



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
TECNOLOGIA EM AGROECOLOGIA**

LUANA ARAÚJO DOS SANTOS

**EFICIÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE
BACTÉRIAS ORIUNDAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna
unguiculata* L.) EM SOLOS DE SANTO AMARO BA**

Cruz das Almas – BA

2015

LUANA ARAÚJO DOS SANTOS

**EFICIÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE
BACTÉRIAS ORIUDAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna
unguiculata* L.) EM SOLOS DE SANTO AMARO BA**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao Colegiado de Graduação de Tecnologia em Agroecologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Agroecologia.

Orientadora: Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Cruz das Almas - BA

2015

LUANA ARAÚJO DOS SANTOS

**EFICIÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DE
BACTÉRIAS ORIUDAS DE NÓDULOS DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna
unguiculata* L.) EM SOLOS DE SANTO AMARO BA**

Monografia defendida e aprovada pela banca examinadora

Aprovado em ____/____/____

Prof^ª Dr^ª. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Dr^ª. Elizabeth Amélia Alves de Duarte

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

Aos meus queridos pais
Lídia e Geraldo pelo,
amor, carinho, cuidado e
atenção que me
proporcionaram cursar
um nível superior.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus pelo dom da vida, por me conceder esta oportunidade e ter conquistado a vitória, obrigada meu Deus, pois sem sua presença jamais conseguiria alcançar o sucesso.

Agradeço a minha família, aos meus pais Lídia e Geraldo, que com todo esforço, permitiram que esse sonho acontecesse, amo vocês, és a razão do meu viver. Aos meus irmãos, Paulo, Luciano, Junior, Eduardo, Fernando e Marcos pelo carinho e apoio e em especial minha irmã Adriana pela força, carinho, paciência e incentivo, principalmente nos momentos difíceis, durante toda essa etapa da minha vida. Ao meu amado Flávio, companheiro de todos os momentos, que foi e continua sendo paciente, compreensivo, atencioso e carinhoso comigo.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega pelo acolhimento, orientação, ensinamentos compartilhados, conselhos e amizade, serei grata eternamente.

A todos meus colegas, Djalma, Sandra Luciene, Aurélio, Mynne, Nai, Gal, Carol, Gilca, e Milena, obrigada, pelo carinho, apoio e momentos compartilhados.

As minhas amigas e companheiras Jéssica, Rosana e Rosilda, pela amizade sincera, momentos de descontração, trabalhos em grupos, por todos os momentos que passamos juntas, durante toda a graduação.

Às pessoas que ajudaram no desenvolvimento da pesquisa: Rosilda, Samilles, Aldrey, Altemar e Atenor. Aos funcionários dos laboratórios da UFRB: Silvani, Laura, Ailton, Carol, Lene, principalmente, Eliene pelo apoio e companhia durante todo o desenvolvimento do meu trabalho. A Eliane pelo apoio e orientação muito obrigada.

As mestrandas Eliane e Joice pelo apoio e disponibilidade que teve em me orientar.

Aos professores da UFRB, que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional Dr^a. Rafaela, Dr^a. Nara, Dr^a. Léa, Dr^a. Tais, Dr. Sérgio, Dr. Daniel e em especial a Dr^a. Cintia Armond, pelos ensinamentos, experiências compartilhadas e dedicação. Ao Projeto 'Reutilizando Ideias' pelo aprendizado durante toda participação.

Feliz o homem que encontrou a sabedoria e a
inteligência para o entendimento.

(Provérbios 3-13)

RESUMO

O feijão caupi é uma leguminosa muito importante por ser rica em vitaminas e proteínas. Para a produção sustentável da cultura, uma das tecnologias mais viáveis, tanto do ponto de vista ambiental, como econômico, é a utilização de inoculantes para a fixação biológica de nitrogênio. O presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar eficiência simbiótica de bactérias de nódulos de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) oriundas em solos de Santo Amaro BA. Para o isolamento e a caracterização das bactérias diazotróficas foram escolhidos nódulos aleatoriamente no sistema radicular das plantas. Foram isolados 60 estirpes de bactérias dos nódulos. As características morfofisiológicas avaliadas para cada isolado foram: a taxa de crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas; o diâmetro médio das colônias isoladas; a modificação do pH do meio; forma de bordo; elevação do bordo; a consistência da colônia; a absorção de indicador; transmissão de luz e coloração das colônias. Foram obtidos 60 isolados em cultura pura, dos quais 35 apresentaram crescimento rápido e 25 intermediários; e quanto à modificação do pH do meio de cultura, 22 alcalinizaram e 38 acidificaram. Foram obtidos 60 isolados em cultura pura, dos quais 48 apresentaram crescimento rápido e 12 intermediários; e quanto à modificação do pH do meio de cultura, 22 alcalinizaram e 38 acidificaram. Os isolados de crescimento intermediário e alcalino UFRB C4, UFRB C8A, UFRB C11B, UFRB C16B, UFRB C18, UFRB C20B, UFRB C26, UFRB C27, UFRB C36 e UFRB C39 apresentam potencial para estudos posteriores de seleção de estirpes para a cultura em solos do Recôncavo da Bahia.

Palavras chave: Fixação biológica de nitrogênio, leguminosas, clorofila total, inoculação de bactérias.

ABSTRACT

The cowpea is an important food legume for being rich source of vitamins and proteins. For sustainable crop production one of the most viable technologies both from an environmental point of view as economic is the use of inoculants for biological nitrogen fixation. This study aimed to carry out isolation, cultural characterization and authentication of isolates of bacteria present in cowpea plant roots grown in soil contaminated by lead and treated with sisal waste. For the isolation and characterization of diazotrophs nodules were randomly assigned to the root system of the plants. There were isolated 61 bacterial strains of nodes. Cultural characteristics evaluated for each isolated were: the growth rate measured by isolated colonies of onset time; the average diameter of isolated colonies; the change of pH; form of board; elevation of the board; the consistency of the colony; the indicator of absorption; light transmission and color of the colonies. 61 were obtained isolated in pure culture, of which 49 showed rapid growth and 12 intermediate; and the modification of the pH of the culture medium 22 and 39 basified acidified. Isolated intermediate and alkaline growth UFRB C4 , UFRB C8A , UFRB C11B , C16B UFRB , UFRB C18 , UFRB C20B , UFRB C26 , UFRB C27 , UFRB C36 and UFRB C39 have potential for further studies of selection of strains for cultivation in soil Recôncavo of Bahia .

Key words: biological nitrogen fixation, legumes, chlorophyll, inoculation of bacteria

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 14 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 14 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 3.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO FEIJÃO CAUPI COMO ALTERNATIVA DE MANEJO MAIS SUSTENTÁVEL PARA A AGRICULTURA FAMILIAR NO RECÔNCAVO DA BAHIA | 15 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 6. CONCLUSÕES | 28 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 29 |

1. INTRODUÇÃO

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) conhecido popularmente como feijão-de-corda, feijão fradinho ou feijão verde é uma leguminosa importante por ser rica em fonte de vitaminas e proteínas, e pode ser consumido *in natura* ou como conserva e ainda na Bahia constitui ingrediente principal para a execução do acarajé. O feijão caupi pode ser ainda utilizado como feno, proteção do solo, farinha para alimentação animal (DUTRA e TEÓFILO, 2007), como adubação verde (ARAÚJO et al., 2012).

É amplamente cultivado nas regiões Norte e Nordeste, principalmente por sua adaptação às condições edafoclimáticas, constituindo um importante recurso alimentar para a população e vem sendo cultivado também em algumas áreas da região Centro Oeste após o cultivo da soja (*Glycine max* L.).

Para a produção sustentável da cultura uma das tecnologias mais viáveis, tanto do ponto de vista ambiental como econômico, é a utilização de inoculantes para a fixação biológica de nitrogênio (LACERDA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; MARTINS et al., 2013; COSTA et al., 2014). Este processo baseia-se na simbiose das plantas com as bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio, em que o nitrogênio é obtido por simbiose e o hospedeiro (planta), nutre o simbiote com fotossintatos. Para a cultura do feijão caupi há disponíveis os seguintes inoculantes autorizados pelo MAPA (Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento): UFLA3-84 (SEMIA 6461), BR 3267 (SEMIA 6462), (SEMIA 6463) e BR 3262 (SEMIA 6464).

Estudos objetivando a seleção de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio são necessários, uma vez que o simbiote pode sofrer interferências edáfo-climáticas e ainda ter sua eficiência alterada em função e genótipos distintos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; MELO et al. 2009; COSTA et al., 2014).

No estudo realizado por Pereira (2015) foi cultivado o feijão caupi em solos com histórico de contaminação por chumbo originados do município de Santo Amaro, BA. Das plantas coletadas desse experimento, houve a ocorrência natural de nódulos no sistema radicular das plantas de feijão caupi. Buscando a seleção de estirpes eficientes e tolerantes a estresses ambientais, o presente trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar eficiência simbiótica de bactérias de nódulos de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) oriundas em solos de Santo Amaro BA.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Isolar, caracterizar e avaliar eficiência simbiótica de bactérias de nódulos de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L.) oriundas em solos de Santo Amaro BA.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar e realizar a caracterização morfofisiológica de isolados de bactérias oriundas de solos contaminados com chumbo e adubados com sisal;

Avaliar a eficiência simbiótica dos isolados que apresentarem o mesmo fenótipo de *Bradyrhizoiium* sp. na cultura do feijão caupi.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO FEIJÃO CAUPI COMO ALTERNATIVA DE MANEJO MAIS SUSTENTÁVEL PARA A AGRICULTURA FAMILIAR NO RECÔNCAVO DA BAHIA

O feijão caupi é uma cultura muito difundida entre os agricultores familiares do Nordeste e principalmente na Bahia. É cultivado, sobretudo nas regiões Norte (55,8 mil hectares) e Nordeste (1,2 milhão de hectare), principalmente para a produção de grãos secos ou verdes, visando o consumo humano *in natura*, na forma de conserva ou desidratado (TEÓFILO et al., 2008; SILVA et al., 2009). A cultura é rústica podendo ser considerada tolerante a pragas e doenças. É pouco exigente em condições edafoclimáticas, adapta-se a solos de baixa fertilidade natural, devido à sua grande capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico, em função da simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam raízes (LACERDA et al., 2004; ALMEIDA et al., 2010; COSTA et al., 2011; MARTINS et al., 2013; COSTA et al., 2014).

Em diálogo com agricultores do Recôncavo da Bahia o feijão caupi, conhecido como feijão fradinho, é cultivado em pequenas áreas e em épocas chuvosas em quantidades suficientes para o consumo familiar. O excedente é vendido em feiras livres dos municípios e é armazenado em garrafas de plásticos. O manejo é feito manualmente, através de capinas, não se faz a prática de controle de pragas e doenças, utilizando como insumo adubação orgânica da própria fazenda. Os agricultores não fazem uso dos inoculantes bacterianos autorizados pelo MAPA por não conhecerem e também por não terem acesso à tecnologia.

Dentre os processos biológicos que permitem maior sustentabilidade ambiental, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) é reconhecida por diminuir o custo da produção e a dependência do agricultor por insumos industrializados. A maioria das leguminosas é capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de N_2 , denominadas, coletivamente, de rizóbio que induzem a formação de nódulos nas raízes e convertem nitrogênio atmosférico em amônia que posteriormente convertidos compostos aminados e exportados para a parte aérea da planta.

A introdução de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio selecionadas para determinadas leguminosas pode maximizar a fixação biológica de nitrogênio na agricultura e complementar o manejo sustentável. Entretanto, a eficiência da fixação é variável, sendo influenciada, dentre outros fatores, pela especificidade hospedeira. Na seleção de estirpes de rizóbio eficientes, várias etapas são necessárias, como a verificação da capacidade de

nodulação da espécie, o isolamento das bactérias, a purificação das colônias e a avaliação da eficiência em vasos com substratos esterilizados e solo não esterilizado (FARIA e FRANCO, 2002; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Estudos comprovaram que a cultura do feijão caupi quando inoculado com bactérias fixadoras de nitrogênio não responde a adubação nitrogenada e responde a inoculação com estirpes selecionadas. Martins et al. (2013) ao utilizarem em conjunto adubação nitrogenada, nitrogênio mineral e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado, concluíram que o maior rendimento de grãos de feijão-caupi inoculado com a cepa INPA 03-11B foi obtido na ausência de adubação nitrogenada com aplicação de micronutrientes, resultando em incremento de 12,4% em relação à ausência da aplicação. Costa et al. (2011) ao realizarem o estudo da nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI verificaram que as inoculações das sementes de feijão-caupi com as cepas de bactérias diazotróficas INPA 03 11B (BR 3301) e UFLA 3-155 resultaram em rendimento de grãos equivalente a testemunha adubada com nitrogênio mineral e superior às médias do estado do Piauí. Gualter (2011) ao pesquisarem a eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão-caupi cultivado na região da pré-Amazônia maranhense verificaram que as estirpes proporcionam nodulação, acúmulo de N na parte aérea, rendimento de biomassa de matéria seca e eficiência relativa alta em comparação ao controle. Também em estudo realizado por Zilli et al. (2009) em Roraima objetivando avaliar a contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão caupi, foi verificado que todas as estirpes testadas proporcionaram rendimento de grãos da cultura do feijão-caupi semelhantemente a dose de 80 kg ha⁻¹ de N, ao passo que apenas a estirpe BR 3262 assegurou rendimento semelhante à adubação nitrogenada mineral no plantio com 50 kg ha⁻¹ de N dose de N que proporcionou maior rendimento de grãos. Fernandes et al. (2003) ao selecionarem rizóbios nativos para o feijão nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe no Pernambuco obtiveram sete isolados promissores para testes posteriores em campo com a cultura, pois os mesmos apresentaram área foliar, matéria seca da parte aérea, número e peso seco dos nódulos, superiores aos tratamentos sem inoculação e iguais ou superiores aos rizóbios recomendados para a cultura. Melo e Zilli (2009) ao realizarem o estudo da fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão caupi recomendadas para o estado de Roraima indicaram que as cultivares avaliadas apresentam alta eficiência nodular em casa de vegetação com ambas as estirpes de *Bradyrhizobium*, BR 3267 e BR 3262. Segundo Santos et al. (2014) ao realizar a inoculação com *Bradyrhizobium* e adubação nitrogenada em feijão caupi cultivado em diferentes solos, constatou que a o uso de inoculante em feijão caupi mostrou

suficiente para prover o N de que a planta necessita para sua produção, respondendo por mais de 80% do incremento de produção.

Vários trabalhos além de pesquisarem a eficiência dos inoculantes autorizados e em fase de teste, também buscam isolar e realizar a caracterização das bactérias com objetivos diversos. Nesse sentido, Silva et al. (2013) ao realizarem o isolamento e caracterização fenotípica de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com *Macroptilium lathyroides* (L.) Urb. em Roraima indicam que apesar do feijão dos arrozaís ter sido introduzido em Roraima, esta leguminosa foi capaz de estabelecer simbiose com bactérias nativas com elevada diversidade morfo-fisiológica, favorecendo o seu crescimento nestes solos. Já Silva et al. (2007) ao realizarem a caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios do solo da região do Semi-árido de Pernambuco, oriundos do feijão caupi concluíram que a diversidade morfológica e fisiológica dos isolados possibilitou a identificação de diferentes grupos, sendo alguns deles, com padrão de similaridade próximos a estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145.

Partindo do princípio de que a Agroecologia fundamenta-se no desenvolvimento sustentável e por ser o nitrogênio um recurso caro, e se mal manejado pode ser um poluente ambiental, justifica-se fazer o uso de alternativas sustentáveis, tanto para o meio ambiente, quanto para garantir a produção dos agricultores familiares. Assim, estudos objetivando o isolamento, caracterização e seleção para as condições edafo-climáticas da Região do Recôncavo da Bahia e principalmente em Santo Amaro, BA, são necessários.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos foram conduzidos utilizando os laboratórios de Biologia do solo e Microbiologia do Nuate e casa de vegetação da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Campus de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), no município de Cruz das Almas-BA.

O primeiro experimento constou do isolamento de bactérias oriundas de nódulos de plantas do feijão caupi cultivadas por Pereira (2015) em solos oriundos de Santo Amaro, BA e tratados com resíduos de sisal (*Agave sisalana*). Para o isolamento das bactérias diazotróficas presentes, os nódulos escolhidos aleatoriamente nos sistemas radiculares das plantas. Para desinfestação dos mesmos foi utilizado etanol 95% por três segundos, hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos e sucessivas lavagens em água estéril. Os nódulos desinfestados foram esmagados com pinça estéril e o líquido intra-nodular foi estriado utilizando alça de platina em placas de Petri contendo meio de cultura 79 (FRED e WASKMAN, 1928). As placas foram incubadas em BOD em temperatura média de 27 °C, com verificações diárias da formação de colônias. Após aparecimento das colônias, as mesmas foram repicadas para outra placa de Petri contendo meio de cultura 79 com indicador, azul de bromotimol e novamente incubadas para a purificação. As placas foram monitoradas diariamente visando verificar o surgimento de colônias isoladas para posterior caracterização fenotípica através da morfofisiológica de colônias.

As características morfofisiológicas avaliadas para cada isolado foram: a taxa de crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido - 2 a 3 dias); intermediário - 4 a 5 dias; lento - 6 a 10 dias; muito lento > 10 dias); o diâmetro médio das colônias isoladas; a modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutralização); forma de bordo (circular, irregular; inteiro, ondulado); elevação do bordo (lente, convexo, plano); a consistência da colônia (elástica, gomoso, butírico, aquoso); a absorção de indicador; transmissão de luz e coloração das colônias. Com exceção da característica tempo em dias para visualização das colônias, as demais foram avaliadas após 5, 8, 12 e 15 dias de aparecimento das colônias isoladas para, respectivamente, os isolados de crescimento rápido, intermediário, lento e muito lento conforme descrito em Moreira (1991).

Após a caracterização morfofisiológica de todos os isolados obtidos, os que alcanzaram o meio de cultura foram selecionados para o segundo ensaio realizado em casa-de-vegetação que objetivou avaliar a eficiência dos isolados de bactérias fixadoras de

nitrogênio, sendo selecionados 18 isolados que constituíram os tratamentos avaliados. Além desses isolados de bactérias foram utilizados de duas estirpes autorizadas como inoculantes para a cultura do feijão caupi pelo MAPA: UFLA 0384 e a BR 3267 e também a estirpe em fase de teste UFPI B1-8. Como testemunhas controle foram utilizados o controle com baixo nitrogênio (5,25 M), com inoculação e com alto nitrogênio (52,5 M), totalizando 23 tratamentos com 3 repetições dispostos em delineamento inteiramente casualizado.

Para o preparo do inóculo as bactérias foram cultivadas em meio 79 durante 48 h, sob temperatura de $28^{\circ}\text{C}\pm 2$ e 150 RPMs. Foram centrifugadas por 10 min; 6.000 RPMs e ressuspensas em solução salina (0,55%). A partir da leitura em espectrofotômetro foram reajustada ($\text{O.D.}_{600\text{nm}} = 0,5$) a 10^8 UFC mL^{-1} .

As garrafas tipo *long neck* (350 ml) foram utilizadas como vaso para o cultivo hidropônico do feijão caupi contendo solução nutritiva Arnold e Hoagland (1950). Sais 1M, NH_4NO_3 0,1875M, KCL 5, KH_2PO_4 1M, MgSO_4 2M, CaCl_2 5M, Micro 1 mL, Fero 1 mL, diluída quatro vezes (Fig. 2).



Figura 1. Germinação das sementes do feijão caupi em placa de petri com meio água-agar incubado em BOD a 27°C , por 24 horas.

Em seguida foram autoclavadas por 30 minutos, a uma pressão de $1,5 \text{ kg cm}^2$ a 127°C , com papel de filtro mais a solução. A cultivar do caupi utilizada foi a BR17 Gurguéia. As sementes foram desinfestadas superficialmente com etanol puro por 5 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos, com lavagens sucessivas em água destilada estéril. Posteriormente foram colocadas em placas de petri com meio água-agar e mantida em BOD, por 24 horas para o crescimento (Fig. 1).



Figura 2 Vista parcial do experimento de avaliação da eficiência dos isolados em fixar N_2 com feijão caupi cultivado em solução nutritiva em garrafas do tipo *long Neck* aos 4 dias de cultivo

Decorridos 19 dias do momento do plantio realizou-se a leitura de clorofila *a* e *b* e total (*a* + *b*), em seguida as plantas foram coletadas e analisados os seguintes parâmetros: número de nódulos (NN), massa fresca dos nódulos (MFN), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), a relação entre o peso da massa seca da parte aérea sob o peso da massa seca da raiz (MSPA/MSR), e a relação da MSPA da planta inoculada/MSPA da planta com N x 100 (EFR).

A clorofila total foi avaliada através do medidor eletrônico Falker modelo FL1030, sendo realizada em três folhas por planta. Em seguida as plantas foram coletadas e as raízes separadas da parte aérea na base do caule, os nódulos foram destacados e contados. Posteriormente a parte aérea e as raízes foram colocadas para secar em estufa a 60°C por 72 horas, posteriormente pesadas em balança analítica.

Os resultados das variáveis foram submetidos às análises estatisticamente, com o programa utilizado o programa SISVAR versão 4.0. Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. As variáveis número, peso fresco de nódulos, clorofila *b* e massa seca da parte aérea/massa seca da raiz, foram transformadas em raiz quadrada de ($y+1$).

| | | | | | | | | | |
|----------|----|---|----|----|---|---|---|---|---|
| UFRBC28 | S3 | R | >3 | A | C | I | A | A | S |
| UFRBC29 | S3 | R | 2 | A | P | I | A | I | N |
| UFRBC30 | S3 | R | <1 | AL | P | I | G | C | N |
| UFRBC31 | S3 | R | >3 | A | C | I | A | I | N |
| UFRBC32 | S3 | R | >3 | A | P | L | A | C | N |
| UFRBC33 | S3 | R | >3 | A | P | I | A | I | N |
| UFRBC34 | S3 | R | 2 | AL | P | I | E | C | N |
| UFRBC37 | S3 | R | >3 | A | P | I | G | A | S |
| UFRBC38 | S3 | R | >3 | A | P | I | A | A | S |
| UFRBC45 | S3 | I | 3 | A | P | L | G | A | N |
| UFRBC46 | S3 | R | >3 | AL | P | L | G | C | N |
| UFRBC47A | S3 | R | >3 | A | P | I | A | B | N |
| UFRBC49 | S3 | R | 3 | A | P | L | G | C | N |
| UFRBC50A | S3 | R | 1 | AL | P | L | E | C | S |
| UFRBC50B | S3 | R | 1 | AL | P | I | A | B | N |
| UFRBC53 | S3 | R | 1 | AL | P | I | A | B | N |
| UFRBC54 | S3 | R | 1 | AL | P | L | A | B | N |
| UFRBC55 | S3 | R | >3 | AL | C | I | G | C | S |
| UFRBC1 | S3 | R | 2 | AL | P | I | G | C | N |

* S 1 isolado oriundo de plantas cultivadas em solos distantes 50m da fábrica COBRAC e S 3 S 1 isolado oriundo de plantas cultivadas em solos distantes 50m da fábrica COBRAC Tempo em dias para o aparecimento das colônias: R: rápido (1 a 3 dias), I: intermediário (4 a 5 dias). D: diâmetro médio das colônias isoladas (mm). pH: modificação do pH do meio de cultivo: AL: alcalino, A: ácido. Ele: elevação das colônias: C: convexo, P: plano. Bordo: I: inteiro, L: lobado. Consistência: G: gomosa, A: aquosa, Elástica. Cor: A: amarelo, C: creme, B: branco, I: incolor. Indicador.

Os principais tipos morfofisiológicos encontram-se na figura 3. Do total de 60 isolados obtidos, 29 foram encontrados de raízes cultivadas em amostra de solo distantes a 50 m da fábrica e 33 a 150 m. Em áreas do município de Santo Amaro já foi identificada a deposição de resíduos de mineração ricos em chumbo (Andrade e Moraes, 2013; Magna et al., 2013). Assim, espera-se que os isolados obtidos possam ser utilizados em estudos futuros, tanto para avaliar a tolerância quanto à eficiência em promoção do crescimento vegetal para fins de fitorremediação.

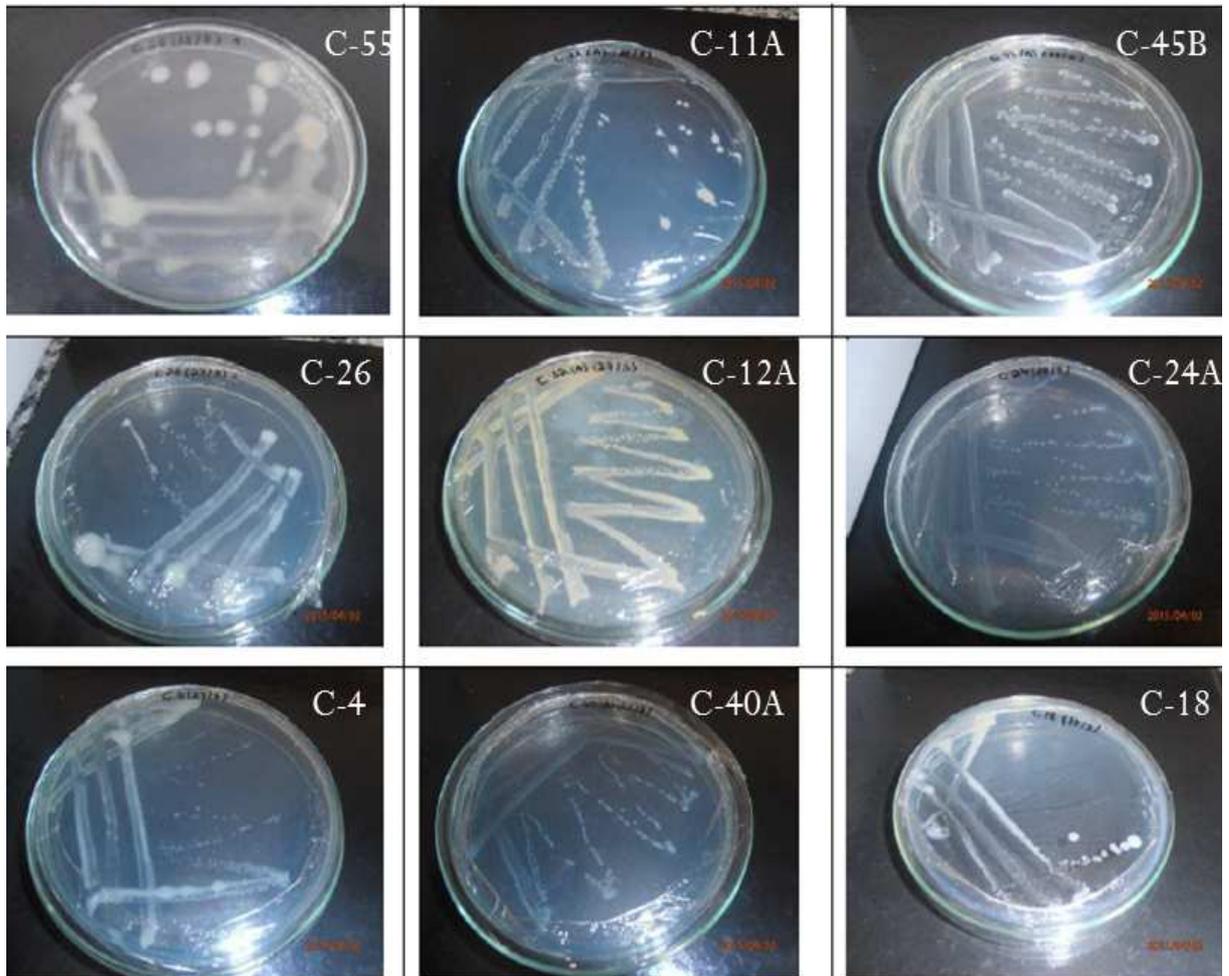


Figura. 3 Principais tipos morfológicos de colônias de isolados de bactérias oriundas de nódulos de feijão caupi (*Vigna unguiculata L.*) em solos de Santo Amaro, BA.

Para o segundo experimento foram selecionados 18 isolados que apresentaram alcalinização do meio de cultura visando avaliar a eficiência simbiótica dos mesmos e confirmação da capacidade de nodular o feijão caupi. Verificou-se que todos os tratamentos (constituídos de estirpes autorizadas e além dos isolados testados) influíram no crescimento e nodulação do feijão caupi, de forma significativa (Tabela 2).

Para a variável número de nódulos, observou-se que os controles com adição de alta e baixa concentração de nitrogênio mineral não nodularam. Isto indica que não houve contaminação no experimento. Com relação aos isolados avaliados UFRB C23A e UFRB C24B não nodularam. Durante o processo de isolamento pode ter ocorrido a seleção de colônias de algum contaminante, ou de ainda esses não terem afinidade pela cultivar de feijão caupi BR 17 Gurguéia, uma vez que não foi esta cultivar a planta-isca inicial (Pereira, 2015).

Todos os demais isolados apresentaram nodulação semelhante às ocorridas nas plantas inoculadas com as estirpes autorizadas pelo MAPA com o número de nódulos variando entre 11 a 54 nódulos planta⁻¹. O isolado UFRB C40B foi o apresentou menor número de nódulos que os demais que nodularam.

Tabela 2 Número de nódulos (NN), massa fresca de nódulos (MFN), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da parte aérea\massa seca da raiz MSPA\MSR), clorofila *a* (CLA), clorofila *b* (CLB), clorofila total (CLT) e eficiência relativa (EFR) de plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata L.*) inoculadas com isolados de bactérias oriundas de solos de Santo Amaro, BA.

| TRAT | NN | MFN | MSR | MSPA | MSPA/MSR | EFR | CLA | CLB | CLT |
|-----------|--------------------------------|-------|--------|------------------------|----------|---------|--------|------------------------|--------|
| | ---- planta ⁻¹ ---- | | | g planta ⁻¹ | | (%) | | µg mg MF ⁻¹ | |
| SN | 0,00b | 0,00b | 0,12b | 0,26c | 2,30c | 24,67c | 15,54c | 4,19b | 19,73c |
| CN | 0,00b | 0,00b | 0,19 a | 1,09a | 5,67a | 100,00a | 31,95a | 11,81a | 43,76a |
| UFLA 0384 | 51,00a | 1,57a | 0,12b | 0,36c | 2,96c | 33,37c | 12,98c | 5,45b | 18,44c |
| UFPI B1-8 | 41,33a | 1,77a | 0,10b | 0,35c | 3,36b | 32,71c | 20,36b | 5,87b | 26,24b |
| BR 3267 | 42,66a | 1,70a | 0,11b | 0,37c | 3,18b | 33,97c | 27,35a | 8,83a | 36,19a |
| UFRBC4 | 45,66a | 1,85a | 0,13b | 0,48b | 3,53b | 44,15b | 29,11a | 9,71a | 38,82a |
| UFRBC8A | 51,66a | 1,79a | 0,12b | 0,45b | 3,66b | 41,30b | 28,00a | 8,86a | 36,86a |
| UFRBC11A | 43,00a | 1,61a | 0,16a | 0,39b | 2,50c | 36,33b | 13,68c | 3,55b | 17,23c |
| UFRBC11B | 44,00a | 1,80a | 0,11b | 0,41b | 3,60b | 38,00b | 25,83a | 8,12a | 33,95a |
| UFRBC13 | 50,00a | 1,80a | 0,13b | 0,48b | 3,63b | 44,56b | 21,36b | 6,50b | 27,87b |
| UFRBC16B | 32,00a | 1,29a | 0,15a | 0,42b | 2,82c | 30,28c | 23,59a | 7,36a | 30,96a |
| UFRBC18 | 54,00a | 1,85a | 0,12b | 0,48b | 3,85b | 43,98b | 29,36a | 9,97a | 39,34a |
| UFRBC20A | 26,33a | 1,16a | 0,11b | 0,31c | 2,86c | 28,53c | 20,45b | 5,59b | 26,05b |
| UFRBC20B | 45,66a | 1,77a | 0,13b | 0,40b | 2,96c | 37,36b | 25,40a | 7,90a | 33,30a |
| UFRBC23A | 0,00b | 0,00b | 0,15a | 0,31c | 2,08c | 28,75c | 13,70c | 3,59b | 17,30c |
| UFRBC23B | 40,00a | 1,64a | 0,14a | 0,40b | 2,81c | 36,85b | 16,23c | 4,26b | 20,49c |
| UFRBC24A | 21,66a | 1,01b | 0,10b | 0,24c | 2,14c | 22,21c | 18,14b | 5,17b | 23,31b |
| UFRBC24B | 0,00b | 0,00b | 0,16a | 0,32c | 1,95c | 29,74c | 13,28c | 3,43b | 16,71c |
| UFRBC26 | 47,00a | 1,81a | 0,12b | 0,51b | 4,05b | 47,19b | 26,43a | 8,39a | 34,82a |
| UFRBC27 | 52,00a | 1,78a | 0,13b | 0,48b | 3,53b | 43,98b | 28,74a | 9,95a | 38,69a |
| UFRBC36 | 39,33a | 1,10a | 0,11b | 0,29c | 2,56c | 26,40c | 23,57a | 6,91a | 30,49a |
| UFRBC39 | 41,33a | 1,72a | 0,11b | 0,40b | 3,68b | 36,98b | 22,77a | 6,48b | 29,26a |
| UFRBC40B | 11,00b | 0,63b | 0,16b | 0,39b | 2,46c | 36,45b | 19,93b | 5,98b | 25,91b |
| CV (%) | 33,54 | 12,02 | 14,09 | 20,15 | 8,90 | 20,31 | 17,37 | 11,70 | 18,86 |

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a variável massa fresca dos nódulos as médias variaram de 0,63 a 1,85 g planta⁻¹. Como não houve nodulação para os tratamentos controle, e nem para os isolados UFRB 23A e UFRB 24B, não foi possível determinar a massa fresca dos nódulos dos mesmos. Com relação aos demais isolados, a exceção dos isolados UFRBC24A e UFRBC24B e UFRB C23A verificou-se que os isolados induziram médias similares de MFN semelhantes aos tratamentos inoculados com as estirpes autorizadas pelo MAPA, UFLA 0384 e BR 3267.

Considerando a variável massa seca da raiz, quatro isolados induziram maior produção agrupando-se ao tratamento nitrogenado (UFRBC24A, UFRBC24B, UFRB C16B e UFRB

C11A). Já a massa seca da parte aérea variou de 0,26 a 1,09 de g planta⁻¹. O tratamento que possibilitou maior média foi o controle com alta concentração de N. Contudo, deve-se considerar que 13 isolados apresentaram maior média em relação às estirpes testemunha. Deve-se considerar que as plantas foram avaliadas com apenas 19 dias, e mesmo com pouco tempo, houve formação de três grupos, os isolados UFLA 0384, UFPI B1-8, BR 3267, UFRB C20A, UFRB C23B, UFRB C24A, UFRB C24B e UFRB C36, que se assemelharam ao tratamento com baixa concentração de N. Já os isolados UFRB C4, UFRB C8A, UFRB C11A, UFRB C11B, UFRB C13, UFRB C16B, UFRB C18, UFRB C20B, UFRB C23B, UFRB C26, UFRB C27, UFRB C39 e UFRB C40B, apresentaram comportamento intermediário entre ao controle com baixa concentração de N e alta concentração. Deve-se ressaltar que os isolados UFRB C11 A e UFRB C23C também induziram maior média de massa seca de raiz das plantas. Em estudos posteriores esses isolados deverão ser incluídos em testes em vasos Leonard, em teste com solo.

Com relação à variável massa seca da parte aérea/massa seca da raiz pode-se verificar que o tratamento nitrogenado apresentou a maior relação 5,67. As testemunhas UFPI B1-8, BR 3267 e os isolados em teste UFRB 4, UFRB C8A, UFRB C11B, UFRB C13, UFRB C18, UFRB C26, UFRB C27 e UFRB C39 foram similares e apresentaram as maiores médias em comparação ao tratamento controle com baixa concentração de N.

Para a variável eficiência relativa apenas o tratamento controle com alta concentração de nitrogênio mostrando superior aos demais tratamentos (Fig. 4). Os isolados, UFRB C4, UFRB C8A, UFRB C11A, UFRB C11B, UFRB C13, UFRB C18, UFRB C20B, UFRB C23B, UFRB C26, UFRB C27, UFRB C39 e UFRB C40B, apresentaram eficiência superior ao tratamento com baixa concentração de N. A eficiência das estirpes autorizadas não foi superior aos demonstrados em outros trabalhos, contudo deve-se verificar que o tempo de avaliação do presente experimento foi muito curto, 19 dias. No trabalho de Lima et al. (2005) as estirpes UFLA 03-84, apresentaram eficiência relativa similar à da testemunha que recebeu nitrogênio. Nesse trabalho as plantas foram cultivadas em vaso tipo Leonard e adubadas com 210 mg de N por vaso, aplicado em três parcelas, e avaliadas a 60 dias. Deve-se considerar que, 19 dias para a avaliação, foi um tempo curto para uma plena atividade de fixação biológica de N₂. Nos demais trabalhos as avaliações ocorreram aos 30 dias após o plantio e verificou-se ainda que no presente estudo, o recipiente limitou o crescimento da planta em função da escassez da solução nutritiva. Mesmo assim, os isolados apresentaram

comportamento similar às estirpes autorizadas e ainda foi possível a avaliar a capacidade ou não de indução a nodulação.



Figura 4. Plantas de feijão caupi cultivadas em solução nutritiva e inoculadas com bactérias oriundas de solos de Santo Amaro, BA. Da direita para a esquerda: controle sem adubação nitrogenada, com adubação nitrogenada e o isolado UFRB C26.

O nitrogênio é um macronutriente essencial para as plantas, por participar da formação de proteínas, aminoácidos e de outros compostos importantes no metabolismo celular. Sua ausência bloqueia a síntese de hormônio responsável pelo crescimento das plantas, as citocininas (NASCIMENTO et al., 2012). O teor de clorofila total no tecido foliar das plantas corresponde uma ferramenta importante, pois se correlaciona com o teor de nitrogênio existente nos mesmos (ARGENTA et al., 2001). Para a clorofila *a*, os isolados UFRB C4, UFRB C8A, UFRB C11B, UFRB C16B, UFRB C18, UFRB C20A, UFRB C26, UFRB C27, UFRB C36 e UFRB C39, apresentaram semelhantes ao controle com alta concentração de nitrogênio e com estirpe autorizada BR 3267, variando de 22,77 a 31,95 $\mu\text{g planta}^{-1}$. As médias para a clorofila *b* variaram de 4,23 a 11,81 $\mu\text{g planta}^{-1}$. Para a variável clorofila total os isolados UFRB 4, UFRB 8A, UFRB 11B, UFRB 16B, UFRB 18, UFRB 20B, UFRB 26, UFRB 27, UFRB 36, e UFRB 39 apresentaram os mesmo comportamento das testemunhas com adubação nitrogenada e também da estirpe autorizada BR 3267.

Considerando o bom desempenho dos isolados em induzir as maiores médias nas principais variáveis da cultura do feijão caupi que evidenciam o favorecimento da inoculação e promoção de crescimento (número de nódulos, eficiência relativa e clorofila total) nove entre eles UFRB C4, UFRB C8A, UFRB C11B, UFRB C16B, UFRB C18, UFRB C20B,

UFRB C26, UFRB C27, UFRB C36 e UFRB C39 apresentam potencial para estudos posteriores de seleção de estirpes para a cultura em solos do Recôncavo da Bahia.

6. CONCLUSÕES

Foram obtidos 60 isolados em cultura pura, dos quais 48 apresentaram crescimento rápido e 12 intermediários; e quanto à modificação do pH do meio de cultura, 22 alcalinizaram e 38 acidificaram.

Os isolados de crescimento intermediário e alcalino UFRB C4, UFRB C8A, UFRB C11B, UFRB C16B, UFRB C18, UFRB C20B, UFRB C26, UFRB C27, UFRB C36 e UFRB C39 apresentam potencial para estudos posteriores de seleção de estirpes para a cultura em solos do Recôncavo da Bahia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. F.; MORAES, L. R. S. Contaminação por chumbo em Santo Amaro desafia décadas de pesquisas e a morosidade do poder público. **Ambiente e Sociedade**, v.16, n.2, p. 63-80, 2013.
- ALMEIDA, A. L. G.; ALCÂNTARA, R. M. C. M.; NÓBREGA, R.S.A.; NÓBREGA, J. C. A.; LEITE, L. F. C. SILVA, J. A. L. Produtividade do feijão-caupi cv BR 17 Gurguéia inoculado com bactérias diazotróficas simbióticas no Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.3, p.364-369, 2010.
- ARAÚJO, F. F.; Araújo, A. S. F.; Souza, M. R. Inoculação do feijão-caupi com rizobactérias promotoras de crescimento. **Pesquisa agropecuária pernambucana**, v. 17, p. 53-58, 2012.
- ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; BORTOLINI, C. G. Clorofila na folha como indicador do nível de nitrogênio em cereais. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.715-722, 2001.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; SILVA, A. F. T. ;MARTINS, L. V.; NOBREGA, J. C. A.; MOREIRA, F. M. S. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Agrária** (Recife. Online), v. 9, p. 489-494, 2014.
- COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; MARTINS, L. V.; AMARAL, F. H. C.; MOREIRA, F. M. S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2011.
- DUTRA, A. S.; TEÓFILO, E. M. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 193-197, 2007.
- FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Documentos, 158).
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.
- FRED, E. B.; WASKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology** – with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 145p.
- GUALTER, R. M. R.; BODDEY, R. M. RUMJANEK, N. G.; FREITAS, A. C. R.; XAVIER, G. R. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.3, p.303-308, 2011.

LACERDA, A.; 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**, v. 51, n. 293, p. 67-82, 2004.

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

MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isolados de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 152p. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaé, RJ.

MARTINS, R. N. L. NÓBREGA, R. S. A. SILVA, A. F. T. NÓBREGA, J. C. A. AMARAL, F. H. C. COSTA, E. M. FILHO, J. F. L. MARTINS, L. V. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1577-1586, 2013.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUERIA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006.729p.

MAGNA, G. A. M.; MACHADO, S. L.; PORTELLA, R. B.; CARVALHO, M. F. Chumbo e cádmio detectados em alimentos vegetais e gramíneas no município de Santo Amaro-Bahia. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 989-997, 2013.

MELO, S. R. D.; ZILLI, J. E. Fixação biológica de nitrogênio em cultivares de feijão-caupi recomendadas para o Estado de Roraima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1177-1183, 2009.

NASCIMENTO, R.; NASCIMENTO, D. .M.; SILVA, D.D.; ALVES, A. G. Alterações nos teores de clorofilas em plantas de feijão caupi cultivadas sob diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Educação Agrícola Superior**, v.27, n.2, p. 94-96, 2012.

PEREIRA, D. S. **Nodulação natural de *Vigna unguiculata* L. em solos de mineração de chumbo e sisal**. Cruz das Almas: UFRB. 2015. 31p. Monografia (Graduação em Tecnologia em Agroecologia).

SANTOS, R. S.; FERREIRA, J. S.; SCORIZA, R. N. Isolamento e caracterização de estirpes de rizóbio na espécie *Pterogyne nitens* Tull. **Revista de ciências ambientais**, v. 8, n. 1, 2014.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v, 37, n.1, p.16-21, 2007.

SILVA, E. F. L.; MIRANDA, J. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S.; NUNES, L. A. P. L. Nodulação natural de leguminosas em solos de cerrado do estado do Piauí. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 4, n. 3, p. 274-277, 2009.

SILVA, J. P.; GIANLUPI, V.; SILVA, K. **Isolamento e caracterização fenotípica de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com (*Macropodium lathyroides* L.) Urb. em Roraima.** In: XXXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 2013.

TEÓFILO, E. M.; DUTRA, A. S.; PITIMBEIRA, J. B.; DIAS, F. T. C.; BARBOSA, F. S. Potencial fisiológico de sementes de feijão caupi produzidas em duas regiões do Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 3, p. 443-448, 2008.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C. MARSON, B. F. RUMJANEK, N. G. XAVIER, G. R. Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Acta Amazonica**, v. 39, n.4, p. 749 - 758, 2009: