pastagem (P), Agrofloresta (A), Floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI). Características morfológicas: 1. Taxa de crescimento, R rápido (2 a 3 dias); I (4 a 5 dias); 2. pH do meio de cultura; 3. absorção de indicador, 4. Diâmetro da colônia. * Estirpes altamente eficientes na fixação de N₂. NI – Não Identificada

TABELA 2 Estirpes bacterianas selecionadas de experimentos realizados com feijão caupi.

Estirpes	Nodula	Fixa N ₂ simbiot	Origem/ Local da coleta	Identificação	Características morfológicas				
					¹ T.C.	² pH	Cor	³ Abs.indic.	⁴ Ø (mm)
UFLA04-1020	Sim	----	AM/ A	NI	L	alcalino	branca	não	1-2
UFLA04-0314	Sim	----	Theobrama, RO/C	NI	L	alcalino	branca	não	1-2
UFLA 04-0885	Sim	Sim	Jí-Paraná, RO/P	NI	L	alcalino	branca	não	1-2
UFLA04-0559	Sim	----	AM	NI	L	alcalino	branca	não	1-2
88AC2	Sim	----	AM/FS	NI	L	neutro	incolor	não	1,2
88AB6	Sim	----	AM/FS	NI	L	ácido	creme	não	5
90C1	Sim	----	AM/FS	NI	L	alcalino	creme	não	< 1
90A4	Não	----	AM/FS	NI	L	alcalino	amarela	não	3,5
90A8	Sim	----	AM/FS	<i>Pseudomonas luteola</i>	L	ácido	amarela	não	4,5
UFLA03-165	Sim	Sim	Poços de Caldas, MG /MR	NI	L	alcalino	branca	não	< 1
UFLA03-153*	Sim	Sim	Poços de Caldas, MG/MR	NI	L	alcalino	branca	sim	2-3
UFLA03-170	Sim	----	Poços de Caldas, MG /MR	NI	L	alcalino	branca	sim	2
UFLA04-0321	Sim	----	Teobrama, RO/C	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	L	alcalino	creme	----	----
UFLA03-162	Sim	Sim	Poços de Caldas, MG /MR	<i>Bradyrhizobium elkanni</i>	L	alcalino	amarela	não	1
UFLA03-164*	Sim	Sim	Poços de Caldas, MG/MR	<i>Bradyrhizobium elkanni</i>	L	alcalino	branca	sim	2
UFLA03-172	Sim	----	Poços de Caldas, MG/MR	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	L	neutro	branca	sim	2
UFLA04-1309	Sim	----	Pedro Peixoto, AC/C	<i>Burkholderia</i> sp .	L	alcalino	branca	não	< 1
UFLA03-154*	Sim	Sim	Poços de Caldas, MG/MR	<i>Burkholderia</i> sp .	L	alcalino	branca	não	< 1
UFLA04-0110	Sim	----	Teobrama, RO/MF	<i>Burkholderia</i> sp .	L	alcalino	branca	não	1
UFLA04-0546	Sim	----	AM/P	<i>Burkholderia</i> sp.	L	alcalino	branca	não	1-2
88A10	Sim	----	AM/FS	<i>Burkholderia</i> sp.	R	neutro	creme	não	4,5
88AB10a	Sim	----	AM/FS	<i>Burkholderia</i> sp.	I	ácida	creme	não	3
88AB3	Sim	----	AM/FS	<i>Pantoea agglomerans</i>	L	neutro	creme	não	4,5
88C3	Sim	Sim	AM/P	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	L	neutro	branca	não	2
95B10	Sim	----	AM/P	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	L	acido	creme	não	3,5
95B9	Sim	----	AM/P	<i>Pseudomonas</i> sp.	L	neutro	creme	não	2,5
95C3	Sim	----	AM/P	<i>Burkholderia cepacia</i>	R	acido	creme	sim	2,5
95C5	Sim	----	AM/P	<i>Enterobacter aerogenes</i>	L	acido	creme	não	2
UFLA03-163	Sim	----	Poços de Caldas – MG/MR	<i>Bradyrhizobium elkanni</i>	L	alcalino	amarela	sim	< 4
UFLA03-84 *	Sim	Sim	Rondônia/P	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	L	alcalino	branca	não	1-2
INPA03-11B*	Sim	Sim	Manaus/Terra firme	<i>B. elkani</i>	L	-----	branca	não	-----
BR 3267 *	Sim	Sim	-----	<i>B. japonicum</i>	I	alcalino	branca	não	-----

Obs: Todas as estirpes oriundas dos solos da Amazônia Ocidental (AM) estão vinculadas ao projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”. A: sistema agroflorestal; C: Capoeira; P: Pastagem; FS: Floresta secundária; MR: Áreas mineradas e recuperadas; MF: Monocultura feijão. Características morfológicas: 1. Taxa de crescimento, R rápido (2 a 3 dias), I intermediário (4 a 5 dias), L lento (6 a 10 dias); 2. modificação do pH do meio de cultura; 3. absorção de indicador, 4. Diâmetro da colônia. UFLA03-84=SEMIA6461; INPA03-11B=SEMIA6463; BR3267=SEMIA6462. NI: não identificada. * Estirpes altamente eficientes na fixação de N₂. NI – Não Identificada.

2.2 Atividade antifúngica

Um experimento foi conduzido para avaliar a atividade antagônica das estirpes contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, seguindo a metodologia de Peix et al. (2001b) modificada. Discos de 5 mm dos micélios do fungo crescidos em BDA (Batata Dextrose Agar, Difco) pH 6,8 foram colocados no centro da placa de Petri contendo o mesmo meio. Colônias isoladas de cada bactéria foram riscadas em 3 regiões da placa ao redor do disco. As testemunhas foram constituídas por crescimento do disco micelial sem a presença de bactérias. As placas foram incubadas por 3 a 7 dias a 28 °C. Os resultados foram avaliados pela formação de um halo de inibição, comparando com o da testemunha.

2.3 Fixação do nitrogênio em vida livre

As estirpes e os controles positivos BR5401^T e ORS571^T, que são estirpes tipo de *Azorhizobium doebereiner* e *Azorhizobium culinodans*, respectivamente, foram inoculadas no meio do meio de cultura semi-sólido, em frascos com capacidade para 10 mL contendo 5 mL do meio livre de nitrogênio – LO (Dreyfus et al., 1983) com a seguinte composição: 10 g de lactato de sódio; 1,67 g K₂HPO₄; 0,87g de KH₂PO₄; 0,05g de NaCl; 0,1g MgSO₄.7H₂O; 40 mg de CaCl₂; 4 mg de FeCl₃; 5 mg de MoO₄Na. 2H₂O; 10 mg de biotina; 20 mg de ácido nicotínico; 10 mg de ácido pantotênico e 2 ml de elementos traço por litro de meio, em pH 7,0. Além do lactato de sódio, o manitol também foi testado como fonte de carbono.

Os frascos foram incubados por tres a sete dias no escuro, a 28°C, para formação da película na região superficial do meio. Os controles positivos foram comparados com as amostras; aquelas que formaram película nesse período de tempo tiveram o crescimento considerado positivo e as que não formaram película, negativo.

2.4 Solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e de alumínio (P-Al)

Foram instalados dois experimentos, um para verificar a capacidade das estirpes de solubilizar P-Ca e outro para a solubilização de P-Al. A atividade solubilizadora (capacidade e potencial de solubilização) foi avaliada em meio GES (glicose 10 g L⁻¹; extrato de solo 100 mL L⁻¹; MgSO₄ (10%) 2 mL L⁻¹, CaCl₂ (1%) 2 mL L⁻¹; NaCl 1 mL L⁻¹; solução de micronutrientes 2 ml (Ca₂MoO₄.2H₂O 0,2 g; MnSO₄.H₂O 0,235 g; H₃BO₃ 0,28 g; CuSO₄.5H₂O 0,008 g; ZnSO₄.7H₂O 0,024 g; dissolvida em 200 mL de água destilada); Fe-EDTA (1,64%) 4 mL L⁻¹; KNO₃ 0,1 g L⁻¹; ágar 15 g L⁻¹, pH ajustado para 6,5 (Sylvester-Bradley et al., 1982). No primeiro experimento, o fosfato de cálcio foi obtido pela adição de 1 mL de solução de K₂HPO₄ (5%) e 1 mL de solução de CaCl₂ (10%) por 10 mL de meio (autoclavados separadamente) para produzir um precipitado de fosfato insolúvel, CaHPO₄. No segundo experimento foi utilizado o meio com pH 4,5 para verificar a solubilização de fosfato de alumínio, acrescido de 3,04 g L⁻¹ de AlH₆O₁₂P₃.

Para obtenção do inóculo, as estirpes foram crescidas em meio YM (Vincent, 1970) (g L⁻¹): K₂HPO₄ (0,5); MgSO₄.7H₂O (0,2); NaCl (0,1); manitol (10,0) e extrato de levedura (0,4) com pH 6,8. Solução salina (0,85%) foi adicionada ao meio YM para ajustar a concentração das células à densidade ótica (DO) de 0,5 (600nm). Aplicaram-se 20µL da suspensão das células em três pontos equidistantes na placa já contendo o meio com o fosfato precipitado, obtendo-se, assim, três colônias por placa, e para cada estirpe foram feitas duas repetições (duas placas). A cada três dias foi medido o diâmetro do halo de solubilização (área translúcida em torno da colônia), utilizando-se paquímetro digital por um período de 18 dias, resultando em seis medições. A partir dessas medidas foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) = Ø halo (mm) / Ø Colônia (mm) (Berraquero et al., 1976).

Com base nos índices de solubilização, as estirpes foram classificadas como de baixa (IS até 2,99), média (IS de 3 a 4) e alta (IS > 4) capacidade de solubilização. De acordo com o início da solubilização, as estirpes ainda foram classificadas como precoces (quando o início da solubilização ocorreu até o terceiro dia) tardias (com início da solubilização a partir do terceiro dia) e não solubilizadoras (aquelas que não apresentaram solubilização visível até o décimo oitavo dia de avaliação).

Para as estirpes que não apresentaram crescimento no meio com P-Ca, substituiu-se a fonte de carbono por manitol, seguindo-se os mesmos procedimentos anteriores para avaliação.

2.5 Produção de substâncias reguladoras de crescimento - auxina (AIA) e etileno

Para verificar o potencial da produção de AIA, as estirpes testadas, assim como os padrões controle positivos de *Azospirillum brasilense* (BR 11001) e *A. lipoferum* (BR 11080) (Radwan et al., 2002), foram crescidas em meio Dygs contendo (g L⁻¹): glicose (2,0), ácido málico (2,0), peptona bacteriológica (1,5), extrato de levedura (2,0), K₂HPO₄ (0,5), MgSO₄.7H₂O (0,5) e ácido glutâmico (1,5). Após o crescimento, as células foram centrifugadas e ajustadas a DO 0,5, utilizando solução salina (0,85%). O AIA produzido foi quantificado a partir de alíquotas de 500 µL de solução bacteriana inoculadas em 20 mL de meio Dygs (sem L-triptofano e suplementado com 100 mg L⁻¹ de L-triptofano). Foram incubadas por 72 horas a 30 °C sob agitação constante. Após este período, foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. Em seguida, retirou-se 3 mL do sobrenadante e adicionou-se 2 mL do Reagente de Salkowski (Sarwar & Kremer, 1995), reservando o material por 30 minutos no escuro para o desenvolvimento da coloração rósea, indicativo da produção de AIA.

A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro a 535 nm, segundo Asghar et al. (2002). A concentração do AIA foi estimada utilizando

uma curva padrão previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado e quantidades conhecidas de AIA (Sigma) 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Radwan et al., 2002).

As análises estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa SISVAR versão 4.0 (Ferreira 2000) utilizando o teste de Scott-Knott (5%) de probabilidade para comparação de médias, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

Para verificar a produção de etileno, as estirpes foram crescidas em meio de cultura YM (Vincent, 1970) até atingir a DO 0,5 a 600nm. Após o crescimento, 40 μL desta cultura foi transferida para frasco de penicilina contendo 4 mL de YM e YMm (formulação modificada pela adição de 100mg/L de metionina). Os frascos foram vedados com tampas de borracha e parafilme e incubados por 3 dias a 30°C, a 80 rpm. As análises foram realizadas em cromatografia gasosa (Varian Star 3400 cx) retirando-se 500 μL de gás dos frascos. O etileno puro foi utilizado para verificar a presença do pico, e os resultados foram avaliados como positivo ou negativo para sua presença ou ausência nas amostras.

2.6 Crescimento em meio contendo diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono

A habilidade de utilizar fenol como única fonte de carbono foi verificada em placas de Petri contendo meio inorgânico de sais, segundo Cobos-Vasconcelos et al. (2006), modificado, suplementado com as seguintes concentrações de fenol: 1mM, 2mM, 5mM, 6mM, 8mM e 10mM, respectivamente, adicionados ao meio por filtração (0,2 μm). O meio inorgânico de sais continha (g L^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,57); KH_2PO_4 (0,13) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,065) e 2 mL de solução de micronutrientes (0,04g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 1,20 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,40 g H_3BO_3 ; 1,00 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por L^{-1}) e Agar (15). O pH foi ajustado para 6,8 com NaOH. Depois de repicadas as

estirpes, as placas foram incubadas por 4 dias a 28°C. A avaliação foi realizada considerando crescimento positivo ou negativo.

2.7 Resistência bacteriana aos antibióticos

A resistência antimicrobiana das estirpes bacterianas foi avaliada pela técnica de difusão dos discos impregnados, sobrepostos em placas de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970) na seguinte composição (g L⁻¹): K₂HPO₄(0,5); MgSO₄. 7H₂O (0,2); NaCl (0,1); manitol (10); extrato de levedura (0,4), ágar (15) a pH 6,8. Os agentes antimicrobianos analisados foram: Azitromicina (15mgc), Estreptomicina (10mgc), Eritromicina (15mgc), Ampicilina (10mgc), Cloranfenicol (30mgc), Rifamicina (30mgc), Kanamicina (30mgc), Ácido Nalidíxico (30mgc), Claritromicina (15mgc), Amoxicilina (10mgc), Gentamicina (10mgc) e Vancomicina (30mgc) (Cecon, Brasil).

As bactérias foram crescidas em meio YM líquido durante três dias, sob agitação constante. Após o crescimento, 100 µL de cada cultura bacteriana foram espalhadas em placas de Petri, contendo o mesmo meio. Em seguida, utilizando pinça estéril, foram adicionados 3 discos por placa impregnados com diferentes antibióticos. Os discos foram pressionados levemente e mantidos em espaçamento de modo que ficassem separados uns dos outros para evitar a sobreposição dos halos de inibição. As placas foram invertidas e incubadas por três dias a 28°C. Após esse período, utilizando-se um paquímetro digital, foram mensurados o diâmetro do halo de inibição do crescimento (área translúcida ao redor do disco) das estirpes bacterianas.

As análises estatísticas foram efetuadas utilizando-se o programa SISVAR versão 4.0 (Ferreira, 2000) e o teste de Scott-Knott (5%) de probabilidade para comparação de médias, em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antifúngica

Neste estudo, nenhuma das 51 estirpes apresentou potencial para inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. No entanto, estudos realizados por Chao (1990) com *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* indicam que algumas espécies de *Rhizobium* podem inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, incluindo *Fusarium oxysporium*.

3.2 Fixação do nitrogênio em vida livre

Todas as estirpes que formaram película sobre a superfície do meio LO (Tabela 3) a formaram nas duas fontes de carbono utilizadas (lactato e manitol). Somente os controles positivos BR5401^T e ORS571^T não formaram película quando o lactato de sódio foi substituído pelo manitol.

Praticamente todas as estirpes, inclusive as altamente eficientes na fixação biológica de nitrogênio em simbiose com feijão comum selecionadas dos experimentos de Ferreira (2008), fixaram o nitrogênio em vida livre, exceto J6-96-1-3, de baixa eficiência na FBN com essa leguminosa (Ferreira, 2008), e as estirpes UFLA02-68 e UFLA02-100 (Tabela 3). Esse resultado foi adverso para as estirpes selecionadas dos experimentos realizados com feijão caupi (Soares, 2009), pois das estirpes avaliadas, apenas 8 fixaram o nitrogênio em vida livre, e as estirpes altamente eficientes na FBN em simbiose com o caupi não estão incluídas nessas estirpes.

TABELA 3 Formação de películas por estirpes de bactérias sobre a superfície do meio LO na presença de lactato e manitol como fonte decarbono.

Estirpes	Aparecimento de película	Estirpes	Aparecimento de película	Estirpes	Aparecimento de película
UFLA04-1020	+	95B10	-	J3-40-1-7	+
UFLA04-0321	-	95B9	-	J6-83-1-12	+
UFLA04-0314	+	95C3	-	J6-81A-2-10	+
UFLA04-0885	-	95C5	-	J4-53-1-2	+
UFLA04-1309	+	UFLA03-154	-	J2-27-1-3	+
UFLA04-0546	+	UFLA03-162	NA	J2-30-1-14	+
UFLA04-0559	+	UFLA03-164	-	J6-96-1-3	-
UFLA04-0110	+	UFLA03-165	-	J2-19A-1-1	+
88AC2	+	UFLA03-153	-	J2-18-1-25	+
88AB10a	+	UFLA03-170	-	J2-18-2-4	+
88A10	-	UFLA03-172	-	J3-34-1-3	+
88AB6	-	UFLA03-163	-	J4-52-1-3	+
88AB3	-	BR 3267	-	UFLA4-21	+
88C3	-	UFLA 03-84	-	CIAT899	+
90C1	-	INPA 03-11B	-	UFLA 02-86	-
90A4	-	J6-81A-3-7	+	UFLA 02-68	-
90A8	-	J2-21-2-10	+	UFLA 02-100	-

+: cresceu; -: não cresceu; NA: não avaliada.

3.3 Solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e de alumínio (P-Al)

Na Tabela 4 observa-se que 34 (67%) das estirpes solubilizaram fosfato de cálcio *in vitro*, sendo que apenas as estirpes J4-53-1-2, UFLA 4-49 e J2-18-2-4, isoladas de nódulos de siratro e não nodulífera de feijão comum (Ferreira, 2008) apresentaram alto índice de solubilização (IS > 4). Vinte e sete estirpes se comportaram como precoces e 7, como tardias. Esses dados corroboram os de Peix et al. (2001a), que encontraram isolados de rizóbios efetivos na solubilização de fosfato de cálcio em laboratório, com eficiência de solubilização variando entre as estirpes.

Entre as 51 estirpes avaliadas, 22 (43%) apresentaram capacidade para solubilizar fosfato de alumínio *in vitro*, sendo que todos apresentaram baixa capacidade de solubilização, com índices entre 1,09 a 1,81 (Tabela 5). Todas as estirpes apresentaram solubilização tardia, exceto a estirpe UFLA04-0559 de feijão caupi, que se comportou como precoce. Hara & Oliveira (2004), estudando 88 isolados bacterianos nodulíferos de feijão caupi oriundos dos solos

da Amazônia, encontraram 39% de solubilizadoras de P-Ca, mas somente um apresentou alto índice de solubilização, enquanto 67% apresentaram baixa capacidade de solubilizar P-Al. Neste trabalho, a solubilização de fosfatos de cálcio ocorreu em maior proporção que a solubilização de fosfato de alumínio. Entretanto, os mesmos autores, em outro estudo (Hara & Oliveira, 2005), evidenciaram a mesma proporção de isolados, com a mesma origem geográfica, solubilizadores de fosfato de cálcio e alumínio. Os dados das tabelas 4 e 5 evidenciam que somente 14 das estirpes que solubilizaram o P-Ca também solubilizaram o P-Al.

TABELA 4 Início e índice da solubilização (I.S) de fosfato de cálcio das estirpes crescidas em meio GES com glicose.

Estirpes	In. Sol.* (dias)	I.S (mm)		Estirpes	In. Sol. (dias)	I.S (mm)	
		Inicial	Final			Inicial	Final
UFLA04-1020	3	2,14**	2,15	UFLA03-170	NC	-	-
UFLA04-0321	NC	-	-	UFLA03-172	NC	-	-
UFLA04-0314	3	2,81	2,25	UFLA03-163	3	1,82	2,00
UFLA04-0885	NC	-	-	BR 3267	3	1,94	1,73
UFLA04-1309	6	2,12	2,12	UFLA 03-84	NC	-	-
UFLA04-0546	12	2,08	2,37	INPA 03-11B	3	1,21	1,56
UFLA04-0559	3	1,25	2,10	J6-81A-3-7	NC	-	-
UFLA04-0110	3	1,33	2,01	J2-21-2-10	CNFH	-	-
88AC2	NC	-	-	J3-40-1-7	3	1,74	2,80
88AB10a	3	1,00	2,04	J6-83-1-12	CNFH	-	-
88A10	3	2,13	2,03	J6-81A-2-10	3	2,27	3,12
88AB6	6	1,38	1,38	J4-53-1-2	3	2,67	4,55
88AB3	9	2,05	1,69	J2-27-1-3	3	1,58	2,55
88C3	NC	-	-	J2-30-1-14	3	2,18	2,20
90C1	3	2,72	2,63	J6-96-1-3	3	1,00	1,43
90A4	CNFH	-	-	J2-19A-1-1	3	2,45	3,19
90A8	NC	-	-	J2-18-1-25	3	2,09	4,30
95B10	3	1,67	1,89	J2-18-2-4	3	2,09	4,61
95B9	NC	-	-	J3-34-1-3	3	1,73	1,89
95C3	NC	-	-	J4-52-1-3	3	2,20	2,09
95C5	3	1,57	1,57	UFLA4-21	3	2,00	3,40
UFLA03-154	3	2,11	2,01	BR 322	3	1,93	1,92
UFLA03-162	NC	-	-	UFLA 02-86	9	1,18	1,36
UFLA03-164	NC	-	-	UFLA 02-68	18	1,15	-
UFLA03-165	3	2,36	2,41	UFLA 02-100	9	1,22	1,24
UFLA03-153	CNFH	-	-				

*Início da Solubilização. **I.S. = Ø HALO (mm) / Ø COLÔNIA (mm). CNFH: Cresceu e não formou halo. NC: Não cresceu. IS até 2,99: baixa, 3 a 4: média, > 4: alta capacidade de solubilização. Precoce: início da solubilização até o 3º dia. Tardia: início da solubilização a partir do 3º dia. Não solubilizadora: não apresentaram solubilização visível até o 18º dia.

TABELA 5 Início e índice da solubilização (I.S) de fosfato de Alumínio das estirpes crescidas em meio Ges com glicose.

Estirpes	In. Sol.* (dias)	I.S (mm)		Estirpes	In. Sol. (dias)	I.S (mm)	
		Inicial	Final			Inicial	Final
UFLA04-1020	CNFH	-	-	UFLA03-170	NC	-	-
UFLA04-0321	12	1,29**	1,33	UFLA03-172	CNFH	-	-
UFLA04-0314	CNFH	-	-	UFLA03-163	CNFH	-	-
UFLA04-0885	12	1,77	1,81	BR 3267	6	1,31	1,29
UFLA04-1309	12	1,42	1,35	UFLA 03-84	6	1,27	1,42
UFLA04-0546	NC	-	-	INPA 03-11B	CNFH	-	-
UFLA04-0559	3	1,27	1,29	J6-81A-3-7	6	1,21	1,29
UFLA04-0110	CNFH	-	-	J2-21-2-10	CNFH	-	-
88AC2	6	1,37	1,27	J3-40-1-7	6	1,00	1,15
88AB10a	6	1,43	1,40	J6-83-1-12	6	1,32	1,41
88A10	CNFH	-	-	J6-81A-2-10	6	1,40	1,52
88AB6	CNFH	-	-	J4-53-1-2	6	1,03	1,15
88AB3	6	1,31	1,30	J2-27-1-3	NC	-	-
88C3	CNFH	-	-	J2-30-1-14	6	1,27	1,29
90C1	CNFH	-	-	J6-96-1-3	6	1,36	1,24
90A4	CNFH	-	-	J2-19A-1-1	NC	-	-
90A8	6	1,00	1,16	J2-18-1-25	CNFH	-	-
95B10	CNFH	-	-	J2-18-2-4	NC	-	-
95B9	NC	-	-	J3-34-1-3	NC	-	-
95C3	NC	-	-	J4-52-1-3	6	1,00	1,39
95C5	CNFH	-	-	UFLA4-21	9	1,30	1,32
UFLA03-154	6	1,00	1,09	BR 322	CNFH	-	-
UFLA03-162	CNFH	-	-	UFLA 02-86	CNFH	-	-
UFLA03-164	NC	-	-	UFLA 02-68	CNFH	-	-
UFLA03-165	6	1,77	1,78	UFLA 02-100	CNFH	-	-
UFLA03-153	6	1,30	1,22				

*Início da Solubilização. **I.S. = \varnothing HALO (mm) / \varnothing COLÔNIA (mm). CNFH: Cresceu e não formou halo. NC: Não cresceu. IS até 2,99: baixa, 3 a 4: média, > 4: alta capacidade de solubilização. Precoce: início da solubilização até o 3º dia. Tardia: início da solubilização a partir do 3º dia. Não solubilizadora: não apresentaram solubilização visível até o 18º dia.

Das 13 estirpes que não apresentaram crescimento no meio GES de Sylvester-Bradley et al. (1982) para solubilização de fosfato de cálcio, sete apresentaram crescimento, entre as quais duas solubilizaram quando a glicose foi substituída por manitol (Tabela 6). Isto pode ser explicado pelo fato do crescimento bacteriano depender do tipo de fonte de carbono utilizado, mascarando a capacidade solubilizadora, por não haver crescimento. Ou seja, essas estirpes não utilizam glicose e, portanto, não puderam crescer e,

consequentemente, solubilizar em meio com essa fonte de carbono. Já em meio com manitol onde cresceram, essas comportaram como tardias e de baixa capacidade solubilizadora. Silva Filho & Vidor (2000), estudando o comportamento de fungos e bactérias, demonstraram que o crescimento e a capacidade solubilizadora variaram de acordo com o tipo de microorganismo e fatores nutricionais, inclusive presença de fontes de carbono no meio. Nesse trabalho, todos os microorganismos foram incapazes de solubilizar em meio GES com extrato de levedura sem fonte de carbono (testemunha), no entanto, houve crescimento de todos os microorganismos, o que foi atribuído ao carbono proveniente do extrato de levedura utilizado no meio, produto não utilizado no presente trabalho.

TABELA 6 Início e índice da solubilização de fosfato de cálcio das estirpes crescidas em meio GES onde a glicose foi substituída por manitol.

Estirpes	In. Sol.* (dias)	I.S (mm)		Estirpes	In. Sol. (dias)	I.S (mm)	
		Inicial	Final			Inicial	Final
88AC2	9	1,14**	1,13	95B9	NC	-	-
90A8	6	1,50	1,13	95C3	NC	-	-
UFLA04-0321	CNFH	-	-	UFLA03-162	NC	-	-
UFLA04-0885	CNFH	-	-	UFLA03-164	NC	-	-
88C3	CNFH	-	-	UFLA03-170	NC	-	-
UFLA03-84	CNFH	-	-	UFLA03-172	NC	-	-
J6-81A-3-7	CNFH	-	-				

*Início da Solubilização. **I.S. = Ø HALO (mm) / Ø COLÔNIA (mm). CNFH: Cresceu e não formou halo. NC: Não cresceu. IS até 2,99: baixa, 3 a 4: média, > 4: alta capacidade de solubilização. Precoce: início da solubilização até o 3º dia. Tardia: início da solubilização a partir do 3º dia. Não solubilizadora: não apresentaram solubilização visível até o 18º dia.

A capacidade de solubilizar fosfatos e de promover o crescimento das plantas (Chabot et al., 1996; Peix et al, 2001a,b) evidenciam o quanto é promissora a utilização de bactérias como inoculantes em cultivos agrícolas, tanto para leguminosas como para não leguminosas. Há a necessidade de aprofundar o estudo do uso de rizóbio como inoculante, enfocando os

mecanismos que possam selecionar isolados não só capazes de fixar o N₂ atmosférico, mas também de solubilizar o fósforo insolúvel, entre outros.

3.4 Produção de substâncias reguladoras de crescimento - auxina (AIA) e etileno

A habilidade de produzir AIA foi expressa por praticamente todas as estirpes (98,04%) em meio de cultura, independente da condição de cultivo (presença ou ausência do L-triptofano). Somente a estirpe UFLA03-170 não produziu AIA em ambas as condições (Tabela 7 e 8). Entre as 50 estirpes que produziram AIA, 40 sintetizaram AIA na ausência e 47, na presença de L-triptofano. Estes resultados sugerem que as estirpes J2-21-2-10, UFLA 02-100, J6-81A-2-10, J3-34-1-3, J4-52-1-3, 88C3, 90A4, UFLA04-0559, UFLA03-170 e UFLA03-153 que não produziram AIA na ausência do L-triptofano (Tabela 7), provavelmente não possuem a via do indole-3-piruvato (IpyA) ativa nessas condições de cultivo, uma vez que a capacidade de bactérias nodulíferas sintetizarem AIA envolve três vias de síntese: indole-3-acetamida (IAM), indole-3-piruvato (IpyA) e triptamina (TAM) (Patten & Glick, 1996; Theunis et al., 2004), sendo a via IpyA independente do L-triptofano, um aminoácido precursor para todas outras vias. A 3-indol-acetonitrila (IAN) também foi relatada como via para a síntese do AIA em *Bradyrhizobium*, culminando na via IAM (Vega-Hernández et al., 2002). Por outro lado, as estirpes UFLA03-172, INPA 03-11B e UFLA03-163 de *Bradyrhizobium* sp., que não produziram AIA na presença do L-triptofano (Tabela 8), provavelmente tiveram a enzima Indol-3-pirúvico descarboxilase reprimida pela presença do aminoácido, corroborada, assim, pela capacidade de síntese na sua ausência (Tabela 7).

TABELA 7 Produção de Auxina (AIA) pelas estirpes crescidas em meio Digs na ausência de L-triptofano.

GRUPO*	ESTIRPES	AIA(µg/mL)
1	BR11001 ¹ , J6-96-1-3	12,35 – 12,59 (a) [§]
2	UFLA04-0110, UFLA03-164, 88AB6, 88AC2, 88AB10a, J6-83-1-12	8,99 – 9,84 (b)
3	UFLA03-165, CIAT899	7,19 – 7,25 (c)
4	J2-30-1-14, UFLA04-1020, J4-53-1-2	6,28 – 6,73 (d)
5	J2-18-1-25, J3-40-1-7, INPA03-11b, 90A8, J2-27-1-3	4,42 – 4,84 (e)
6	UFLA03-172, 95B9, 88AB3	3,56 – 3,88 (f)
7	J2-19A-1-1, BR11080 ² , 95C3	3,24 – 3,36 (g)
8	95C5, UFLA04-0314, UFLA03-162	2,82 – 2,90 (h)
9	UFLA02-86, J2-18-2-4, 95B10, UFLA03-163	2,48 – 2,63 (i)
10	UFLA4-21, 90C1, UFLA04-0885	2,18 – 2,34 (j)
11	UFLA03-154, 88A10, UFLA04-0321	1,65 – 1,83 (l)
12	UFLA04-0546	1,29 (m)
13	UFLA04-1309	0,77 (n)
14	J6-81A-3-7, BR3267	0,43 – 0,45 (o)
15	J2-21-2-10, UFLA02-100, J6-81A-2-10, UFLA02-68, J3-34-1-3, 90A4, J4-52-1-3, 88C3, UFLA04-0559, UFLA03-170, UFLA03-153, UFLA03-84 [§]	0,00 – 0,23 [§] (p)

*Estirpes pertencentes ao mesmo grupo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV(%): 2,89. Estirpes padrão¹ *Azospirillum brasilense*, ² *A. lipoferum*.

TABELA 8 Produção de Auxina (AIA) pelas estirpes crescidas em meio Digs na presença de L-triptofano (100 mg L⁻¹).

Grupos*	Estirpes	AIA(µg/mL)
1	UFLA04-0321	42,28 (a)*
2	BR11001 ¹	37,79 (b)
3	95C3	30,27 (c)
4	88AB6, J6-81A-2-10	27,57 – 28,74 (d)
5	J3-34-1-3, J3-40-1-7	25,43 – 26,38 (e)
6	J6-96-1-3, UFLA04-0559	23,58 – 24,17 (f)
7	90A8	20,16 (g)
8	88AB10a	16,85 (h)
9	90C1	13,49 (i)
10	88AC2, 88A10	12,07 – 12,55 (j)
11	UFLA02-86, UFLA03-165, CIAT899, 95B9, UFLA04-1020, UFLA02-100	8,70 – 10,21 (l)
12	UFLA04-1309, 95B10, UFLA04-0314, J2-18-1-25, BR11080 ² , J6-81A-3-7	7,21 – 7,73 (m)
13	UFLA4-21, UFLA04-0546, BR3267	6,51 – 6,96 (n)
14	88AB3, 95C5, J6-83-1-12	5,14 – 5,68 (o)
15	UFLA03-154, J4-53-1-2, J2-30-1-14, UFLA02-68	4,39 – 4,75 (p)
16	J2-21-2-10	3,61 (q)
17	J2-19A-1-1	2,64 (r)
18	J2-18-2-4, UFLA04-0110, J4-52-1-3, 88C3	2,14 – 2,23 (s)
19	UFLA03-164	1,29 (t)
20	90A4, J2-27-1-3	1,14 – 1,29 (u)
21	UFLA03-153, UFLA03-162, UFLA-03-84, UFLA04-0885	0,32 – 0,47 (v)
22	UFLA03-172, INPA03-11b, UFLA03-163, UFLA03-170	0,00 (x)

*Estirpes pertencentes ao mesmo grupo não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV(%): 3,24. Estirpes padrão¹ *Azospirillum brasilense*, ² *A. lipoferum*.

Em *Bradyrhizobium elkanni*, a via indole-3-piruvato é tida como a principal para síntese do AIA (Minamisawa et al., 1996), o que pode ser confirmado pelos presentes resultados, visto que todas as estirpes de *B. elkanni* (UFLA03-164, UFLA03-162, UFLA03-163 e INPA 03-11B) deste estudo produziram 9,42; 3,82; 2,63 e 4,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, respectivamente, na ausência do L-triptofano (Tabela 7).

Neste estudo, a produção do AIA variou de 0,23 a 12,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em meio não suplementado com L-triptofano, sendo o nível mais baixo produzido pela estirpe UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.) grupo 15 e a máxima produção, foi atingida pela estirpe J6-96-1-3 (*Rhizobium etli.*) grupo 1, não diferindo estatisticamente do padrão *A. brasilense* (BR11001) (Tabela 7). Boeiro et al. (2007), estudando estirpes de *B. japonicum*, observaram variação de 0,91 a 3,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA produzidos em meio não suplementado de L-triptofano. A estirpe BR 3267, recomendada como inoculante para o feijão caupi, pertencente ao mesmo gênero, produziu 0,45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA na ausência do aminoácido e esse valor aumentou quinze vezes (6,96 $\mu\text{g mL}^{-1}$), quando o meio foi acrescido do L-triptofano, confirmando, assim, a presença de mais de uma via para síntese do AIA nessa espécie.

Maiores diferenças significativas foram observadas quando o meio foi suplementado com L-triptofano (Tabela 8). Nessas condições, as estirpes formaram 22 grupos significativamente diferentes, apresentando a estirpe ST3-21 nodulífera de feijão caupi produção de AIA estatisticamente superior ao padrão positivo *Azospirillum brasilense* (BR 11001).

No solo, a exposição das raízes ao AIA exógeno bacteriano pode afetar o crescimento da planta de diversas maneiras, desde a patogênese e inibição do crescimento até a fitoestimulação (Spaepen et al. 2007). O AIA, assim como outros hormônios, estimula o crescimento de plantas apenas dentro de uma faixa estreita de concentração. Fora dessa faixa benéfica, as concentrações mais baixas

são ineficazes e as mais elevadas tornam-se tóxicas (Biswas et al. 2000). Estudos verificaram que *Rhizobium leguminosarum* produzindo 171,17 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AIA causou prejuízos para o desenvolvimento das plântulas de alface, por outro lado, isolados de *Bradyrhizobium* sp. produzindo 1,2 a 3,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de AIA aumentaram o vigor das plântulas em relação ao tratamento sem inoculação (Schlindwein et al., 2008). Neste estudo, não foram observados valores tão altos como os citados pelos autores, nem mesmo pela estirpe UFLA04-0321, indicando que essas estirpes podem atuar como fitoestimuladores.

Pelo método utilizado, a produção de etileno foi detectada em 21 das estirpes analisadas (Tabela 9). Entre essas, onze sintetizaram o hormônio na presença e ausência da L-metionina (aminoácido precursor do etileno), incluindo a BR 3267 de *B. japonicum* que foi a espécie relatada pela primeira vez por Boiero et al. (2007) produzindo etileno em meio de cultura com ou sem a adição do aminoácido. Há uma controvérsia quanto à função deste hormônio nas plantas, pois em leguminosas com nódulos determinados, o etileno funciona como inibidor da nodulação. Isso foi demonstrado por Nukui et al. (2000) quando plantas de *Lotus japonicus* e *Macroptilium atropurpureum* (siratiro) receberam diariamente 1 μM de ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) precursor da síntese do etileno. Esses mesmos autores confirmaram o envolvimento de etileno na nodulação com a aplicação de inibidores como AVG (aminoethoxyvinylglycine) - inibidor da ACC sintase (enzima chave para a biossíntese do etileno) e STS (silver thiosulfate), verificando, assim, aumento dos números de nódulos nas plantas. Plantas de feijão comum tratadas com 50 μM de AVG produziram 3 vezes mais nódulos do que a planta controle (Tamimi & Timko, 2003); verificou-se, também, redução significativa do número de nódulos produzidos por plantas de feijão comum quando submetida a tratamento com 50 μM de ethephon (produto que espontaneamente se decompõe em etileno).

Já em plantas não leguminosas como o tomate, o aumento do etileno endógeno nas raízes e parte aérea, promovido pela biossíntese do AIA bacteriano, teve efeito significativo no desenvolvimento da raiz e no peso da parte aérea (Ribaud et al., 2006). Nesse mesmo estudo, 50 μ M de ethephon apresentaram os mesmos efeitos positivos para essa cultura.

TABELA 9 Produção de etileno e capacidade de crescimento em meio contendo diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono.

Estirpes	Etileno		Fenol (mM)						Estirpes	Etileno		Fenol (mM)					
	S	C	1	2	5	6	8	10		S	C	1	2	5	6	8	10
UFLA04-1020	+	+	-	-	-	-	-	-	UFLA03-170	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA04-0321	-	+	-	-	-	-	-	-	UFLA03-172	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA04-0314	-	-	-	-	-	-	-	-	UFLA03-163	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA04-0885	-	-	-	-	-	-	-	-	BR3267	+	+	-	-	-	-	-	-
UFLA04-1309	-	-	-	-	-	-	-	-	UFLA03-84	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA04-0546	+	+	-	-	-	-	-	-	INPA03-11b	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA04-0559	-	-	-	-	-	-	-	-	J6-81A-3-7	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA04-0110	-	+	-	-	-	-	-	-	J2-21-2-10	-	-	-	-	-	-	-	-
88AC2	+	+	-	-	-	-	-	-	J3-40-1-7	-	-	-	-	-	-	-	-
88AB10a	+	+	-	-	-	-	-	-	J6-83-1-12	+	+	-	-	-	-	-	-
88A10	-	-	-	-	-	-	-	-	J6-81A-2-10	-	+	-	-	-	-	-	-
88AB6	-	-	+	+	+	+	+	+	J4-53-1-2	-	-	-	-	-	-	-	-
88AB3	+	+	-	-	-	-	-	-	J2-27-1-3	-	-	-	-	-	-	-	-
83C3	+	+	-	-	-	-	-	-	J2-30-1-14	-	+	-	-	-	-	-	-
90C1	-	-	-	-	-	-	-	-	J6-96-1-3	-	+	-	-	-	-	-	-
90A4	-	-	+	+	+	+	+	+	J2-19A-1-1	+	+	-	-	-	-	-	-
90A8	-	-	-	-	-	-	-	-	J2-18-1-25	+	+	-	-	-	-	-	-
95B10	-	-	-	-	-	-	-	-	J2-18-2-4	-	-	-	-	-	-	-	-
95B9	+	+	-	-	-	-	-	-	J3-34-1-3	-	+	+	+	+	-	-	-
95C3	-	-	-	-	-	-	-	-	J4-52-1-3	-	+	-	-	-	-	-	-
95C5	-	-	-	-	-	-	-	-	UFLA4-21	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA03-154	-	-	-	-	-	-	-	-	CIAT899	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA03-162	-	-	-	-	-	-	-	-	UFLA02-86	-	+	+	+	+	+	+	+
UFLA03-164	-	+	-	-	-	-	-	-	UFLA02-68	-	-	+	+	+	+	+	+
UFLA03-165	-	-	+	+	+	+	+	+	UFLA02-100	-	+	+	+	+	+	+	+
UFLA03-153	-	-	-	-	-	-	-	-									

S: meio de cultura sem Metionina, C: meio de cultura com 100mg/L de Metionina.

3.5 Utilização de fenol como única fonte de carbono

Para a capacidade de crescimento em meio contendo diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono, as estirpes 88AB6, 90A4, UFLA03-165, UFLA 02-86, UFLA 02-68, UFLA 02-100 e J3-34-1-3 cresceram em todas as concentrações analisadas, exceto a última estirpe, que não apresentou crescimento na concentração de 6 mM (Tabela 9). Diversos gêneros

de bactéria são descritos como degradadores de compostos fenólicos, entres eles *Burkholderia* (Cobos-Vasconcelos et al., 2006) e *Rhizobium* sp. (Wei et al., 2008), gêneros também selecionados no presente trabalho.

3.6 Resistência bacteriana aos antibióticos

O comportamento das estirpes frente aos diversos antibióticos está apresentado na Tabela 10, revelando que todas as estirpes foram resistentes no mínimo a três e dez estirpes foram resistentes a 10 ou mais das drogas testadas. Um fato bastante relevante nesse trabalho foi verificado pela única estirpe que apresentou resistência a todos os antibióticos estudados, UFLA 03-84, estirpe recomendada para o feijão caupi (Moreira, 2005). Esse fato é uma vantagem seletiva sobre os demais microrganismos, levando essa estirpe a ser mais competitiva no solo, característica imprescindível para o funcionamento da simbiose, e que explica seu sucesso como inoculante. As outras duas estirpes recomendadas para essa cultura (BR 3267 e INPA 03-84) apresentaram resistência a 8 (66,67%) e 9 (75%) entre os 12 antibióticos estudados respectivamente, o que é também bastante considerável. A resistência aos antibióticos é maior para Cloranfenicol, seguida por Ampicilina, Amoxicilina e vancomicina. Nos estudos realizados por Ahmad et al. (2001) com isolados de *Bradyrhizobium*, ampicilina também foi um dos antibióticos que apresentou maior incidência de resistência pelos isolados.

Aproximadamente 97% das estirpes foram sensíveis a Rifamicina e Kanamicina. Rizóbios isolados de árvores leguminosas também foram mais sensíveis a Rifamicina entre outros antibióticos estudados (Frioni et al., 2001). Rifamicina foi responsável por inibir o crescimento da estirpe UFLA04-0321 de *Bradyrhizobium* sp. a qual apresentou diâmetro de 42,5mm, o que implica que, no solo, quanto maior a sensibilidade das estirpes aos antibióticos, maior poderá ser a zona que ficará desprovida da população bacteriana benéfica.

TABELA 10 Resultados do teste de resistência antimicrobianos por disco-difusão (mm).

	¹ AZI	² EST	³ ERI	⁴ AMP	⁵ CLO	⁶ RFM	⁷ KAN	⁸ NAL	⁹ CLA	¹⁰ AMO	¹¹ GEN	¹² VAN	Σ(R)
UFLA04-1020	24,59(g)	19,38(f)	13,58(d)	R(a)	R(a)	17,14(e)	25,16(g)	30,83(h)	11,94(c)	R(a)	9,23(b)	R(a)	4
UFLA04-0321	R(a)	16,52(b)	R(a)	R(a)	R(a)	42,49(d)	18,85(c)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	9
UFLA04-0314	28,78(g)	19,92(e)	14,77(d)	6,99(b)	R(a)	20,85(e)	25,98(f)	33,17(h)	20,01(e)	R(a)	10,48(c)	R(a)	3
UFLA04-0885	R(a)	19,41(c)	19,83(c)	R(a)	R(a)	25,10(d)	24,60(d)	18,04(c)	R(a)	19,49(c)	9,56(b)	R(a)	5
UFLA04-1309	23,92(g)	19,81(e)	15,54(d)	R(a)	R(a)	21,62(f)	24,85(g)	30,09(h)	12,35(c)	R(a)	8,48(b)	R(a)	4
UFLA04-0546	24,25(f)	21,10(e)	13,69(c)	R(a)	R(a)	18,82(d)	24,83(f)	33,35(g)	14,50(c)	R(a)	10,84(b)	R(a)	4
UFLA04-0559	24,32(f)	19,48(e)	13,96(c)	R(a)	R(a)	16,70(d)	24,38(f)	23,81(f)	15,02(c)	R(a)	11,01(b)	R(a)	4
UFLA04-0110	27,62(f)	20,40(d)	18,98(c)	R(a)	R(a)	24,74(e)	25,50(e)	30,91(g)	18,44(c)	R(a)	9,38(b)	R(a)	4
88AC2	R(a)	11,72(b)	R(a)	R(a)	R(a)	16,22(c)	20,32(d)	14,86(c)	R(a)	R(a)	10,52(b)	R(a)	7
88AB10a	26,19(f)	19,59(d)	19,07(d)	R(a)	R(a)	21,97(e)	25,13(f)	33,65(g)	16,73(c)	R(a)	11,28(b)	R(a)	4
88A10	27,04(g)	20,17(d)	18,82(c)	R(a)	R(a)	22,16(e)	24,21(f)	34,26(h)	17,78(c)	R(a)	11,13(b)	R(a)	4
88AB6	R(a)	9,13(b)	R(a)	R(a)	R(a)	12,56(c)	13,23(c)	23,79(d)	R(a)	R(a)	7,62(b)	R(a)	7
88AB3	R(a)	16,56(c)	R(a)	R(a)	26,06(e)	17,95(d)	15,92(c)	35,94(f)	R(a)	R(a)	12,18(b)	R(a)	6
83C3	R(a)	R(a)	R(a)	15,78(b)	R(a)	21,15(c)	R(a)	R(a)	R(a)	20,16(c)	R(a)	R(a)	9
90C1	R(a)	15,20(c)	R(a)	R(a)	29,04(d)	14,90(c)	15,17(c)	32,27(e)	R(a)	R(a)	10,67(b)	10,45(b)	5
90A4	R(a)	12,79(d)	R(a)	R(a)	27,61(f)	12,49(d)	16,20(e)	28,79(f)	R(a)	R(a)	9,69(c)	6,52(b)	5
90A8	R(a)	8,72(b)	R(a)	R(a)	R(a)	22,10(d)	21,38(d)	11,11(c)	R(a)	R(a)	10,66(c)	R(a)	7
95B10	R(a)	13,25(b)	R(a)	R(a)	R(a)	15,81(c)	21,01(c)	21,32(d)	R(a)	R(a)	12,69(b)	R(a)	7
95B9	R(a)	13,43(c)	R(a)	R(a)	R(a)	14,62(c)	20,76(d)	19,26(d)	R(a)	R(a)	9,41(b)	R(a)	7
95C3	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	16,44(d)	13,96(c)	19,49(e)	R(a)	R(a)	9,45(b)	R(a)	8
95C5	R(a)	13,56(c)	R(a)	R(a)	R(a)	13,19(c)	14,05(c)	22,51(d)	R(a)	14,86(c)	9,30(b)	9,41(b)	5
UFLA03-154	27,95(g)	11,89(c)	R(a)	R(a)	R(a)	18,90(f)	14,40(d)	32,59(h)	16,63(e)	R(a)	9,57(b)	R(a)	5
UFLA03-162	R(a)	11,66(c)	R(a)	R(a)	R(a)	17,86(d)	22,60(e)	R(a)	R(a)	7,80(b)	R(a)	R(a)	8
UFLA03-164	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	13,19(b)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	11
UFLA03-165	R(a)	10,40(c)	10,60(c)	11,74(c)	R(a)	18,13(e)	14,80(d)	20,53(f)	R(a)	11,66(c)	7,85(b)	R(a)	4
UFLA03-153	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	15,38(b)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	11

...continua...

TABELA 10. Cont.

	¹ AZI	² EST	³ ERI	⁴ AMP	⁵ CLO	⁶ RFM	⁷ KAN	⁸ NAL	⁹ CLA	¹⁰ AMO	¹¹ GEN	¹² VAN	Σ(R)
UFLA03-170	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	9,91(b)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	11
UFLA03-172	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	12,94(e)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	11
UFLA03-163	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	11,87(b)	22,15(c)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	10
BR3267	R(a)	13,14(b)	R(a)	20,08(c)	R(a)	13,19(b)	R(a)	R(a)	R(a)	19,21(c)	R(a)	R(a)	8
UFLA03-84	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	12
INPA03-11b	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	14,41(c)	21,69(d)	R(a)	R(a)	7,35(b)	R(a)	R(a)	9
J6-81A-3-7	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	15,00(c)	23,56(d)	R(a)	R(a)	R(a)	11,75(b)	10,86(b)	10
J2-21-2-10	7,07(b)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	14,47(d)	22,53(e)	R(a)	R(a)	R(a)	10,92(a)	9,53(a)	7
J3-40-1-7	27,26(g)	18,26(d)	12,48(c)	R(a)	R(a)	20,74(e)	23,04(f)	31,73(i)	15,10(d)	R(a)	9,11(b)	R(a)	4
J6-83-1-12	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	16,43(c)	21,48(d)	R(a)	R(a)	R(a)	11,17(b)	11,91(b)	8
J6-81A-2-10	25,79(e)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	13,85(c)	21,17(d)	30,72(f)	14,36(c)	R(a)	11,41(b)	R(a)	6
J4-53-1-2	28,63(f)	21,10(d)	13,67(c)	R(a)	R(a)	21,47(d)	26,78(e)	31,30(g)	22,67(d)	R(a)	11,90(b)	R(a)	4
J2-27-1-3	25,51(h)	19,30(e)	12,85(c)	R(a)	R(a)	21,34(f)	23,51(g)	32,60(i)	14,67(d)	R(a)	10,45(b)	R(a)	4
J2-30-1-14	25,85(f)	18,79(e)	14,75(d)	7,71(b)	R(a)	18,82(e)	24,33(f)	30,47(g)	15,66(d)	R(a)	10,94(c)	R(a)	3
J6-96-1-3	R(a)	9,00(b)	R(a)	R(a)	R(a)	17,57(c)	20,82(d)	9,19(b)	R(a)	R(a)	8,56(b)	R(a)	7
J2-19A-1-1	24,26(f)	13,79(c)	13,93(c)	R(a)	R(a)	18,58(d)	22,27(e)	33,02(g)	15,30(c)	R(a)	10,75(b)	R(a)	4
J2-18-1-25	25,43(h)	17,75(e)	14,79(c)	R(a)	R(a)	19,54(f)	23,77(g)	34,01(i)	16,37(d)	R(a)	9,95(b)	R(a)	4
J2-18-2-4	24,85(f)	19,15(d)	15,20(c)	R(a)	R(a)	22,67(e)	25,25(f)	30,90(g)	15,20(c)	R(a)	9,81(b)	R(a)	4
J3-34-1-3	28,30(g)	18,82(d)	14,50(c)	R(a)	R(a)	22,26(e)	24,62(f)	32,72(h)	15,85(c)	R(a)	11,32(b)	R(a)	4
J4-52-1-3	26,84(e)	17,79(c)	12,46(b)	R(a)	R(a)	21,15(d)	21,86(d)	33,41(f)	16,65(c)	R(a)	12,08(b)	R(a)	4
UFLA4-21	24,82(e)	20,68(d)	14,50(c)	R(a)	R(a)	20,57(d)	27,62(f)	31,84(g)	15,95(c)	R(a)	10,04(b)	R(a)	4
BR 322	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	16,63(c)	16,90(c)	R(a)	R(a)	R(a)	10,40(b)	8,91(b)	8
UFLA 02-86	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	13,32(c)	R(a)	R(a)	R(a)	8,26(b)	R(a)	10
UFLA 02-68	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	11,66(c)	R(a)	R(a)	R(a)	8,43(b)	R(a)	10
UFLA 02-100	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	R(a)	13,92(c)	R(a)	R(a)	R(a)	8,48(b)	R(a)	10
Σ(R)	30	17	31	46	48	5	6	18	31	44	11	44	

Azitromicina (AZI), Estreptomicina (EST), Eritromicina (ERI), Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CLO), Rifamicina (RFM), Kanamicina (KAN), Ácido Nalidíxico (NAL), Claritromicina (CLA), Amoxicilina (AMO), Gentamicina (GEN) e Vancomicina (VAN). Em cada linha, médias seguidas pela mesma letra pertencem a um mesmo grupo, segundo o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.7 Relações entre os diferentes processos promotores de crescimento vegetal

As estirpes J6-81A-3-7, J6-83-1-12, J2-21-2-10 altamente eficientes na fixação biológica de nitrogênio em feijão comum (Ferreira, 2008), e sua recomendada, CIAT899, e UFLA03-153, UFLA03-164, UFLA03-154 altamente eficientes em caupi (Soares, 2009), e as recomendadas UFLA03-84, INPA03-11B e BR3267, apresentaram habilidade para realizar outros processos promotores de crescimento vegetal.

A tabela 11 mostra que as estirpes J6-81A-3-7 e J6-83-1-12 solubilizam fosfato de alumínio e sintetizam AIA independente da adição do aminoácido precursor (L-triptofano), e a última ainda produz etileno independente da adição da L-metionina; CIAT899 solubiliza fosfato de cálcio e produz AIA independente da adição L-triptofano. Todas as estirpes altamente eficientes na FBN em simbiose com feijão comum apresentaram 67 a 84% de resistências aos antibióticos estudados, além de fixarem o nitrogênio atmosférico em vida livre. Também foi verificado que essas estirpes apresentaram uma maior taxa de crescimento quando cultivadas em meio com pH 5, mostrando, assim, tolerância à acidez e também a 0,5 cmol_c de alumínio, exceto a estirpe J6-83-1-12 que tolerou 1 cmol_c (Ferreira, 2008).

TABELA 11 Síntese dos processos promotores de crescimento vegetal e características adaptativas das estirpes altamente eficientes na FBN em feijão comum selecionadas dos experimentos de Ferreira (2008).

Estirpes	FBN		Outros processos						Características adaptativas			
	Simbi- ótica	Vida livre	*Solub.		AIA		Etileno		Degrada Fenol	Σ(R) Antib.	**pH ³	**Al ⁴ cmol _c
			P-Ca	P-Al	S/Trp ¹	C/Trp ²	S/M	C/M				
J6-81A-3-7	A	F	N	B	B	B	N	N	N	10	5	0,5
J6-83-1-12	A	F	N	B	M	B	+	+	N	8	5	1,0
J2-21-2-10	A	F	N	N	N	B	N	N	N	7	5	0,5
CIAT899	A	F	B	N	M	B	N	N	N	8	5	0,5

A: alta eficiência M: média eficiência B: baixa eficiência N: não eficiente. F: fixam N₂ * Eficiência definida de acordo com a metodologia do trabalho, 1. A: 12,59; M: 6,73 a 9,84; B: 0,23 a 4,84; 2. A: 42,28, M: 16,87 a 28,74, B: 0,47 a 12,55 3. pH para crescimento máximo; 4. Máxima concentração tolerante ao Al³⁺. **Ferreira, (2008).

53

TABELA 12 Síntese dos processos promotores de crescimento vegetal e características adaptativas das estirpes altamente eficientes na FBN em caupi selecionadas dos experimentos de Soares (2009).

Estirpes	FBN		Outros processos						Características adaptativas	
	Simbi- ótica	Vida livre	Solub.		AIA		Etileno		Degrada Fenol	Σ(R) Antib.
			P-Ca	P-Al	S/Trp ¹	C/Trp ²	S/M	C/M		
UFLA03-153	A	N	N	B	N	B	N	N	N	11
UFLA03-164	A	N	N	N	M	B	N	+	N	11
UFLA03-154	A	N	B	B	B	B	N	N	N	5
UFLA 03-84	A	N	N	B	B	B	N	N	N	12
INPA 03-11B	A	N	B	N	B	N	N	N	N	9
BR 3267	A	N	B	B	B	B	+	+	N	8

A: alta eficiência M: média eficiência B: baixa eficiência N: não eficiente. F: fixam nitrogênio * Eficiência definida de acordo com a metodologia do trabalho, S/Trp: sem L-triptofano, C/Trp: com L-triptofano, 1. A: 12,59; M: 6,73 a 9,84; B: 0,23 a 4,84; 2. A: 42,28, M: 16,87 a 28,74, B: 0,47 a 12,55.

A tabela 12 mostra que as estirpes UFLA03-154 e BR 3267 solubilizam fosfato de cálcio e alumínio, produz AIA independente da adição do aminoácido precursor, e a BR 3267 também independe da adição do aminoácido L-metionina para produzir etileno. UFLA03-153 e UFLA03-84 solubilizam fosfato de alumínio e sintetizam AIA, sendo que a primeira somente sintetiza na presença do L-triptofano. UFLA03-11B solubiliza fosfato de cálcio e sintetiza AIA independentemente da adição do aminoácido precursor. UFLA03-64 também possui essa última característica, além de produzir etileno na presença da L-metionina. Todas as estirpes eficientes na FBN em simbiose com o feijão caupi apresentaram resistências maiores que 66%, atingindo até 100% de resistência aos antibióticos estudados, exceto a UFLA03-154, que foi resistente apenas a 41,66% dos antibióticos. Nenhuma dessas estirpes altamente eficientes na FBN em simbiose com o caupi foi eficiente para fixar o nitrogênio atmosférico em vida livre.

As estirpes altamente eficientes na solubilização de fosfato de cálcio, J4-53-1-2, J2-18-2-4 e J2-18-1-25, apresentaram também habilidade de síntese do AIA, tanto na presença quanto na ausência do L-triptofano, sendo que a primeira ainda solubiliza fosfato de alumínio e a última sintetiza o etileno independentemente das condições de cultivo. Entretanto, as três foram tolerantes apenas a 33,33% dos antibióticos estudados, indicando assim, baixa tolerância aos diversos antibióticos.

As estirpes UFLA04-0110 e UFLA04-0321, que apresentaram maior potencial para síntese do AIA na ausência e presença do L-triptofano, respectivamente, apresentaram habilidade para solubilizar fosfatos (a primeira fosfato de cálcio e a segunda fosfato de alumínio) e utilizar o fenol como fonte de carbono. A UFLA04-0110 foi pouco resistente aos antibióticos (apenas 33,33%) e a UFLA04-0321 resistente a 75% dos antibióticos.

Esses resultados constituem grande contribuição biotecnológica, mostrando que a seleção de estirpes para inoculantes será mais incrementada se os estudos com as estirpes tiverem foco além da fixação biológica do nitrogênio, melhorando assim, não só o entedimento de seus comportamentos no solo, mas também a possibilidade de diversificar o uso do inoculante.

4 CONCLUSÕES

- As estirpes 88AC2, 88AB10a e BR 3267, simbióticas em caupi, e a J6-83-1-12, altamente eficiente na FBN em simbiose com feijão comum, foram as mais eficientes em realizar maior número de processos promotores de crescimento vegetal.
- Estirpes não simbióticas de feijão comum, têm maior potencial para solubilização de fosfato de cálcio destacando-se J4-53-1-2, J2-18-1-25 e J2-18-2-4.
- A maior síntese do AIA foi detectada em estirpes simbióticas, todavia ineficiente na fixação biológica do nitrogênio: J6-96-1-3 (feijão comum) e UFLA04-0321(feijão caupi) quando na ausência e presença do L-triptofano, respectivamente.
- Bactérias simbióticas de feijão comum e caupi apresentam potencial para biodegradação de composto poluente como o fenol.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estirpes analisadas mostraram-se eficientes em exercer mais de um processo promotor de crescimento vegetal, exceto a estirpe UFLA03-170, que não foi capaz de realizar nenhum dos processos estudados, inclusive a atividade antagonica contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* não evidenciada por nenhuma delas.

As estirpes J4-53-1-2, J2-18-1-25 e J2-18-2-4 apresentaram alto potencial para solubilizar o fosfato de cálcio, enquanto que esse potencial não foi expresso por nenhuma das 51 estirpes estudadas para a solubilização do fosfato de alumínio.

A maioria das estirpes aumentou a produção do AIA quando L-triptofano foi adicionado ao meio de cultivo, sendo as estirpes J6-96-1-3 (simbiótica de feijão comum) e UFLA04-0321 (simbiótica de caupi) as maiores produtoras de AIA na ausência e presença do L-triptofano, respectivamente. O etileno foi detectado em 21 estirpes, sendo a maioria detectada quando o precursor (L-metionina) foi adicionado ao meio de cultura.

Das 51 estirpes estudadas, sete (88AB6, 90A4, UFLA03-165, UFLA 02-86, UFLA 02-68, UFLA 02-100 e J3-34-1-3) utilizaram o fenol como fonte de carbono para seu crescimento, e entre elas, apenas a J3-34-1-3 não cresceu em concentrações maiores que 5mM.

Todas as estirpes apresentaram, no mínimo, tripla resistência frente aos diversos antibióticos testados, indicando que podem superar relações antagonicas de outros microrganismos, sendo que dez apresentaram resistência a dez ou mais dos antibióticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; HAYAT, S.; AHMAD, A.; INAM, A.; SAMIULLA, H. Metal and antibiotic resistance traits in *Bradyrhizobium* sp. (cajanus) isolated from soil receiving oil refinery wastewater. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Oxford, v.17, n.4, p.379-384, June 2001.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacterian on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.204, p.57-67, 1998.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.35, p.231-237, 2002.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v.17, n.4, p.399-406, 1976.

BISWAS, J.C.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B.; YANNI, Y.G.; ROLFE, B.G. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, p.880-886, 2000.

BOIEIRO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.74, n.4, p.874-880, Mar. 2007.

BUONASSISI, A.J.; COPEMAN, R.J.; PEPIN, H.S.; EATON, G.W. Effect of *Rhizobium* spp. on *Fusarium* f.sp. phaseoli. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v.8, n.2, p.140-146, 1986.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOEPPER, J.W.; ANTOUN, H. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Plant and Soil**, The Hague, v.184, p.311-321, 1996.

CHAO, L.W. Antagonistic activity of *Rhizobium* spp. against beneficial and plant pathogenic fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.10, n.5, p.213-215, 1990.

COBOS-VASCONCELOS, D. de los; SANTOYO-TEPOLE, F.; JUÁREZ-RAMÍREZ, C.; RUIZ-ORDAZ, N.; GALÍNDEZ-MAYER, C.J.J. Cometary degradation of chlorophenols by a strain of Burkholderia in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, p.57-60, 2006.

DREYFUS, B.L.; ELMERICH, C.; DOMMERGUES, Y.R. Free-living *rhizobium* strain able to grow on n_2 as the sole nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v.45, p.711-713, Feb. 1983.

FERREIRA, A.N.; ARF, O.; CARVALHO, M.A.C.; ARAÚJO, R.S.; SÁ, M.E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium Tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.57, n.3, p.507-512, July/Sept. 2000.

FERREIRA, D.F. Análise estatísticas por meio do SISVAR para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FERREIRA, P.A.A. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijoeiro e sua tolerância acidez e alumínio “in vitro**. 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FRIONI, L.; RODRIGUEZ, A.; MEERHOFF, M. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.16, n.3, p.275-282, Mar. 2001.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K.A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F.Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.39, p.179-185, 2004.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v.34, n.2, p.343-357, set. 2004.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.7, p.667-672, jul. 2005.

LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; ANDRADE, M.J.B.; SOARES, A.L.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, n.293, p.67-82, 2004.

LIMA, A.S. **Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam siratro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia ocidental**. 2007. 167p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. isoladas de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1095-1104, nov. 2005.

MINAMISAWA, K.; OGAWA, K.I.; KUKUHARA, H.; KOGA, J. Indolepyruvate Pathway for Índole-3-Acetic Acid Biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.37, n.4, p.449-453, 1996.

MOREIRA, F.M.S. **Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para produção de inoculantes comerciais**. 2005. Boletim de Extensão da UFLA. Disponível em: <www.ufla.br/editora/publicacoes/boletimdeextensao>. Acesso em: 10 dez. 2008.

MOTTA, J.S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas**. 2002. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NEVES, A.A.O. **Eficiência e diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na Amazônia Ocidental**. 2007. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NUKUI, N.; EZURA, H.; YUHASHI, K.I.; YASUTA, T.; MINAMISAWA, K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in lotus japonicus and macroptilium atropurpureum. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v.41, n.7, p.893-897, 2000.

- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, n.3, p.207-220, 1996.
- PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A.A.; MATEOS, P.F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.103-110, 2001a.
- PEIX, A.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1927-1935, 2001b.
- PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- RADWAN, T.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, Philadelphia, v.32, p.39-54, 2002.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. Tradução de Antonio Salatino. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906p.
- RIBAUDO, C.; KRUMPHOLZ, E.M.; CASSÁN, F.D.; BOTTINI, R.; CANTORE, M.L.; CURÁ, J.A. Azospirillum sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.25, n.2, p.175-185, June 2006.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v.172, p.261-269, 1995.
- SCHLINDWEIN, G.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; AZAMBUJA, A.C.; GRANADA, C.E.; GABIATTI, N.C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, maio/jun. 2008.

SILVA FILHO, G.N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, n.2, p.311-329, mar./abr. 2000.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativa nodulífera em Perdões (MG): I., Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.795-802, 2006a.

SOARES, A.L.L.; PEREIRA, J.P.R.; FERREIRA, P.A.A.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B.; MOREIRA, M.S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativa nodulífera em Perdões (MG): II., feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.30, p.803-811, 2006b.

SOARES, B.L. **Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio de diferentes procedências em caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e sua identificação**. 2009. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v.31, n.4, p.425-448, July 2007.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHAES, F.M.M.; OLIVEIRA, L.A.; PEREIRA, R.M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v.12, n.1, p.15-22, 1982.

TAMIMI, S.M.; TIMKO, M.P. Effects of ethylene and inhibitors of ethylene synthesis and action on nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v.257, n.1, p.125-131, Nov. 2003.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W.J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paulo, v.17, p.1153-1161, Oct. 2004.

VEGA-HERNÁNDEZ, M.C.; LEON-BARRIOS, M.; PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.34, p.665-668, 2002.

VINCENT, J.M.A. **Manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p. (IBP handbook, 15).

WEI, G.; YU, J.; ZHU, Y.; CHEN, W.; WANG, L. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.151, n.1, p.111-117, Feb. 2008.

ANEXO

TABELA 1	Síntese das principais características das estirpes selecionadas de experimentos realizados com feijão comum.....	67
TABELA 2	Síntese das principais características das estirpes selecionadas de experimentos realizados com feijão caupi.....	68

TABELA 1 Síntese das principais características das estirpes selecionadas de experimentos realizados com feijão comum.

Estirpes	FBN		Outros processos						Características adaptativas			
	Simbiótica	Vida livre	*Solub.		AIA		Etileno		Degrada Fenol	Σ(R) Antib.	**pH ³	**Al ⁴ cmol _c
			P-Ca	P-Al	Sem Trp ¹	Com Trp ²	Sem Metion.	Com Metion.				
J6-81A-3-7	A	F	N	B	B	B	N	N	N	10	5	0,5
J3-40-1-7	B	F	B	B	B	M	N	N	N	4	NA	NA
J6-83-1-12	A	F	N	B	M	B	+	+	N	8	5	1,0
J2-21-2-10	A	F	N	N	N	B	N	N	N	7	5	0,5
J4-52-1-3	N	F	B	B	N	B	N	+	N	4	NA	NA
J6-81A-2-10	N	F	M	B	N	M	N	+	N	6	NA	NA
J4-53-1-2	N	F	A	B	M	B	N	N	N	4	NA	NA
J2-27-1-3	B	F	B	N	B	B	N	N	N	4	NA	NA
J2-30-1-14	N	F	B	B	M	B	N	+	N	3	NA	NA
J6-96-1-3	B	N	B	B	A	M	N	+	N	7	NA	NA
J2-19A-1-1	N	F	M	N	B	B	+	+	N	4	NA	NA
J2-18-2-4	N	F	A	N	B	B	N	N	N	4	NA	NA
J2-18-1-25	N	F	A	N	B	B	+	+	N	4	NA	NA
J3-34-1-3	N	F	B	N	N	M	N	+	+	4	NA	NA
UFLA4-21	B	F	M	B	B	B	N	N	N	4	NA	NA
CIAT899	A	F	B	N	M	B	N	N	N	8	5	0,5
UFLA 02-86	N	N	B	N	B	B	N	+	+	10	NA	NA
UFLA 02-68	N	N	B	N	N	B	N	N	+	10	NA	NA
UFLA 02-100	N	N	B	N	N	B	N	+	+	10	NA	NA

A: alta eficiência M: média eficiência B: baixa eficiência N: não eficiente. F: fixam N₂ * Eficiência definida de acordo com a metodologia do trabalho, 1. A: 12,59; M: 6,73 a 9,84; B: 0,23 a 4,84 µg/mL; 2. A: 42,28; M: 16,87 a 28,74; B: 0,47 a 12,55 µg/mL 3. pH para crescimento máximo; 4. Máxima concentração tolerante ao Al⁺³. NT: não avaliada. **Ferreira 2008.

TABELA 2 Síntese das principais características das estirpes selecionadas de experimentos realizados com feijão caupi.

Estirpes	FBN		Outros processos						Características adaptativas			
	Simbiótica	Vida livre	Solub.		AIA		Etileno		Degrada Fenol	Σ(R) Antib.	pH	AI
			P-Ca	P-Al	S/ Trp	C/ Trp	S/M	C/M				
UFLA 04-1020	N	F	B	N	M	B	+	+	N	4	-	6
UFLA04-0314	N	F	B	N	B	B	N	N	N	3	-	4
UFLA 04-0885	B	N	N	B	B	B	N	N	N	5	-	5
UFLA04-0559	N	F	B	B	N	M	N	N	N	4	-	4
88AC2	N	F	B	B	M	B	+	+	N	7	-	7
88AB6	N	N	B	N	M	M	N	N	+	7	-	4
90C1	N	N	B	N	B	M	N	N	N	5	-	3
90A4	N	N	N	N	N	B	N	N	+	5	-	2
90A8	N	N	B	B	B	M	N	N	N	7	-	4
UFLA03-165	B	N	B	B	M	B	N	N	+	4	-	6
UFLA03-153	A	N	N	B	N	B	N	N	N	11	-	3
UFLA03-170	N	N	N	N	N	N	N	N	N	11	-	0
UFLA04-0321	N	N	N	B	B	A	N	+	N	9	-	4
UFLA03-162	B	NA	N	N	B	B	N	N	N	8	-	3
UFLA03-164	A	N	N	N	M	B	N	+	N	11	-	4
UFLA03-172	N	N	N	N	B	N	N	N	N	11	-	1
UFLA04-1309	N	F	B	B	B	B	N	N	N	4	-	5
UFLA03-154	A	N	B	B	B	B	N	N	N	5	-	5
UFLA04-0110	N	F	B	N	A	B	N	+	N	4	-	6
UFLA04-0546	N	F	B	N	B	B	+	+	N	4	-	4
88A10	N	N	B	N	B	B	N	N	N	4	-	3
88AB10a	N	F	B	B	M	M	+	+	N	4	-	7
88AB3	N	N	B	B	B	B	+	+	N	6	-	6
88C3	B	N	N	N	N	B	+	+	N	9	-	5
95B10	N	N	B	N	B	B	N	N	N	7	-	3
95B9	N	N	N	N	B	B	+	+	N	7	-	4
95C3	N	N	N	N	B	M	N	N	N	8	-	2
95C5	N	N	B	N	B	B	N	N	N	5	-	3
UFLA3-163	N	N	B	N	B	N	N	N	N	10	-	2
UFLA03-84	A	N	N	B	B	B	N	N	N	12	-	4
INPA03-11B	A	N	B	N	B	N	N	N	N	9	-	4
BR3267	A	N	B	B	B	B	+	+	N	8	-	7

A: alta eficiência M: média eficiência B: baixa eficiência N: não eficiente. F: fixam nitrogênio * Eficiência definida de acordo com a metodologia do trabalho, 1. A: 12,59; M: 6,73 a 9,84; B: 0,23 a 4,84 µg/mL; 2. A: 42,28, M: 16,87 a 28,74, B: 0,47 a 12,55 µg/mL.