

**Bactérias Promotoras de
Crescimento do Feijoeiro**
(Phaseolus vulgaris L.)



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 64

Bactérias Promotoras de Crescimento do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Rosana Faria Vieira
Adriana Parada Dias da Silveira
Vera Lúcia Ferracini
Ricardo Antônio Almeida Pazianotto

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP-340, Km 127,5, Tanquinho Velho
Caixa Postal 69, CEP: 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: + 55 (19) 3311-2700
Fax: + 55 (19) 3311-2640
<https://www.embrapa.br/meio-ambiente/>
SAC: <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ladislau Araújo Skorupa*
Secretária-Executiva: *Vera Lúcia S. S. de Castro*
Secretário: *Cristina Tiemi Shoyama*
Bibliotecário: *Victor Paulo Marques Simão*
Membros: *Marcelo Augusto Boechat Morandi, Elisabeth Francisconi Fay, Nilce Chaves Gattaz, Joel Leandro de Queiroga, Daniel Terao (suplente), Lauro Charlet Pereira (suplente) e Maria Lúcia Zuccari (suplente).*
Normalização bibliográfica: *Victor Paulo Marques Simão*
Edição eletrônica: *Gabriel Pupo Nogueira*
Fotos capa: *Rogério Faria Vieira*

1ª edição eletrônica (2015)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio Ambiente**

Bactérias promotoras de crescimento do feijoeiro
(*Phaseolus vulgaris* L.) / Rosana Faria Vieira... [et al.]. – Jaguariúna:
Embrapa Meio Ambiente, 2015.

34 p. -- (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e
Desenvolvimento ; 64).

1. Bactéria 2. Estimulante de crescimento vegetal. 3. Ácido indolacético. 4. Fosfato. 3. Feijão. I. Vieira, Rosana Faria. II. Título. III. Série.

CDD 631.89

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Introdução.....	10
Objetivo	13
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	19
Conclusões.....	29
Referências	30

Bactérias Promotoras de Crescimento do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Rosana Faria Vieira⁽¹⁾, *Adriana Parada Dias da Silveira*⁽²⁾, *Vera Lúcia Ferracini*⁽³⁾ e *Ricardo Antônio Almeida Pazianotto*⁽⁴⁾

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação do feijoeiro com bactérias promotoras de crescimento de plantas. Os microrganismos foram isolados de solo próximo às raízes de feijão, em quatro tipos de solo. Um total de 360 bactérias foi selecionado quanto à capacidade para produzir fitohormônios e de solubilizar fosfato. As bactérias selecionadas foram testadas no feijoeiro em casa de vegetação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 8), com três repetições e os tratamentos: feijão não inoculado e inoculado com as bactérias K24, K36, K71, T30, T79, A24 e T22, isoladamente. Em todos os tratamentos o feijoeiro foi cultivado na presença e ausência de fertilização fosfatada. As bactérias K36 e T79 aumentaram o peso da parte aérea do feijoeiro e seu conteúdo em nitrogênio e fósforo (P), em solo com baixo teor de P disponível. Estes resultados foram obtidos mesmo com o isolado T79 apresentando baixa capacidade de produzir ácido indolacético (AIA) e não sendo a bactéria que mais solubilizou

¹Engenheira Agrônoma, Doutora em Solos e Nutrição de Plantas, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, CEP:13820-000, Jaguariúna, SP. rosana.vieira@embrapa.br

²Engenheira Agrônoma, Doutora em Solos e Nutrição de Plantas, Instituto Agronômico de Campinas, Av. Barão de Itapura, 1481, CEP. 13020-902, Campinas, SP. apdsilveira@gmail.com

³Química, Doutora em Ciências, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, CEP:13820-000, Jaguariúna, SP. vera.ferracini@embrapa.br

⁴Matemático, Mestre em Biofísica Molecular, Embrapa Meio Ambiente, Caixa Postal 69, CEP:13820-000, Jaguariúna, SP. ricardo.pazianotto@embrapa.br

fosfato. O K36, por outro lado, foi o que mais produziu AIA, além de ter sido um dos que mais solubilizaram fosfato. Os resultados foram também discutidos quanto à adequabilidade das técnicas utilizadas na seleção dos isolados.

Palavras-chave: cultura do feijão, ácido indolacético, giberelina, zeatina, bactérias solubilizadoras de fosfato.

Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Growth Promoting Bacteria

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of bean plants inoculation with bacterial isolates presenting plant growth promoting characteristics. These bacteria were isolated from the soil near the bean roots grown in different types of soil. The parameters used to select these microorganisms were: ability to solubilize phosphate and the ability to produce phytohormones. The selected bacteria were tested in greenhouse. The experimental design was completely randomized, in factorial scheme (2 x 8), with three replications and the following treatments: bean not inoculated and bean inoculated with K24, K36, K71, T30, T79, A24 and T22 isolates, separately. In all the above treatments beans were grown in the presence or absence of phosphate fertilization. The bacterial isolates K36 and T79 increased the shoot dry weights of bean plants and its phosphorus and nitrogen content in soils with low available P and were considered potential candidates for use as bio-fertilizers. These results were obtained even with the T79 isolate having low capacity to produce indolacetic acid (AIA) and not being the bacteria with largest phosphate solubilizing capacity. The K36 isolate, on the other hand, was the largest AIA producer, in addition to being one of the largest phosphate solubilizing. The results obtained in this work were also discussed regarding the suitability of the techniques used in the selection of PGPB.

Keywords: *bean plant, indolacetic acid, gibberellin, zeatin, solubilizing phosphate bacteria.*

1. Introdução

O feijoeiro tem especial importância para a agricultura brasileira por sua relevância na dieta da população e por ser o Brasil um dos maiores produtores e consumidores do mundo. A produção desta leguminosa atinge, aproximadamente, três milhões de toneladas por ano, com consumo médio na ordem de 17,5 kg por habitante por ano (WANDER, 2007). Com maior ou menor expressão e com os mais variados sistemas de produção, o feijoeiro é cultivado em praticamente todos os estados brasileiros (BORÉM; CARNEIRO, 2006).

A evolução das práticas culturais permitiu ganho expressivo na produtividade do feijoeiro, passando de cerca de 500 kg ha⁻¹ no final da década de 1970, para 1.000 kg h⁻¹ na safra 2009/2010. Em estados onde médios e grandes agricultores utilizam tecnologias mais avançadas, a produtividade pode superar os 2.000 kg ha⁻¹ (CONAB, 2012). Entretanto, ainda existe um grande contingente de agricultores de subsistência, caracterizado pelo baixo uso de recursos tecnológicos, como, por exemplo, a aplicação de fertilizantes (ZUCARELI et al., 2011). Estes agricultores têm como principal objetivo a produção de alimentos para consumo próprio.

O feijoeiro é uma cultura exigente do ponto de vista nutricional, em decorrência, principalmente, do seu sistema radicular reduzido, além de apresentar um ciclo curto, que varia de 90 a 100 dias. Muitos trabalhos de pesquisa sobre adubação do feijoeiro comum demonstram que a resposta dessa cultura à aplicação de fertilizantes nitrogenados e fosfatados é alta, comparados a outros nutrientes (CALVACHE et al., 1997; PASTORINI et al., 2000).

O fósforo (P) é um elemento essencial no metabolismo das plantas e sua aplicação contribui de forma significativa para o aumento da produtividade e do desenvolvimento radicular do feijoeiro, além de favorecer o aumento

do número de vagens e da massa de grãos (PELÁ et al., 2009; ARF et al., 2011). As quantidades de P utilizadas na fertilização do feijoeiro variam de 60 kg a 120 kg de P_2O_5 ha⁻¹, dependendo, evidentemente, do teor disponível deste elemento revelado pela análise química do solo e da não limitação de água para a cultura. As plantas absorvem P da solução do solo como ânions ortofosfatos, predominantemente, nas formas de HPO_4^{2-} e $H_2PO_4^{-1}$. Embora exista uma substancial reserva de P no solo, grande proporção está indisponível para as plantas e considerável parte do fertilizante fosfatado, que é aplicado ao solo, torna-se imobilizado após a aplicação. Isto ocorre em virtude da fixação e precipitação daquele elemento, em função da grande reatividade dos íons fosfatos com os constituintes do solo (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). Em decorrência disto, apenas uma pequena proporção do P é disponibilizado de forma imediata para absorção pelas plantas.

Segundo alguns autores a maior produtividade do feijoeiro pode também ser obtida pela aplicação de reguladores de crescimento vegetal, que são os fitohormônios. Estas substâncias podem ser classificadas como auxinas (ácido indolacético), citocininas (zeatina), giberelinas (ácido giberélico), ácido abscísico e etileno. Ruano et al. (1977) obtiveram incrementos na produtividade do feijoeiro por meio da aplicação do ácido giberélico, que atua no crescimento e desenvolvimento de plantas promovendo a germinação das sementes, influenciando na iniciação floral e também na frutificação (KHALID et al., 2004). Do mesmo modo Alleoni et al. (2000) verificaram que a aplicação via foliar de fitohormônios, entre eles o ácido giberélico, aumentou o peso de 1000 grãos e a produtividade da cultura de feijão. Este composto também promove aumentos no peso e número médio de vagens por planta (BARROS; RODRIGUES, 1995). Segundo Harb (1992) a aplicação de ácido giberélico nas sementes do feijoeiro afetou positivamente diferentes características da planta necessárias à obtenção de altas produtividades. Este autor também verificou aumento na produtividade daquela leguminosa com a aplicação do ácido indolacético (AIA). Este fitohormônio está associado a uma

série de processos fisiológicos, incluindo a dominância apical, tropismos, alongamento celular, indução da divisão celular do câmbio e indução de formação de raiz (CROZIER et al., 2000). Outro hormônio regulador de crescimento, a zeatina, é rapidamente metabolizada em sementes de *Phaseolus vulgaris* e tem os seus efeitos na planta associados a diversos processos como divisão celular, expansão e retardo da senescência de folhas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

O solo próximo às raízes das plantas é rico em microrganismos com suas composições diferindo do resto do solo, em consequência da maior quantidade de exsudatos oriundos das plantas. Dentre estes microrganismos destacam-se as bactérias promotoras de crescimento de plantas (plant growth-promoting bacteria, PGPB), que o fazem por uma série de mecanismos, dentre os quais podemos destacar: fixação de N₂, aumento na absorção de água e de nutrientes, controle de fitopatógenos, (FIGUEIREDO et al., 2008), entre outros. As PGPB são também capazes de produzir fitohormônios que podem proteger as plantas de diferentes tipos de estresses, aumentando a produtividade das culturas. Entre estas substâncias podem ser citados o ácido indolacético, a zeatina e o ácido giberélico, que são eficazes em pequenas concentrações (OKON; VANDERLEYDEN, 1997; EL-KHAWAS; ADACHI, 1999). Membros dos gêneros *Azospirillum*, *Acetobacter* e *Bacillus* produzem AIA e são efetivamente usados para aumentar o crescimento e produtividade de diferentes culturas (IDRIS et al., 2007). A produção de ácido giberélico por PGPB foi detectada em algumas espécies de bactérias, por exemplo, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus cereus* (KARADENIZ et al., 2006; TSAVKELOVA et al., 2007).

Algumas PGPB são também capazes de solubilizar fosfato (BSF) (HAMEEDA et al., 2008; HAMDALI et al., 2008), liberando P para as plantas (MARRA et al., 2011). Esta característica promotora de crescimento já foi detectada em bactérias como *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens* (PARK et al., 2009), *Burkholderia cepacia* SAOCV2 (PEIX et al., 2001) e na *Enterobacter*

radicincitans DSM 16656 (RICHARDSON; SIMPSON, 2011). Efeitos de BSF em promover o crescimento de *Phaseolus vulgaris* têm sido mostrados em vários trabalhos, muitos deles com respostas de um aumento na fotossíntese e conteúdos de P e N nas folhas (COLLAVINO et al., 2010). Estes autores também observaram maiores conteúdos de Mg, K e Ca na planta, além de maior peso da matéria seca da parte aérea. Verificou-se ainda, que embora o feijoeiro não tenha sido inoculado com rizóbio, o número de nódulos por planta foi maior. Guinãzú et al. (2010) relataram que um dos fatores que levam as BSF a aumentar a nutrição de P nas plantas é o maior número destas bactérias na rizosfera, após a inoculação.

2. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação do feijoeiro com bactérias promotoras de crescimento de plantas, em solo com baixa disponibilidade de fósforo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Isolamento das bactérias

As plantas de feijão foram coletadas de quatro tipos de solo (Tabela1). Em cada local foram retiradas quatro plantas de forma aleatória. Ainda no campo as partes aéreas foram cortadas e as raízes foram colocadas em isopor com gelo e enviadas ao laboratório, onde permaneceram armazenadas (5°C), por um período de 24 h, antes de serem processadas.

Tabela 1. Análises químicas dos solos utilizados nas coletas dos feijoeiros⁽¹⁾.

Solo	MO	pH	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V	B	Cu	Fe	Mn	Zn
1	19	5,9	19	1,7	32	9	15	42,7	57,5	74	0,13	0,5	21	56,8	1,2
2	26	5,0	42	2,0	26	7	31	34,3	65,1	53	0,20	1,0	49	47,9	2,7
3	36	5,5	51	5,3	49	16	38	70,7	108,7	65	0,25	7,5	9	47,8	1,7
4	18	5,2	28	1,3	12	4	22	16,8	39,3	43	0,16	0,8	17	40,0	3,8

⁽¹⁾As análises foram realizadas segundo Camargo et al. (2009). MO (matéria orgânica) g dm⁻³; pH, CaCl₂; P, mg dm⁻³; K, Ca, Mg, H+Al, SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca de cátions), mmol_cdm⁻³; V (percentagem por saturação de bases), %; B, Cu, Fe, Mn, Zn, mg dm⁻³

As raízes foram, inicialmente, lavadas levemente com água para retirada do excesso de solo. Posteriormente, elas foram colocadas, individualmente, em Bequers de 1 L contendo 500 mL de solução de MgSO₄ 10 mM estéril e agitadas por cerca de 60 minutos. Após este período 10 mL de cada solução foram retirados e adicionados a 90 mL de água estéril. As suspensões foram diluídas de forma seriada até 10⁻⁸ e 100 µL de cada diluição foram distribuídos superficialmente em placas contendo três tipos de meio de cultura: ágar triptona de soja (TSA), ágar nutriente (AN) e o meio de King (MK). Para cada diluição e para cada tipo de solo foram feitas três placas, que foram incubadas à temperatura de 28°C. O crescimento dos microrganismos foi acompanhado diariamente, por cerca de 20 dias. Culturas isoladas foram purificadas pelo método de estrias e mantidas em frascos de penicilina com óleo mineral, a 5°C. Cerca de 50, 105, 85 e 120 isolados foram obtidos dos solos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, dando um total de 360 bactérias.

3.2. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato

A quantificação da capacidade das bactérias em solubilizar fosfato (CSF) foi realizada pelo método padrão, utilizando o meio líquido Nibrip (NAUTIYAL, 1999). Frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL daquele meio e uma fonte insolúvel de P [Ca(PO₄)₃] foram inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana ajustada a 10⁸ células mL⁻¹, por

espectrofotometria, sendo a leitura realizada em comprimento de onda de 550 nm. Os frascos, em três repetições, foram incubados com cada isolado, sob agitação (160 rpm), durante 15 dias, a 28°C. No final deste período, a suspensão de células foi centrifugada a 10000 rpm, por 10 minutos e a concentração de P solúvel no extrato foi determinada pelo método colorimétrico descrito por Murphy e Riley (1962). A capacidade das bactérias para solubilizar fosfato foi também avaliada em placas de Petri, com meio de cultura sólido (TSA) (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Estas placas, quatro por isolado, foram incubadas a 28°C, por 10 dias. As bactérias que formaram halos translúcidos ao redor das colônias foram consideradas positivas para aquela característica.

3.3. Seleção de bactérias produtoras de ácido indolacético, ácido giberélico e zeatina

Para a determinação da capacidade de produção de fitohormônios os isolados foram inicialmente crescidos por 24 h em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL do meio líquido triptona de soja. Após este período 100 μ L de solução contendo 10^8 células mL⁻¹ (DO = 550) foram inoculadas em 100 mL do mesmo meio de cultura, contidos em Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram incubados a 26°C, por 10 dias, a 160 rpm. Decorrido este período de crescimento os meios de cultura foram centrifugados e o extrato foi guardado a 5°C, até análise. As extrações dos fitohormônios foram realizadas com acetato de etila, seguidas por uma etapa de partição, promovida pela adição de sais. Após centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi submetido à evaporação até secura e o resíduo foi ressuspensionado em fase móvel (75% de ácido fórmico 0,1% e 25% de metanol). A amostra foi injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com coluna Waters (Acquity UPLC[®] BEH, C18; 17 μ m; 2,1x 50 mm) acoplado à espectrometria de massas, com fonte de ionização por eletronebulização e analisador tipo triplo quadrupolo (UPLC-ESI-MS/MS). O tempo de corrida total foi de 3 minutos. Os parâmetros do instrumento foram: capilar (kV) 3,00; cone (V) 25,00; extrator (V) 4,00; temperatura

da fonte 120°C e temperatura de dessolvatação de 300°C. O modo de varredura denominado 'monitoramento de reações múltiplas' (MRM) foi selecionado com monitoramento de duas transições por analito. Os limites de detecção (LD) do instrumento para zeatina e ácido indolacético foram de 0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para o ácido giberélico foi de 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os limites de quantificação (LQ) do instrumento obtidos para zeatina, ácido indolacético e ácido giberélico foram de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva analítica foi utilizada na faixa de 0,05 – 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados dos fitohormônios foram dados por mL de meio de cultura (ASSALIM et al., 2011).

3.4. Seleção das bactérias para teste de promoção de crescimento do feijoeiro, em casa-de-vegetação

As bactérias que apresentaram valores de solubilização de fosfato maiores de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram selecionadas para o experimento de casa-de-vegetação. No caso destes isolados foram utilizados os que apresentaram maiores produções de AIA (K36, K71, T22 e A24). Foram também selecionadas bactérias que, além de apresentarem valores de solubilização de fosfato maiores de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não produziram AIA (T79 e T30). O isolado K24 foi escolhido para comparação, uma vez que apresentou baixa capacidade de solubilizar fosfato e baixa capacidade de produzir AIA. Os isolados foram também escolhidos com base na facilidade de crescimento em meio de cultura. As produções dos outros fitohormônios não foram consideradas uma vez que não foram obtidos isolados capazes de produzirem ácido giberélico e zeatina. As bactérias selecionadas foram isoladas nos seguintes solos: T30 e T79, solo 1; K36, solo 2; K24, solo 3 e T22, A24 e K71, solo 4. Os resultados de produção de AIA e da capacidade de solubilizar fosfato foram apresentados apenas para estes isolados.

3.5. Avaliação de outras características relativas ao crescimento das bactérias selecionadas para o experimento de casa-de-vegetação

As bactérias K36, K71, T22, T79, T30, A24 e K24 foram submetidas a testes de resistência à seca e da capacidade de crescimento em diferentes temperaturas e condições ácidas. Em todos os testes foi utilizado o meio de cultura sólido triptona de soja. A seleção de bactérias resistentes à seca foi conduzida em meio de cultura contendo concentrações crescentes de sorbitol, ou seja, 0, 284, 345, 402 e 460 g L⁻¹, que foram designadas, respectivamente N0, N1, N2, N3 e N4. Quanto maior a concentração de sorbitol menor a atividade da água (a_w) no meio de cultura e maior a resistência da bactéria à seca. Os testes de crescimento em condições ácidas foram feitos nos seguintes pH: 4,0, 5,5 e 7,0. Este último pH foi considerado como testemunha. As capacidades de crescimento dos microrganismos foram também testadas nas temperaturas de 8°C, 26°C e 40°C. Em todos os testes, os meios de cultura foram inoculados com 100 µL de cada solução bacteriana (10⁸ células mL⁻¹, DO = 550 nm), crescidas a 28°C, por 5 dias, a 160 rpm. As avaliações dos crescimentos das bactérias foram realizadas visualmente por um período de 10 dias. Em todos os testes, nas características consideradas positivas, o crescimento das bactérias ocorreu em praticamente toda a placa. Foram feitas quatro repetições para cada parâmetro avaliado.

3.6. Experimento em casa-de-vegetação

O solo utilizado no experimento de casa-de-vegetação foi coletado na área experimental da Embrapa Meio Ambiente e apresentou as características químicas descritas na Tabela 2. A análise textural apresentou os seguintes resultados: 41,14% de argila, 12,25% de silte, 30,26% de areia grossa e 16,23% de areia fina.

Tabela 2. Características químicas do solo utilizado no experimento de casa-de-vegetação⁽¹⁾.

pH	MO	P	K	Ca	Mg	Al	SB	H+Al	CTC	V	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn
4,2	28	21	0,5	7	5	12	12,5	80	92,5	14	12	0,23	1,2	50	3,3	0,2

⁽¹⁾As análises foram realizadas segundo Camargo et al. (2009). MO (matéria orgânica) g dm⁻³; pH, CaCl₂; P, S, mg dm⁻³; K, Ca, Mg, H+Al, SB (soma de bases), CTC (capacidade de troca de cátions), mmol_cdm⁻³; V (percentagem por saturação de bases), %; B, Cu, Fe, Mn, Zn, mg dm⁻³

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 x 8), com três repetições e os seguintes tratamentos: feijão não inoculado (C) e feijão inoculado com as bactérias K24, K36, K71, T30, T79, A24 e T22, isoladamente. Em todos os tratamentos o feijão foi cultivado em duas doses de P: a taxa recomendada (P1) e ausência de aplicação deste elemento (P0). Os controles dos tratamentos não inoculados foram denominados CP, quando o feijoeiro foi adubado com P e C0 quando não receberam adubação com este elemento. A calagem do solo foi realizada 25 dias antes do plantio do feijoeiro, com a adição de 5,2 t de calcário dolomítico ha⁻¹. No tratamento P1 foram aplicados 30 kg de P₂O₅ ha⁻¹, 50 kg de K₂O ha⁻¹, 20 kg de S ha⁻¹ e 3 kg de Zn ha⁻¹, nas formas de superfosfato simples, cloreto de potássio, sulfato de ferro e sulfato de zinco, respectivamente. Foram também aplicados o equivalente a 70 kg N h⁻¹, sendo 10 kg de N ha⁻¹ no plantio e duas aplicações em cobertura de 30 kg de N ha⁻¹, aos 15 e 30 dias após a emergência das plantas (DAE), na forma de uréia em solução. No tratamento P0 foram realizadas as mesmas adubações, à exceção da fosfatada. O experimento foi conduzido em vasos com capacidade para 2 kg de solo.

Quatro sementes de feijão var. IAC Alvorada foram semeadas por vaso deixando-se apenas duas plântulas após a emergência. No dia da semeadura 1 mL de cada isolado, ressuspensos em MgSO₄ 10 mM, numa concentração de 10⁸ células mL⁻¹, (DO = 550) foi aplicado sobre as sementes na profundidade de cerca de 1 cm. As plantas foram colhidas aos 48 DAE e levadas ao laboratório para determinação de parâmetros

relativos ao crescimento do feijoeiro. Foram quantificados os pesos das partes aéreas (PPAS) e das raízes secas (PRS) e as quantidades de N (QNAP) e de P (QPAP) absorvidas pela parte aérea.

3.7. Análise estatística

Os dados relativos às características promotoras de crescimento das bactérias foram avaliados como delineamento inteiramente casualizado. A análise de variância foi realizada determinando-se a probabilidade pelo teste F. As médias dos resultados significativos foram submetidas ao teste LSD, a 5% de probabilidade. No experimento de casa-de-vegetação os dados foram submetidos à análise de variância e ao desdobramento da interação entre os fatores, quando significativos. As médias foram comparadas pelo teste LSD a 5% de probabilidade. Quando necessário, foram realizadas transformações de variáveis para garantir os requisitos de normalidade e homocedasticidade.

4. Resultados e Discussão

4.1. Bactérias com características promotoras de crescimento da planta

Os isolados T22 e T30 apresentaram os maiores graus de resistências à seca, seguidos pelos isolados K24, K36 e A24, enquanto que os isolados K71 e T79 não foram capazes de crescer em meio de cultura com sorbitol (Tabela 3). Segundo O'Callaghan et al. (2001), variações da umidade do solo são importantes no crescimento e sobrevivência das PGPB, o que demonstra a necessidade de selecionar bactérias que possam resistir em condições de seca. Arzanesh et al. (2011) relataram que a inoculação da bactéria *Azospirillum* sp., capazes de crescer em solo com baixa umidade, foi essencial para a promoção de crescimento do trigo.

Todos os isolados cresceram em meio de cultura com pH variados e nas temperaturas de 26°C e de 40°C. Somente o isolado K24 foi capaz de crescer a 8°C (Tabela 3). A tolerância a temperaturas elevadas e pH variados têm sido citados como importantes fatores, que afetam o estabelecimento e a multiplicação de PGPB no solo (MUNDRA et al., 2011). A importância do pH sobre o crescimento da PGPB, *Pseudomonas* sp., na rizosfera de plantas foi também observada por El-Tarabily et al. (1996). Em regiões tropicais as altas temperaturas e a acidez dos solos são um dos maiores problemas associados às baixas produtividades de várias culturas e à colonização microbiana de suas raízes. Segundo Sandhya et al. (2010) para que um microrganismo seja considerado eficiente na promoção de crescimento de plantas ele tem que responder de forma positiva a diferentes condições estressantes do solo onde ele for introduzido.

Tabela 3. Crescimento das bactérias em diferentes condições de umidade, pH, e temperatura e presença de halos decorrentes da solubilização do fosfato, em meio de cultura sólido ⁽¹⁾.

Isolados	Resistência à seca	Crescimento em diferentes pH			Crescimento em diferentes temperaturas			Presença de halos de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido ⁽³⁾
		7,0	5,5	4,0	8°C	26°C	40°C	
K24	N3	+	+	+	+	+	+	±
K36	N3	+	+	+	-	+	+	-
K71	N0	+	+	+	-	+	+	+
T22	N4	+	+	+	-	+	+	-
T30	N4	+	+	+	-	+	+	-
T79	N0	+	+	+	-	+	+	+
A24	N3	+	+	+	-	+	+	+

⁽¹⁾ N0 a N4, quanto maior a numeração maior a resistência das bactérias à seca, avaliada em meio de cultura contendo sorbitol. ⁽²⁾ +, apresentaram crescimento; -, ausência de crescimento

⁽³⁾ +, presença de halo; -, ausência de halo; ±, halo quase imperceptível.

A maior ou menor eficiência das bactérias para solubilizar fosfato em meio líquido não foi relacionada às suas capacidades para solubilizar fosfato em meio de cultura sólido (Tabela 3, Figura 1), conforme também observado por Souchie et al. (2007). Halos indicadores de solubilização de fosfato foram obtidos para os isolados A24, T79 e K71. As bactérias T30, T22 e K36 não formaram halos, enquanto que o K24 formou um halo quase imperceptível em torno da colônia. A técnica de formação de halo para isolar bactérias solubilizadoras de fosfato já é conhecida há muitos anos (LOUW; WEBLEY, 1959; GUPTA et al., 1994;) e é utilizada até os dias de hoje. Porém, a formação destes halos pode não ocorrer devido às diferentes taxas de difusão, em meio de cultura, dos ácidos orgânicos de baixo peso molecular, excretados pelos microrganismos e que são essenciais para a solubilização do fosfato (JOHNSTON, 1952; RODRÍGUEZ et. al., 2006). Deste modo, no isolamento BSF o ideal seria utilizar meio de cultura líquido. A utilização desta técnica demonstrou que os isolados com maiores capacidades para solubilizar fosfato foram o K36, o T22 e o T30, seguidas pelos isolados T79, K71 e A24. O isolado K24 apresentou um potencial de solubilizar fosfato 263% menor que a média obtida para os isolados K36, T22 e T30 e 167% menor que a média obtida para os isolados K71, T79 e A24 (Figura 1). Os isolados K36 e T22, por não formarem halos de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido e seriam eliminados como possíveis PGPB se considerada apenas esta última característica.

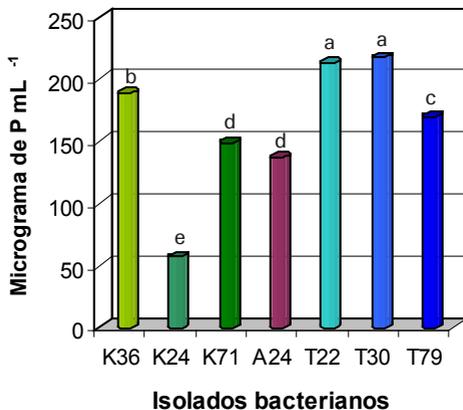


Figura 1. Quantidades de fosfato inorgânico obtidos pela solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste LSD, $p \leq 0,05$).

As maiores produções de AIA foram obtidas pelos isolados K36 e A24, seguido do T22 e do K71. Os menores resultados foram obtidos com o K24, o T30 e o T79. (Figura 2). Como podem ser observados, os resultados de produção desta auxina, não estiveram relacionados às maiores capacidades dos microrganismos em solubilizar fosfato em meio de cultura líquido, exceto para o isolado K36 e, em menor amplitude, para os isolados T22.

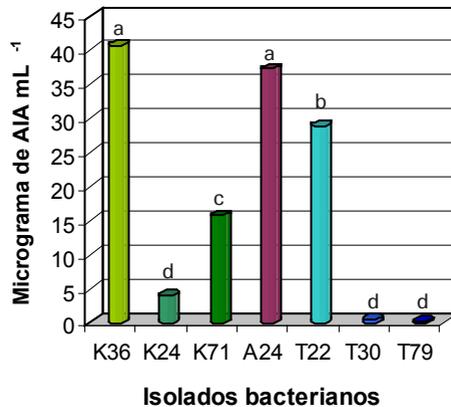


Figura 2. Produção de ácido indolacético pelos isolados bacterianos. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste LSD, $p \leq 0,05$).

4.2. Experimento de casa-de-vegetação

Na tabela 4 são apresentados os valores de p para as diferentes fontes de variação. Conforme pode ser observado, a variável PRS não foi afetada pela inoculação das plantas com as diferentes bactérias ($p = 0,48613$) e pela interação entre os fatores bactéria e adubação fosfatada ($p = 0,16168$). Entretanto, a presença ou ausência da adubação fosfatada afetou o PRS de forma significativa ($p = 0,00008$) (Tabela 5). A ausência de resposta do PRS à inoculação das plantas com os diferentes isolados bacterianos pode ser decorrente da dificuldade de retirada das raízes do solo, o que gerou um alto valor de coeficiente de variação (22,93 %).

Tabela 4. Valores de p obtidos na análise de variância

Fontes de variação (fatores)	Variáveis analisadas ⁽¹⁾			
	PRS	PPAS	QPAP	QNAP
	Valores de p			
Adubação fosfatada	0,00008	<2e-16	<2e-16	0,000048
Bactéria	0,48613	0,000284	1e-10	0,040699
Bactéria x adubação fosfatada	0,16168	0,000612	1,0725E-05	0,000002

⁽¹⁾ PRS, peso das raízes secas; PPAS, pesos das partes aéreas secas; QPAP, quantidades de P absorvidas pelas plantas; QNAP, quantidades de N absorvidas pelas plantas. e, base 10

⁽²⁾ A variável QPAP foi transformada utilizando-se a equação $1/\sqrt{QPAP}$.

Tabela 5. Efeito da adubação do feijoeiro com fertilizante fosfatado no peso das raízes secas (PRS)⁽¹⁾.

Tratamentos ⁽²⁾	PRS (gr vaso ⁻¹)
P0	0,71 b
P1	0,96 a
CV	22,93 %

⁽¹⁾Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si (teste LSD, $p \leq 0,05$)

⁽²⁾ P0, solo não adubado com P; P1, solo adubado com P

CV, coeficiente de variação

Para os pesos das partes aéreas secas houve efeito significativo de todos os fatores estudados. No tratamento P0 os maiores valores foram obtidos nas plantas inoculadas com os isolados K24, T79, T22, e K36 (Tabela 6). Em média, estes resultados foram 55% maiores que o obtido no controle (C0). Em menor amplitude o PPAS do tratamento T30 foi também mais alto que o verificado no tratamento C0. No tratamento P1 todos os valores de PPAS foram maiores que os do tratamento P0, embora houvessem diferenças quanto aos tratamentos de inoculação. Isto pode ser observado pelos maiores valores obtidos para o tratamento controle (CP) e para as plantas inoculadas com os isolados A24 e T22. Não houve diferença significativa quanto a este parâmetro nas plantas

inoculadas com os isolados K24, K71, T79 e K36. No caso destas bactérias os valores dos PPAS foram, em média, 8% menores que os obtidos para a média dos tratamentos CP, A24 e T22. Os menores valores dos resultados do PPAS, no tratamento P1, foram obtidos nas plantas inoculadas com o isolado T30.

Em decorrência da transformação dos dados de QPAP por meio da equação $1/\sqrt{QPAP}$, os menores valores deste parâmetro devem ser interpretados como maiores absorções deste elemento pelas plantas. No solo sem a adição de fertilizante fosfatado os maiores valores de QPAP foram obtidos nas plantas inoculadas com os isolados T79 e K36, seguidos em ordem decrescente pelos tratamentos (CO, T30, T22), K71 e (K24, A24) (Tabela 7). Os aumentos na QPAP nas plantas inoculadas com as bactérias T79 e K36 em relação ao controle (CO) foram, respectivamente, de 15% e 16%. No solo adubado com P as QPAP foram maiores que as obtidas no tratamento PO, para todos os tratamentos de inoculação. Os menores valores obtidos para as QPAP nas plantas do tratamento P1 foram obtidos com os isolados K24, K71 e o T22.

Tabela 6. Pesos das partes aéreas secas (PPAS) nos diferentes tratamentos⁽¹⁾.

Tratamentos de inoculação	PPAS	
	Tratamento P0 ⁽²⁾	Tratamento P1
	-----gr vaso ¹ -----	
CO ou CP	2,62 CDb	5,58 Aab
K24	3,95 ABb	5,29 BCa
T30	3,31 BCb	4,67 Ca
K71	2,50 Db	5,06 BCa
T79	4,16 Ab	5,34 BCa
A24	3,22 Cb	6,13 Aa
T22	4,09 Ab	5,54 ABa
K36	4,03 Ab	5,39 Ba
CV (%)	9,52	

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras diferentes na linha e maiúsculas na coluna, diferem significativamente entre si (teste LSD, $p \leq 0,05$)

P0, solo não adubado com P; P1, solo adubado com P

CO, tratamento controle das plantas que não foram adubadas com P; CP, tratamento controle das plantas que foram adubadas com P

As QNAP, no tratamento P0, foram maiores nas plantas inoculadas com os isolados K24, T79, T22 e K36 (Tabela 7). Estes aumentos representaram cerca de 45%, 24%, 29% e 28%, em relação ao resultado obtido no tratamento controle, sem inoculação (CO). Os altos teores de N obtidos nas plantas inoculadas com aquelas bactérias podem ser decorrentes da capacidade destes microrganismos em fixar o N₂ atmosférico ou de suas capacidades em influenciar de forma benéfica a fixação biológica do N₂ pelos rizóbios nativos. Este último parâmetro não foi avaliado, mas todas as plantas apresentaram nódulos. Os resultados referentes aos outros isolados não foram significativamente diferentes daquele do tratamento CO. No solo onde se realizou a adubação fosfatada os maiores valores de QNAP foram obtidos pelas plantas inoculadas com os isolados T30 e A24. Os outros tratamentos de inoculação foram significativamente iguais ao controle (CP), à exceção do tratamento K36, cujo resultado foi 42% menor que o obtido no tratamento CP. Ainda com relação às QNAP, verifica-se que não houve diferenças significativas entre os isolados K24, T79 e T22, considerando-se os dois níveis de fósforo.

As plantas inoculadas com o isolado K36, apesar de apresentarem valores de PPAS, de QPAP e de QNAP maiores que as plantas controles (CO) no tratamento P0, os seus conteúdos em N foram 42% menores no solo adubado com P (P1), em relação ao não adubado (P0). Isto demonstra que as condições químicas do solo podem afetar a eficiência das bactérias como PGPB. Segundo Lugtenberg e Kamilova (2009), as PGPB não podem exprimir toda a sua capacidade como promotora de crescimento de plantas, a menos que elas sejam capazes de colonizar as raízes, sobreviver e proliferar na rizosfera.

Tabela 7. Quantidades de P (QPAP) e de N (QNAP) absorvidas pelas plantas nos diferentes tratamentos.

Tratamentos de inoculação ⁽¹⁾	QPAP ⁽²⁾		QNAP	
	Tratamento P0 -----mg vaso ⁻¹ -----	Tratamento P1 -----mg vaso ⁻¹ -----	Tratamento P0 -----mg vaso ⁻¹ -----	Tratamento P1 -----mg vaso ⁻¹ -----
CO ou CP	0,31 Ca	0,24 BCb	72,32 CDb	99,39 Ba
K24	0,37 Aa	0,26 Ab	105,00 Aa	97,38 Ba
T30	0,31 Ca	0,24 BCb	58,21 Db	117,43 Aa
K71	0,34 Ba	0,26 Ab	70,13 CDb	96,60 Ba
T79	0,27 Da	0,23 BCb	89,71 Aab	86,33 BCa
A24	0,36 Aab	0,24 BCb	76,25 BCb	102,74 Aab
T22	0,31 Ca	0,24 ABb	93,11 Aab	98,62 Ba
K36	0,26 Da	0,22 Cb	92,52 ABa	70,11 Cb
CV (%)	4,47		11,52	

⁽¹⁾ Médias seguidas por letras diferentes, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, diferem significativamente entre si (teste LSD, $p \leq 0,05$). CO, tratamento controle das plantas que não foram adubadas com P; CP, tratamento controle das plantas que foram adubadas com P

⁽²⁾ Os cálculos das médias das QPAP foram calculados após a transformação desta variável por meio da equação $1/\sqrt{QPAP}$. Os menores valores da variável transformada correspondem aos maiores valores da variável original e vice-versa.

No tratamento P0, as plantas inoculadas com os isolados T79 e K36 foram as únicas que apresentaram os maiores resultados relativos às três características de avaliação do crescimento do feijoeiro, ou seja, PPAS, QPAP e QNAP, em relação ao controle (CO). Embora a bactéria K36 tenha sido uma das que mais produziu AIA, isto não ocorreu com o isolado T79. Isto pode estar ligado ao fato de que a produção desta auxina pelas bactérias pode influenciar o crescimento das plantas de formas diferentes, com efeitos positivos, negativos ou nulos. Estes efeitos dependeriam dos níveis de ácido indolacético produzidos pelos isolados bacterianos, quando em associação com a planta (SPAEPEN et al., 2007). O AIA secretado pelas bactérias atua em conjunto com o suprimento de AIA endógeno da planta. Assim, o impacto da auxina bacteriana sobre os tecidos vegetais dependeria da quantidade produzida

e secretada pelas raízes (ALI et al., 2010). Do mesmo modo, os maiores valores de QPAP nas plantas inoculadas com os isolados K36 e T79, não foram relacionados ao potencial destes microrganismos em solubilizar fosfato em meio de cultura líquido. Estes resultados corroboram aqueles obtidos por Collavino et al. (2010) que relataram que a capacidade de solubilizar fosfato é uma característica que não está, necessariamente, associada à promoção de crescimento de plantas pelas bactérias.

Os resultados obtidos com o isolado K24 são os que mais demonstraram a ausência de relação entre as características promotoras de crescimento da planta obtidas no laboratório e as obtidas em condições de solo. Este fato sugere que na seleção de PGPB deve ser testado o maior número possível de parâmetros que incluiriam, por exemplo, a produção de sideróforos, a determinação do ácido cianídrico, a produção de antibióticos, a produção da deaminase do ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), a mineralização de nutrientes, a fixação biológica de N_2 , entre outros. Os sideróforos são metabólitos que conseguem se ligar ao ferro (Fe) e transportar para dentro da célula, onde ele participa de uma série de processos (DE LUCA et al., 1988). A produção de ácido cianídrico pode promover o crescimento das plantas diretamente, pelo aumento do desenvolvimento dos pelos radiculares (LUZ, 1996). A deaminase do ACC cataliza a clivagem desta substância a α -cetobutirato e amônia, que é utilizada como fonte de N para as bactérias diminuindo os níveis de etileno na planta. Este hormônio é produzido em resposta a estresses e pode prejudicar o crescimento de plantas. Embora a fixação de N_2 não tenha sido avaliada, alguns trabalhos têm demonstrado que a utilização de certas PGPB podem contribuir para o melhor estabelecimento e funcionamento da simbiose entre o feijoeiro e as bactérias coletivamente denominadas de rizóbio, mesmo em solo que não recebeu adubação fosfatada (Remans et al., 2007). No caso do isolado K24 não pode ser descartada a possibilidade de que ele apresente alta capacidade de fixar N_2 . As plantas inoculadas com o isolado K24 também demonstraram que a absorção de $0,37 \text{ mg P vaso}^{-1}$ foi suficiente para ocasionar maior PPAS

desde que a QNAP fosse alta.

A inoculação de PGPB tem sido proposta como um componente do manejo sustentável do solo. Embora exista grande interesse na inoculação destas bactérias em diferentes culturas, os resultados obtidos a campo têm sido inconsistentes, devido à competição entre os microrganismos introduzidos e os nativos. Este fato poderia resultar em baixa persistência das PGPB inoculadas na rizosfera. Segundo Ghanem et al. (2011) uma estratégia alternativa seria selecionar PGPB pela sua capacidade para competir eficientemente com outros microrganismos. Deste modo, tipos diferentes de solos deveriam ser testados. Vários estudos têm também descrito variações entre cultivares de feijão na resposta à inoculação com PGPB e seria importante que tal fato fosse também considerado na seleção destas bactérias. De acordo com Remans et al. (2008), por exemplo, variações fenotípicas e genotípicas do feijoeiro modificam a resposta desta cultura à inoculação com bactérias produtoras de AIA.

Dos resultados obtidos, verifica-se que alguns dos isolados estudados apresentam potencial para promover o crescimento e desenvolvimento do feijoeiro, em solo com baixo teor de P. Embora os resultados do tratamento P1 tenham sido geralmente melhores, os obtidos com a inoculação dos isolados K36 e T79 no tratamento PO foram maiores que os obtidos para o tratamento controle (CO). Estes resultados podem proporcionar um aumento significativo na produtividade do feijoeiro, considerando-se o baixo nível tecnológico utilizado pelos pequenos agricultores.

5. Conclusões

1. Na seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato deve ser utilizada a técnica de cultivo em meio de cultura líquido, uma vez que em meio sólido os resultados não são consistentes.

2. Várias características de promoção de crescimento de plantas devem ser utilizadas na seleção de PGPB, de modo a obter um maior entendimento dos reais efeitos da inoculação destes microrganismos no feijoeiro.
3. Os isolados K36 e T79 apresentam potenciais para aumentar o crescimento do feijoeiro, em solo com baixo teor de P disponível.

Referências

ALI, B.; SABRI, A. N.; HASNAIN, S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 1379-1384, 2010.

ALLEONI, B.; BOSQUEIRO, M.; ROSSI, M. Efeito dos reguladores vegetais de Stimulate® no desenvolvimento e produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, Ponta Grossa, v. 6, n. 1, p. 23-35, 2000.

ARF, M. V.; BUZETTI, S.; ARF, O.; KAPPES, C.; FERREIRA, J. P.; GITTI, D. C.; YAMAMOTO, C. J. T. Fontes e épocas de aplicação de nitrogênio em feijoeiro de inverno sob sistema plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 430-438, 2011.

ARZANESH, M. H.; ALIKHANI, H. A.; KHAVAZI, K.; RAHIMIAN, H. A.; MIRANSARI, M. Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 197-205, 2011.

ASSALIM, M. R.; PIOVESANA, A. M; ROSA, M. A; FERRACINI, V.; VIEIRA, R. F. Identificação e quantificação de fitohormônios produzidos por bactérias por UPLC-ESI-MS/MS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS, 4., 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, 2011.

BARROS, S. A.; RODRIGUES, J. D. Efeito de fitoreguladores na produtividade do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv 'carioca'. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 16, n. 1, p.136-140, 1995.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. Viçosa: UFV, 2006. p. 13-18.

CALVACHE, A. M.; REICHARDT, K.; MALAVOLTA, E.; BACCHI, O. O. S. Efeito da deficiência hídrica e da adubação nitrogenada na produtividade e na eficiência do uso de

água em uma cultura do feijão. **Science Agrícola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 232-240, 1997.

CAMARGO, O. A. de; MONIZ, A. C.; JORGE, J. A.; VALADARES, J. M. A. S. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas**. Campinas, Instituto Agronômico, 2009. 77 p. (IAC. Boletim Técnico, 66).

COLLAVINO, M. M.; SANSBERRO, P. A.; MROGINSKI, L. A.; AGUILAR, O. M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 46, n. 7, p. 727-738, 2010.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento, maio 2012**. Brasília, DF, 2012. 35 p.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B. B.; GRISSEN, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 850-894.

DE LUCA, N. G.; WEXLER, M.; PEREIRA, M. J.; YEOMAN, K. H.; JOHNSTON, A. W. B. Is the fur gene of *Rhizobium leguminosarum* essential? **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p. 289-295, 1988.

EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiela* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 28, n. 4, p. 377-381, 1999.

EL-TARABILY, K. A.; SYKES, M. L.; KURTBÖKE, I. D.; HARDY GEST, J.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H. Synergistic effects of a cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 74, n. 4, p. 618-624, 1996.

FIGUEIREDO, M. V. B.; MARTINEZ, C. R.; BURITY, H. A.; CHANWAY, C. P. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 1187-1193, 2008.

GHANEM, M. E.; HICHRI, I.; SMIGOCKI, A. C.; ALBACETE, A.; FAUCONNIER, M.; DIATLOFF, E.; MARTINEZ-ANDUJAR, C.; LUTTS, S.; DODD, I. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Root-target biotechnology to mediate hormonal signaling and improve crop stress tolerance. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 30, n. 5, p. 807-823, 2011.

GUIÑAZÚ, L. B.; ANDRÉS, J. A.; MFDEL, P.; PISTORIO, M.; ROSAS, S. B. Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 46, n. 2, p. 185-190, 2010.

GUPTA, R.; SINGAL, R.; SHANKAR, A.; KUHAD, R. C.; SAXENA, R. K. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Journal of General Applied Microbiology**, Tokyo, v. 40, n. 3, p. 255-260, 1994.

HAMDALI, H. H. M.; VIROLLE, M. J.; OUHDOUCH, Y. Growth promotion and protection against damping-off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P deficient soil under greenhouse conditions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 510-517, 2008.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, Jena, v. 163, n. 2, p. 234-242, 2008.

HARB, E. Z. Effects of soaking seeds in some growth regulators and micronutrients on growth, some chemical constituents and yield of faba beans and cotton plants. **Bulletin of Faculty of Agriculture of Cairo**, El Cairo, v. 3, n. 1, p. 429-452, 1992.

IDRIS, E. E.; IGLESIAS, E. J.; TALON, M.; BORRIS, R. Tryptophan dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 20, n. 6, p. 619-626, 2007.

JOHNSTON, H. W. The solubilization of phosphate: the action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphate. **New Zealand Journal of Science and Technology**, Wellington, v. 33, p. 436-444, 1952.

KARADENIZ, A.; TOPCUOGLU, S. F.; INAN, S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 1061-1064, 2006.

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, n. 3, p. 473-480, 2004.

LOUW, H. A.; WEBLEY, D. M. A study of soil bacteria dissolving certain phosphate fertilizers and related compounds. **Journal Applied of Bacteriology**, London, v. 22, n. 2, p. 227-233, 1959.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, Stanford, v. 63, p. 541-556, 2009.

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.

MARRA, L. M.; SILVIA, M. O.; SOARES, C. R. F. S.; MOREIRA, F. S. Solubilisation of inorganic phosphates by inoculant strains from tropical legumes. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 68, n. 5, p. 603-609, 2011.

MUNDR, S.; ARORA, R.; STOB DAN, T. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by anovel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula* sp. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. *World Journal of*

Microbiology & Biotechnology, Oxford, v. 27, n. 10, p. 2387-2396, 2011.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Analytical Chemistry Acta**, Amsterdam, v. 27, p. 31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Fems Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 170, n. 1, p. 265-270, 1999.

O'CALLAGHAN, K. J.; DIXON, R. A.; COCKING, E. C. *Arabidopsis thaliana*: A model for study of colonization by non-pathogenic and plant-growth-promoting rhizobacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, n. 9, p. 975-982, 2001.

OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, Washington, DC, v. 63, n. 7, p. 366-370, 1997.

PARK, K. H.; LEE, C. Y.; SON, H. J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth-promoting activities. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 222-228, 2009.

PASTORINI, L. H.; BACARIN, M. A.; LOPES, N. F.; LIMA, M. G. S. Crescimento inicial de feijoeiro submetido a diferentes doses de fósforo em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 270, p. 219-228, 2000.

PEIX, A. M.; 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 and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n. 14, p. 1927-1935, 2001.

PELÁ, A.; RODRIGUES, M. S.; SANTANA, J. S.; TEIXEIRA, I. R. Fontes de fósforo para a adubação foliar na cultura do feijoeiro. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 313-318, 2009.

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

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, G. M.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGHS, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J.; VANDERLEYDEN, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 302, n. 1, p. 149-161, 2008.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant and Physiology**, Bethesda, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Plant and Soil**, v. 287, p. 15–21, n. 1, 2006.

RUANO, L. P.; RODRIGUES, J. D.; CONCEIÇÃO, F. A. D.; PEDRAS, J. F. Efeitos de ácido giberélico no aumento da produtividade do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Mineira. **Poliagro**, Bandeirantes, v. 1, n. 2, p. 35-49, 1977.

SANDHYA, V.; ALI, S. Z.; REDDY, B. V. G.; GROVER, M. Effect of osmotic stress on plant promoting *Pseudomonas* spp. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 192, n. 10, p. 867-876, 2010.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microorganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

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

SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; TORRACA, L. A. S.; MAGALHÃES, 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 Amazonica**, Manaus, v. 12, n. 1, p.15-22, 1982.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. p. 820

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. L. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Jena, v. 162, n. 1, p. 69-76, 2007.

WANDER, A. E. Produção e consumo de feijão no Brasil, 1975-2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 7-21, 2007.

ZUCARELI, C.; PRANDO, A. M.; JUNIOR, E. U. R.; NAKAGAWA, J. Fósforo na produtividade e qualidade de sementes de feijão Carioca Precoce cultivado no período das águas. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 32-38, 2011.

Embrapa

Meio Ambiente

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA